

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/094885

発行日 平成30年9月20日(2018.9.20)

(43) 国際公開日 平成29年6月8日(2017.6.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 3
<b>C 0 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 5
<b>C 0 7 K 14/435 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/435	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 15/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/12	
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2017-554202 (P2017-554202)	(71) 出願人	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/085902	(71) 出願人	899000068 学校法人早稲田大学 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地
(22) 国際出願日	平成28年12月2日(2016.12.2)	(74) 代理人	100106909 弁理士 棚井 澄雄
(31) 優先権主張番号	62/340,533	(74) 代理人	100188558 弁理士 飯田 雅人
(32) 優先日	平成28年5月24日(2016.5.24)	(74) 代理人	100140774 弁理士 大浪 一徳
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	坪井 貴司 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
(31) 優先権主張番号	特願2015-237524 (P2015-237524)		
(32) 優先日	平成27年12月4日(2015.12.4)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンド蛍光センサータンパク質とその使用

## (57) 【要約】

本発明は、リガンドに特異的に応答して蛍光特性が変化するリガンド蛍光センサータンパク質であって、前記リガンド蛍光センサータンパク質は、第1の蛍光タンパク質ドメインと、N末端側リンカーと、リガンド結合ドメインと、C末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインとを含み、前記リガンド蛍光センサータンパク質に用いられる蛍光タンパク質が バレル構造を有するものであり、前記第1の蛍光タンパク質ドメインが前記蛍光タンパク質のN末端から 1 ~ 3 の シート領域と、これに続く ヘリックス領域と、 4 ~ 6 の シート領域とを含み、前記第2の蛍光タンパク質ドメインが前記第1の蛍光タンパク質ドメインと同一の前記蛍光タンパク質の 7 ~ 11 の シート領域を含み、前記N末端側リンカー及び前記C末端側リンカーは、それぞれ独立して1個又は数個のアミノ酸からなるポリペプチドである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

リガンドに特異的に応答して蛍光特性が変化するリガンド蛍光センサータンパク質であって、

前記リガンド蛍光センサータンパク質は、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと、N 末端側リンカーと、リガンド結合ドメインと、C 末端側リンカーと、第 2 の蛍光タンパク質ドメインとを含み、

前記リガンド蛍光センサータンパク質に用いられる蛍光タンパク質が バレル構造を有するものであり、

前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインが前記蛍光タンパク質の N 末端から 1 ~ 3 のシート領域と、これに続く ヘリックス領域と、4 ~ 6 のシート領域とを含み、

前記第 2 の蛍光タンパク質ドメインが前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインと同一の前記蛍光タンパク質の 7 ~ 11 のシート領域を含み、

前記 N 末端側リンカー及び前記 C 末端側リンカーは、それぞれ独立して 1 個又は数個のアミノ酸からなるポリペプチドであることを特徴とするリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 2】

前記蛍光タンパク質が BFP、GFP、Citrine、又は mApple である請求項 1 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 3】

前記リガンド蛍光センサータンパク質は、N 末端から C 末端に向かって、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと、N 末端側リンカーと、リガンド結合ドメインと、C 末端側リンカーと、第 2 の蛍光タンパク質ドメインとが、直接この順番にペプチド結合で連結してなるポリペプチドを含む請求項 1 又は 2 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 4】

前記リガンド蛍光センサータンパク質は、2 つのリガンド結合ドメインを含み、

N 末端から C 末端に向かって、第 1 のリガンド結合ドメインと、N 末端側リンカーと、第 2 の蛍光タンパク質ドメインと、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと、C 末端側リンカーと、第 2 のリガンド結合ドメインと、が、直接この順番にペプチド結合で連結してなるポリペプチドを含む請求項 1 又は 2 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 5】

前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインは、以下の (B1) ~ (B3) のいずれかのポリペプチドを含み、

前記第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、以下の (C1) ~ (C3) のいずれかのポリペプチドを含み、

前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインと第 2 の蛍光タンパク質ドメインとが同一の蛍光タンパク質に由来する請求項 1 又は 2 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

(B1) 配列番号 1、3、5、又は 7 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(B2) 配列番号 1、3、5、又は 7 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 2 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド、

(B3) 配列番号 1、3、5、又は 7 で表されるアミノ酸配列と同一性が 80% 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 2 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド、

(C1) 配列番号 2、4、6、又は 8 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(C2) 配列番号 2、4、6、又は 8 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド、

(C3) 配列番号 2、4、6、又は 8 で表されるアミノ酸配列と同一性が 80% 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド

10

20

30

40

50

## 【請求項 6】

前記リガンドが、ヌクレオチド若しくはその誘導体、核酸、糖鎖、タンパク質、脂質複合体、又は低分子化合物である請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 7】

前記ヌクレオチド若しくはその誘導体が、ATP、cAMP、又はcGMPである請求項 6 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 8】

前記タンパク質が抗原又は抗体である請求項 6 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

10

## 【請求項 9】

以下の(D1) ~ (D3)のいずれかのポリペプチドを含む請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

- (D1) 配列番号 9 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、
- (D2) 配列番号 9 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記ポリペプチド(D1)と同一の、リガンドへの結合能及び蛍光特性を有するポリペプチド、
- (D3) 配列番号 9 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列と同一性が 80% 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記ポリペプチド(D1)と同一の、リガンドへの結合能及び蛍光特性を有するポリペプチド

20

## 【請求項 10】

さらに、オルガネラ局在化シグナルペプチドを含む請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 11】

前記オルガネラ局在化シグナルペプチドがミトコンドリア局在化シグナルペプチドである請求項 10 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 12】

前記オルガネラ局在化シグナルペプチドが核局在化シグナルペプチドである請求項 10 に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

## 【請求項 13】

さらに、細胞膜透過性ペプチドを含む請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

30

## 【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質をコードすることを特徴とするポリヌクレオチド。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする発現ベクター。

## 【請求項 16】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質を少なくとも 1 種類含むことを特徴とする細胞。

40

## 【請求項 17】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを少なくとも 1 種類含む染色体を有することを特徴とする細胞。

## 【請求項 18】

請求項 15 に記載の発現ベクターを少なくとも 1 種類含むことを特徴とする細胞。

## 【請求項 19】

請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の細胞を含むことを特徴とする非ヒト生物。

## 【請求項 20】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質、請求項 14 に記載のポリヌクレオチド、請求項 15 に記載の発現ベクター、請求項 16 ~ 18 のいず

50

れか一項に記載の細胞、及び請求項 19 に記載の非ヒト生物からなる群から選ばれる少なくとも一つを含むことを特徴とするリガンド濃度測定用キット。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のリガンド蛍光センサータンパク質と、既知の濃度のリガンドを含む標準溶液と接触させて、蛍光強度を測定し、検量線を作成する検量線作成工程と、

前記リガンド蛍光センサータンパク質と、未知の濃度のリガンドを含む溶液と接触させて、蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、

前記検量線作成工程において、作成された検量線に基づいて、前記蛍光測定工程において測定された蛍光強度に対するリガンド濃度を決定する濃度決定工程と、

を備えることを特徴とする被検試料中のリガンド濃度の決定方法。

10

【請求項 22】

請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の細胞を用いて、経時的な蛍光強度を測定する工程を備えることを特徴とする生細胞におけるリガンド濃度の経時変化の検知方法。

【請求項 23】

請求項 19 に記載の非ヒト生物を用いて、経時的な蛍光強度を測定する工程を備えることを特徴とする生きた非ヒト生物におけるリガンド濃度の経時変化の検知方法。

【請求項 24】

A T P 濃度の特異的に応答して蛍光特性が変化する A T P 蛍光センサータンパク質であって、該 A T P 蛍光センサータンパク質は、N 末端から C 末端に向けて、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと、N 末端側リンカーと、A T P 結合ドメインと、C 末端側リンカーと、第 2 の蛍光タンパク質ドメインとが、直接この順にペプチド結合で連結したポリペプチドを含み、該ポリペプチドは、

20

第 1 の蛍光タンパク質ドメインは、蛍光タンパク質 B F P、C i t r i n e 又は m A p p l e の N 末端から、1 ~ 3 の シート領域と、これに続く ヘリックス領域と、4 ~ 6 の シート領域とを含み、

第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと同一の蛍光タンパク質の 7 ~ 11 の シート領域を含み、

A T P 結合ドメインは F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-A T P 合成酵素の サブユニットからなり、

N 末端側リンカー及び C 末端側リンカーは、それぞれ、1 個又は数個のアミノ酸からなるポリペプチドであることを特徴とする A T P 蛍光センサータンパク質。

30

【請求項 25】

( A 1 1 ) A T P 結合ドメインは配列番号 15 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 1 及び 2 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号 16 及び 17 のアミノ酸配列である、M a L i o n B ポリペプチドと、

( A 1 2 ) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質ドメイン、N 末端側のリンカー、及び C 末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号 15、1、2、16、及び 17 のアミノ酸配列か、配列番号 13、1、2、14、及び 15 のアミノ酸配列に 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、M a L i o n B ポリペプチド ( A 1 1 ) と同一の A T P 結合能及び蛍光特性を有する、M a L i o n B ポリペプチドと、

40

( B 1 1 ) A T P 結合ドメインは配列番号 15 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 5 及び 6 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、W R G ( T r p - A r g - G l y ) 及び配列番号 18 のアミノ酸配列である、M a L i o n G ポリペプチドと、

( B 1 2 ) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質ドメイン、N 末端側のリンカー及び C 末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号 15、5、6、W R G ( T r p - A r g - G l y )、及び配列番号 18 のアミノ酸配列か、配列番号 15、5、6、W R G ( T r p - A r g - G l y )、及び配列番号 18 のアミノ

50

酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、MaLi on Gポリペプチド(B11)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Gポリペプチドと、

(C11) ATP結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列であり、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号7及び8のアミノ酸配列であり、N末端及びC末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号19及びPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列である、MaLi on Rポリペプチドと、

(C12) ATP結合ドメイン、第1の蛍光タンパク質ドメイン、第2の蛍光タンパク質ドメイン、N末端側のリンカー及びC末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号15、7、8、19、及びPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列か、配列番号15、7、8、19、及びPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、MaLi on Rポリペプチド(C11)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Rポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む請求項24に記載のATP蛍光センサータンパク質。

10

【請求項26】

(A21) 配列番号9のアミノ酸配列からなる、MaLi on Bポリペプチドと、

(A22) 配列番号9のアミノ酸配列のうち、配列番号16及び17のアミノ酸配列を除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLi on Bポリペプチド(A21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Bポリペプチドと、

20

(B21) 配列番号10のアミノ酸配列からなる、MaLi on Gポリペプチドと、

(B22) 配列番号10のアミノ酸配列のうち、配列番号10の第146-148位のWRG(Trp-Arg-Gly)のアミノ酸配列と、配列番号18のアミノ酸配列とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLi on Gポリペプチド(B21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Gポリペプチドと、

(C21) 配列番号11のアミノ酸配列からなる、MaLi on Rポリペプチドと、

(C22) 配列番号11のアミノ酸配列のうち、配列番号11の第288-290位のPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列と、配列番号19のアミノ酸配列とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLi on Rポリペプチド(C21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Rポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む請求項24又は25に記載のATP蛍光センサータンパク質。

30

【請求項27】

請求項24~26のいずれか一項に記載のATP蛍光センサータンパク質を含むことを特徴とする蛍光組成物。

【請求項28】

前記ATP蛍光センサータンパク質は固体支持体に不動化される請求項27に記載の蛍光組成物。

40

【請求項29】

前記ATP蛍光センサータンパク質は、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインの対の異なる少なくとも2種類のATP蛍光センサータンパク質である請求項28に記載の蛍光組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リガンド蛍光センサータンパク質とその使用に関する。

本願は、2015年12月4日に、日本に出願された特願2015-237524号、及び2016年5月24日に、米国に仮出願された米国特許第62/340,533号明

50

細書に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

蛍光生体イメージングとは、生きた組織又は臓器の内部を観察し、そこで生きた細胞及び分子の動態をリアルタイムで解析する新しい研究手法である。近年の光学機器及び蛍光イメージングの技術革新により、様々な組織又は臓器における、多種多様な生命現象に蛍光生体イメージングを適用することで、生きた細胞及び分子の動きを描出することが可能となってきた。

【0003】

蛍光生体イメージングにおいて、細胞内に存在する分子（リガンド）が特異的に結合するレセプターを用いることで、生きた組織又は臓器内のリガンドの動きを検出することができる。

具体的には、レセプターとして、例えば、生体内の分子に特異的に結合する抗体若しくは生体内に存在する抗体に対する抗原、特定の酵素に対する基質若しくは特定の基質に対する酵素、又はATP、cAMP、若しくはcGMP等の生体内の分子の結合ドメイン等を備える蛍光センサータンパク質を用いることで、細胞内のリガンドの濃度分布や時間変化（時空間ダイナミクス）を可視化解析できる。

【0004】

蛍光センサータンパク質は、単色型、レシオ型、及びFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）型に大きく分類される。単色型は、各蛍光センサータンパク質について特定される単一波長での蛍光強度がリガンド濃度に応じて変化するタイプである。レシオ型は、各蛍光センサータンパク質ごとに特定される2つの波長での蛍光強度の相対比がリガンド濃度に応じて変化するタイプである。FRET型は、異なる2個の蛍光タンパク質断片を含む融合タンパク質のうち一方の断片が励起状態にあるとき、リガンド濃度に応じて他方の断片との距離が近接すると、励起状態の断片からエネルギーが他方の断片に無放射遷移するフェルスター共鳴エネルギー移動（Forster resonance energy transfer）現象を利用して、リガンド濃度に応じて前者の断片の蛍光強度と後者の断片の蛍光強度との相対比が変化するタイプである。

例えば、現在まで、単色型（例えば、非特許文献1参照）、FRET型（例えば、非特許文献2参照）、及びレシオ型（例えば、非特許文献3、4参照）のATP蛍光センサータンパク質が報告されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Kato-Yamada, Y., "Isolated epsilon subunit of Bacillus subtilis F1-ATPase binds ATP", FEBS Lett., vol.579, no.30, p6875-6878, 2005.

【非特許文献2】Yaginuma H., et al., "Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging", Sci Rep., 4:6522, 2014.

【非特許文献3】Tantama M., et al., "Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio", Nat Commun., 4:2550, 2013.

【非特許文献4】Imamura H., et al., "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators", PNAS, vol.106, no.37, p15651-15656, 2009.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、従来の蛍光センサータンパク質には、いくつかの問題点がある。まず、FRETやレシオ型のセンサーによる解析には、高価な専用の顕微鏡が必要である。また

、蛍光検出に広範囲の蛍光波長域を使用するため、多色解析に適さない。つまり、多種のリガンドの動態を同時に解析できない。さらに、異なる細胞小器官のリガンドの動態を同時に可視化して解析することは不可能である。

【 0 0 0 7 】

これに対し、1波長で励起して1波長の蛍光を観察する単色型の蛍光タンパク質を基にした蛍光センサーはこれらの問題点を克服できる可能性がある。しかし、これまでに報告された単色型センサー（例えば、非特許文献1参照。）は、ダイナミックレンジ、すなわち、ATPの有無による蛍光強度の変化が最大で8%弱しかなく、細胞内のATPセンサーとして実用的に使うレベルには到底達していなかった。その後、当該報告よりダイナミックレンジの高い単色型のATP蛍光タンパク質センサーは報告がない。

10

また、ATPに限定されず、所望のリガンドを検出可能なダイナミックレンジの高い単色型の蛍光タンパク質センサーは報告がない。

【 0 0 0 8 】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、検出するリガンドの種類を選ばず、高感度なリガンド蛍光センサータンパク質を提供する。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[ 1 ] リガンドに特異的に応答して蛍光特性が変化するリガンド蛍光センサータンパク質であって、前記リガンド蛍光センサータンパク質は、第1の蛍光タンパク質ドメインと、N末端側リンカーと、リガンド結合ドメインと、C末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインとを含み、前記リガンド蛍光センサータンパク質に用いられる蛍光タンパク質が、平行構造を有するものであり、前記第1の蛍光タンパク質ドメインが前記蛍光タンパク質のN末端から1～3のシート領域と、これに続くヘリックス領域と、4～6のシート領域とを含み、前記第2の蛍光タンパク質ドメインが前記第1の蛍光タンパク質ドメインと同一の前記蛍光タンパク質の7～11のシート領域を含み、前記N末端側リンカー及び前記C末端側リンカーは、それぞれ独立して1個又は数個のアミノ酸からなるポリペプチドであることを特徴とするリガンド蛍光センサータンパク質。

20

[ 2 ] 前記蛍光タンパク質がBFP、GFP、Citrine、又はmAppleである

30

[ 1 ] に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[ 3 ] 前記リガンド蛍光センサータンパク質は、N末端からC末端に向かって、第1の蛍光タンパク質ドメインと、N末端側リンカーと、リガンド結合ドメインと、C末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインとが、直接この順番にペプチド結合で連結してなるポリペプチドを含む [ 1 ] 又は [ 2 ] に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[ 4 ] 前記リガンド蛍光センサータンパク質は、2つのリガンド結合ドメインを含み、N末端からC末端に向かって、第1のリガンド結合ドメインと、N末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインと、第1の蛍光タンパク質ドメインと、C末端側リンカーと、第2のリガンド結合ドメインと、が、直接この順番にペプチド結合で連結してなるポリペプチドを含む [ 1 ] 又は [ 2 ] に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[ 5 ] 前記第1の蛍光タンパク質ドメインは、以下の(B1)～(B3)のいずれかのポリペプチドを含み、前記第2の蛍光タンパク質ドメインは、以下の(C1)～(C3)のいずれかのポリペプチドを含み、前記第1の蛍光タンパク質ドメインと第2の蛍光タンパク質ドメインとが同一の蛍光タンパク質に由来する [ 1 ] 又は [ 2 ] に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

40

( B 1 ) 配列番号 1、3、5、又は7で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

( B 2 ) 配列番号 1、3、5、又は7で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記第2の蛍光タンパク質ドメインと平行構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド、

( B 3 ) 配列番号 1、3、5、又は7で表されるアミノ酸配列と同一性が80%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記第2の蛍光タンパク質ドメインと平行構造を形

50

成し、蛍光を発するポリペプチド、

(C1) 配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(C2) 配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記第1の蛍光タンパク質ドメインとバレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド、

(C3) 配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列と同一性が80%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記第1の蛍光タンパク質ドメインとバレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド

[6] 前記リガンドが、ヌクレオチド若しくはその誘導体、核酸、糖鎖、タンパク質、脂質複合体、又は低分子化合物である[1]~[5]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[7] 前記ヌクレオチド若しくはその誘導体が、ATP、cAMP、又はcGMPである[6]に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[8] 前記タンパク質が抗原又は抗体である[6]に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[9] 以下の(D1)~(D3)のいずれかのポリペプチドを含む[1]~[8]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

(D1) 配列番号9~14のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(D2) 配列番号9~14のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記ポリペプチド(D1)と同一の、リガンドへの結合能及び蛍光特性を有するポリペプチド、

(D3) 配列番号9~14のいずれかで表されるアミノ酸配列と同一性が80%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記ポリペプチド(D1)と同一の、リガンドへの結合能及び蛍光特性を有するポリペプチド

[10] さらに、オルガネラ局在化シグナルペプチドを含む[1]~[9]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[11] 前記オルガネラ局在化シグナルペプチドがミトコンドリア局在化シグナルペプチドである[10]に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[12] 前記オルガネラ局在化シグナルペプチドが核局在化シグナルペプチドである[10]に記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[13] さらに、細胞膜透過性ペプチドを含む[1]~[12]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質。

[14] [1]~[13]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質をコードすることを特徴とするポリヌクレオチド。

[15] [14]に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする発現ベクター。

[16] [1]~[13]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質を少なくとも1種類含むことを特徴とする細胞。

[17] [1]~[13]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを少なくとも1種類含む染色体を有することを特徴とする細胞。

[18] [15]に記載の発現ベクターを少なくとも1種類含むことを特徴とする細胞。

[19] [16]~[18]のいずれか一つに記載の細胞を含むことを特徴とする非ヒト生物。

[20] [1]~[13]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質、[14]に記載のポリヌクレオチド、[15]に記載の発現ベクター、[16]~[18]のいずれか一つに記載の細胞、及び[19]に記載の非ヒト生物からなる群から選ばれる少なくとも一つを含むことを特徴とするリガンド濃度測定用キット。

[21] [1]~[13]のいずれか一つに記載のリガンド蛍光センサータンパク質と、既知の濃度のリガンドを含む標準溶液と接触させて、蛍光強度を測定し、検量線を作成する検量線作成工程と、

10

20

30

40

50



前記リガンド蛍光センサータンパク質と、未知の濃度のリガンドを含む溶液と接触させて、蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、

前記検量線作成工程において、作成された検量線に基づいて、前記蛍光測定工程において測定された蛍光強度に対するリガンド濃度を決定する濃度決定工程と、  
を備えることを特徴とする被検試料中のリガンド濃度の決定方法。

[ 2 2 ] [ 1 6 ] ~ [ 1 8 ] のいずれか一つに記載の細胞を用いて、経時的な蛍光強度を測定する工程を備えることを特徴とする生細胞におけるリガンド濃度の経時変化の検知方法。

[ 2 3 ] [ 1 9 ] に記載の非ヒト生物を用いて、経時的な蛍光強度を測定する工程を備えることを特徴とする生きた非ヒト生物におけるリガンド濃度の経時変化の検知方法。

[ 2 4 ] A T P 濃度に特異的に応答して蛍光特性が変化する A T P 蛍光センサータンパク質であって、該 A T P 蛍光センサータンパク質は、N 末端から C 末端に向けて、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと、N 末端側リンカーと、A T P 結合ドメインと、C 末端側リンカーと、第 2 の蛍光タンパク質ドメインとが、直接この順にペプチド結合で連結したポリペプチドを含み、該ポリペプチドは、第 1 の蛍光タンパク質ドメインは、蛍光タンパク質 B F P、C i t r i n e 又は m A p p l e の N 末端から、1 ~ 3 のシート領域と、これに続くヘリックス領域と、4 ~ 6 のシート領域とを含み、第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと同一の蛍光タンパク質の 7 ~ 1 1 のシート領域を含み、A T P 結合ドメインは F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-A T P 合成酵素のサブユニットからなり、N 末端側リンカー及び C 末端側リンカーは、それぞれ、1 個又は数個のアミノ酸からなるポリペプチドであることを特徴とする A T P 蛍光センサータンパク質。

[ 2 5 ] ( A 1 1 ) A T P 結合ドメインは配列番号 1 5 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 1 及び 2 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号 1 6 及び 1 7 のアミノ酸配列である、M a l i o n B ポリペプチドと、

( A 1 2 ) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質ドメイン、N 末端側のリンカー、及び C 末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号 1 5、1、2、1 6、及び 1 7 のアミノ酸配列か、配列番号 1 5、1、2、1 6、及び 1 7 のアミノ酸配列に 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、M a l i o n B ポリペプチド ( A 1 1 ) と同一の A T P 結合能及び蛍光特性を有する、M a l i o n B ポリペプチドと、

( B 1 1 ) A T P 結合ドメインは配列番号 1 5 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 5 及び 6 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、W R G ( T r p - A r g - G l y ) 及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列である、M a l i o n G ポリペプチドと、

( B 1 2 ) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質ドメイン、N 末端側のリンカー及び C 末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号 1 5、5、6、W R G ( T r p - A r g - G l y )、及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列か、配列番号 1 5、5、6、W R G ( T r p - A r g - G l y )、及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列に 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、M a l i o n G ポリペプチド ( B 1 1 ) と同一の A T P 結合能及び蛍光特性を有する、M a l i o n G ポリペプチドと、

( C 1 1 ) A T P 結合ドメインは配列番号 1 5 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 7 及び 8 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号 1 9 及び P E E ( P r o - G l u - G l u ) のアミノ酸配列である、M a l i o n R ポリペプチドと、

( C 1 2 ) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質ドメイン、N 末端側のリンカー及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号 1 5、7、8、1 9、及び P E E ( P r o - G l u - G l u ) のアミノ酸配列か、配列番号 1 5、7、8、1 9、及び P E E ( P r o - G l u - G l u ) のアミノ酸配列に 1 個若しくは数

10

20

30

40

50

個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、MaLi on Rポリペプチド(C11)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Rポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む[24]に記載のATP蛍光センサータンパク質。

[26](A21)配列番号9のアミノ酸配列からなる、MaLi on Bポリペプチドと、

(A22)配列番号9のアミノ酸配列のうち、配列番号16及び17のアミノ酸配列を除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLi on Bポリペプチド(A21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Bポリペプチドと、

(B21)配列番号10のアミノ酸配列からなる、MaLi on Gポリペプチドと、

(B22)配列番号10のアミノ酸配列のうち、配列番号10の第146-148位のWRG(Trp-Arg-Gly)のアミノ酸配列と、配列番号18のアミノ酸配列とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLi on Gポリペプチド(B21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Gポリペプチドと、

(C21)配列番号11のアミノ酸配列からなる、MaLi on Rポリペプチドと、

(C22)配列番号11のアミノ酸配列のうち、配列番号11の第288-290位のPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列と、配列番号19のアミノ酸配列とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLi on Rポリペプチド(C21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLi on Rポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む[24]又は[25]に記載のATP蛍光センサータンパク質。

[27][24]~[26]のいずれか一つに記載のATP蛍光センサータンパク質を含むことを特徴とする蛍光組成物。

[28]前記ATP蛍光センサータンパク質は固体支持体に不動化される、[27]に記載の蛍光組成物。

[29]前記ATP蛍光センサータンパク質は、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインの対の異なる少なくとも2種類のATP蛍光センサータンパク質である[28]に記載の蛍光組成物。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、検出するリガンドの種類を選ばず、高感度なりガンド蛍光センサータンパク質を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】実施例1におけるMaLi on BシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質19個の10mMのATPの存在下での蛍光強度とATP非存在下での蛍光強度の比(以下、「ダイナミックレンジ」と称する場合がある。)のヒストグラム。

【図1B】実施例1におけるMaLi on GシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質27個のダイナミックレンジのヒストグラム。

【図1C】実施例1におけるMaLi on RシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質47個のF/F<sub>0</sub>のヒストグラム。

【図2A】実施例2における10mMのATP存在下及び非存在下でのMaLi on B、G及びRの励起スペクトル図。

【図2B】実施例2における10mMのATP存在下及び非存在下でのMaLi on B、G及びRの蛍光スペクトル図。

【図2C】実施例2における10mMのATP存在下及び非存在下でのnegMaLi on B、G及びRの蛍光スペクトル図。

10

20

30

40

50

【図3A】実施例2におけるMaLi on B、G及びRの蛍光強度のATP濃度依存的変化を示すグラフ。

【図3B】実施例2におけるMaLi on B、G及びRの蛍光強度のリガンド特異性を示すグラフ。

【図4A】実施例2におけるMaLi on BのATP存在下又はATP非存在下での蛍光強度と、ダイナミックレンジとのpH依存的変化を示すグラフ。

【図4B】実施例2におけるMaLi on GのATP存在下又はATP非存在下での蛍光強度と、ダイナミックレンジとのpH依存的変化を示すグラフ。

【図4C】実施例2におけるMaLi on RのATP存在下又はATP非存在下での蛍光強度と、ダイナミックレンジとのpH依存的変化を示すグラフ。

【図5A】実施例4におけるMaLi on Gを発現させたHeLa細胞に解糖系ATP産生を阻害するNaFを投与後の蛍光の変化を示すグラフ。

【図5B】実施例4におけるMaLi on Rを発現させたHeLa細胞に解糖系ATP産生を阻害するNaFを投与後の蛍光の変化を示すグラフ。

【図5C】実施例4におけるMaLi on Bを発現させたHeLa細胞に解糖系ATP産生を阻害するNaFを投与後の蛍光の変化を示すグラフ。

【図5D】実施例4におけるnegMaLi on Gを発現させたHeLa細胞に解糖系ATP産生を阻害するNaFを投与後の蛍光の変化を示すグラフ。

【図5E】実施例4におけるnegMaLi on Rを発現させたHeLa細胞に解糖系ATP産生を阻害するNaFを投与後の蛍光の変化を示すグラフ。

【図5F】実施例4におけるnegMaLi on Bを発現させたHeLa細胞に解糖系ATP産生を阻害するNaFを投与後の蛍光の変化を示すグラフ。

【図5G】実施例4におけるMaLi on G、R及びBと、negMaLi on G、R及びBとについて、HeLa細胞で発現させた各蛍光タンパク質の蛍光測定開始から25分後の正規化した蛍光強度の平均値及び標準偏差を示す棒グラフ。

【図6】実施例4におけるMaLi on Gの発現ベクターと、mito-MaLi on Rの発現ベクターとをHeLa細胞に同時にトランスフェクションした後、2種類の異なるATP蛍光センサータンパク質に対応する2つの波長における同一視野での蛍光顕微鏡画像撮影開始から3分後にオリゴマイシンを投与し、その後の蛍光の変化を示したグラフ。

【図7A】実施例4における同一視野の分化したWT-1細胞のB-GECO( $Ca^{2+}$ イオン、青色)、Flamindo2(cAMP、緑色)及びmito-MaLi on R(ATP、赤色)の蛍光顕微鏡画像。各コマの左上の数字は観察開始後の時間(分)を表す。矢印は1 $\mu$ Mのイソプレテノールを添加したのが1コマ目と2コマ目との間(観察開始5分後)であることを表す。矢印は1 $\mu$ Mのイソプレテノールを添加したのが1コマ目と2コマ目との間(観察開始5分後)であることを表す。

【図7B】実施例4における同一視野の分化したWT-1細胞のB-GECO( $Ca^{2+}$ イオン、青色)、Flamindo2(cAMP、緑色)及びmito-MaLi on R(ATP、赤色)の正規化された蛍光強度の経時的変化を示すグラフ。矢印は1 $\mu$ Mのイソプレテノールを添加したのが観察開始5分後であることを表す。

【図8A】実施例4における線虫咽頭筋の細胞質及びミトコンドリアのATP濃度の経時的変化の同時測定結果を示すグラフ。矢印は、麻酔剤として0.5%の1-フェノキシ-2-プロパノールを含むM9バッファーを観察開始5分後に投与したことを表す。

【図8B】実施例4における線虫咽頭筋の細胞質及びミトコンドリアのATP濃度の経時的変化の同時測定結果を示すグラフ。矢印は、対照実験のM9バッファーを観察開始5分後に投与したことを表す。

【図9A】実施例5における100 $\mu$ MのcGMP存在下及び非存在下でのcGullの蛍光スペクトル図。

【図9B】実施例5におけるcGullを発現させたHeLa細胞に8-Br-cGMP(1mM)又は一酸化窒素供与体であるSNAP(300 $\mu$ M)を投与での蛍光顕微鏡画

10

20

30

40

50

像撮影開始から20分後までの蛍光の変化を示す画像。

【図9C】実施例5におけるcGul1を発現させたHeLa細胞に8-Br-cGMP(1mM)又は一酸化窒素供与体であるSNAP(300 $\mu$ M)を投与での蛍光顕微鏡画像撮影開始から20分後までの蛍光の変化を示すグラフ。

【図10A】実施例6における100 $\mu$ MのcAMP存在下及び非存在下でのPink Flamingoの蛍光スペクトル図。

【図10B】実施例6におけるPink Flamingoを発現させたHeLa細胞にアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるForskolin(100 $\mu$ M)又はホスホジエステラーゼ阻害剤であるIBMX(500 $\mu$ M)を投与での蛍光顕微鏡画像撮影開始から20分後までの蛍光の変化を示す画像。

【図10C】実施例6におけるPink Flamingoを発現させたHeLa細胞にアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるForskolin(100 $\mu$ M)又はホスホジエステラーゼ阻害剤であるIBMX(500 $\mu$ M)を投与での蛍光顕微鏡画像撮影開始から20分後までの蛍光の変化を示すグラフ。

【図11A】実施例7における100 $\mu$ MのBGP7C存在下及び非存在下でのgBGPの励起/蛍光スペクトル図。

【図11B】実施例7におけるgBGPの蛍光強度のリガンド特異性及びBGP7C濃度依存的変化を示すグラフ。

【図11C】実施例7におけるgBGP又はGFP、及び細胞膜局在性PMmCherry-BGP7C又は細胞膜局在性PMmCherryを発現させたHeLa細胞での蛍光を示す画像。

【図11D】実施例7におけるgBGP又はGFP、及び核局在性NLmCherry-BGP7C又は核局在性NLmCherryを発現させたHeLa細胞での蛍光を示す画像。

【図12】実施例8における2 $\mu$ MのHSA存在下及び非存在下でのgHSAの蛍光スペクトル図。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除および置換を行うことができる。

【0013】

本明細書において「タンパク質」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」又は「ポリペプチド」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合で連結した化合物である。「タンパク質」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」又は「ポリペプチド」は、アミド基、メチル基を含むアルキル基、リン酸基、糖鎖、及び/又は、エステル結合その他の共有結合による修飾を含む場合がある。また、「タンパク質」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」又は「ポリペプチド」は、金属イオン、補酵素、アロステリックリガンドその他の原子、イオン、原子団か、他の「タンパク質」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」又は「ポリペプチド」か、糖、脂質、核酸等の生体高分子か、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリビニル、ポリエステルその他の合成高分子かを共有結合又は非共有結合により結合又は会合している場合がある。

【0014】

本発明において、ある特定のアミノ酸配列に「1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列」とは、n以下の個数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列をいう。ここでnは、当該特定のアミノ酸配列の全アミノ酸の数の10%を超えない整数である。すなわち、ある特定のアミノ酸配列に1個以上n個以下のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列をいう。同様に、本発明のいずれかのドメインのN末端又はC末端が、ある特定のタンパク質又はタンパク質ドメインのN末端又はC末端に「さらに1個~数個のアミノ酸がペプチド結合で追加して連結される」とは、当

10

20

30

40

50

該本発明のいずれかのドメインのN末端又はC末端は、当該特定のタンパク質又はタンパク質ドメインのN末端又はC末端に1個以上n個以下のアミノ酸がペプチド結合で追加して連結されることをいう。また本発明のいずれかのドメインのN末端又はC末端が、ある特定のタンパク質又はタンパク質ドメインのN末端又はC末端から「1個～数個目のアミノ酸残基」であるとは、当該本発明のいずれかのドメインのN末端又はC末端は、当該特定のタンパク質又はタンパク質ドメインのN末端又はC末端から1個目以上n個目以下のアミノ酸残基であることをいう。

**【0015】**

## リガンド蛍光センサータンパク質

一実施形態において、本発明は、リガンドに特異的に応答して蛍光特性が変化するリガンド蛍光センサータンパク質であって、前記リガンド蛍光センサータンパク質は、第1の蛍光タンパク質ドメインと、N末端側リンカーと、リガンド結合ドメインと、C末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインとを含み、前記リガンド蛍光センサータンパク質に用いられる蛍光タンパク質がバレル構造を有するものであり、前記第1の蛍光タンパク質ドメインが前記蛍光タンパク質のN末端から1～3のシート領域と、これに続くヘリックス領域と、4～6のシート領域とを含み、前記第2の蛍光タンパク質ドメインが前記第1の蛍光タンパク質ドメインと同一の前記蛍光タンパク質の7～11のシート領域を含み、前記N末端側リンカー及び前記C末端側リンカーは、それぞれ独立して1個又は数個のアミノ酸からなるポリペプチドであるリガンド蛍光センサータンパク質を提供する。

10

20

**【0016】**

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質によれば、検出するリガンドの種類を選ばず、高感度にリガンドを検出することができる。

**【0017】**

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質は、リガンドの濃度の特異的に応答して蛍光特性が変化する。該蛍光特性は、蛍光強度を含むが、これに限られない。蛍光強度は、蛍光顕微鏡、蛍光顕微分光光度計等の蛍光光学機器を用いて、所定の励起光源からの光のスペクトルを励起光フィルターにより一定の波長帯域に制限して、本発明のリガンド蛍光センサータンパク質又はリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質を含む生物試料に照射し、その蛍光を蛍光フィルターにより一定の波長帯域の制限して冷却CCDカメラで撮像し、得られた画像のうち特定の視野又はその一部の領域の画素の輝度値を基に定量的に表される。

30

**【0018】**

## (リガンド)

なお、本明細書における「リガンド」とは、特定の受容体(レセプター)に特異的に結合する物質を意味する。リガンドとして具体的には、例えば、ヌクレオチド若しくはその誘導体、核酸、糖鎖、タンパク質、脂質複合体、低分子化合物等が挙げられ、これらに限定されない。

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質は、上述した特定のリガンドに対するレセプターを備えることで、高感度に生体内におけるリガンド濃度の分布や時間変化を簡便に検出することができる。

40

**【0019】**

前記ヌクレオチド若しくはその誘導体としては、例えば、アデノシン三リン酸(ATP)、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン一リン酸(AMP)、環状AMP(cAMP)、グアノシン三リン酸(GTP)、グアノシン二リン酸(GDP)、グアノシン一リン酸(GMP)、環状GMP(cGMP)等が挙げられ、これらに限定されない。中でも、ヌクレオチド若しくはその誘導体としては、ATP、cAMP、及びcGMPであることが好ましい。

**【0020】**

ATPは、化学反応、輸送や筋収縮のエネルギー源になり、またシグナル伝達等の役割

50

を担い、生命システムの維持に広範に関与している。ATP産生が低下する、又はATPが消費されずに過剰になると、細胞はそのエネルギーバランスを失い、疾患が起る。

また、cAMPは、グルカゴンやアドレナリンといったホルモン伝達の際の細胞内シグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている。

また、cGMPは、イオンチャネルの伝導性、グリコーゲン分解、細胞のアポトーシスなどを調整している。また、平滑筋の弛緩にも関わっている。その他に目の光情報伝達においてセカンドメッセンジャーの役割を果たしている。

よって、本実施形態において、リガンドがATP、cAMP、又はcGMPであるリガンド蛍光センサータンパク質（すなわち、ATP蛍光センサータンパク質、cAMP蛍光センサータンパク質、又はcGMP蛍光センサータンパク質）を用いることで、細胞内の各種リガンドの濃度分布や時間変化（時空間ダイナミクス）を可視化解析でき、各種生命現象や疾患発症機構の解明に応用できる。

10

#### 【0021】

前記タンパク質としては、例えば、抗原、抗体、酵素等が挙げられ、これらに限定されない。中でも、タンパク質としては、抗原、又は抗体であることが好ましい。

リガンドが各種生体分子である場合、レセプターとして特定の生体分子に対する抗体を用いることで、生体分子の種類を選ばず、生体内における当該生体分子の濃度分布や時間変化を簡便且つ正確に検出することができる。

また、リガンドが生体内に存在する抗体である場合、例えば、レセプターとして各種アレルギー物質を用いることで、ヒト又は非ヒト動物におけるアレルギー物質に対する抗体の存在を簡便且つ正確に検出することができる。

20

#### 【0022】

抗体は抗体断片も含む。抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、ダイアボディー、多特異性抗体、およびこれらの重合体等が挙げられる。

#### 【0023】

前記脂質複合体としては、例えば、リポタンパク質、DNA-脂質複合体等が挙げられ、これらに限定されない。

#### 【0024】

前記低分子化合物としては、例えば、水素イオン、カルシウム、塩素、酸素その他のイオン、グルコース、酸化還元物質等が挙げられ、これらに限定されない。

30

#### 【0025】

(構成)

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質に含まれるポリペプチドのドメイン及びリンカーの構成は以下のとおりである。まず、リガンドと特異的に結合するドメインを「リガンド結合ドメイン」という。挿入又は円順列変異により分断された無脊椎動物由来の蛍光タンパク質及び該蛍光タンパク質の改変体のアミノ末端側ドメイン及びカルボキシル末端側ドメインを、以下では、「第1の蛍光タンパク質ドメイン」及び「第2の蛍光タンパク質ドメイン」という。リガンド結合ドメイン又は第1の蛍光タンパク質ドメインのアミノ末端に連結するポリペプチドリンカーを「N末端側リンカー」といい、リガンド結合ドメイン又は第2の蛍光タンパク質ドメインのカルボキシル末端に連結するポリペプチドリンカーを「C末端側リンカー」という。

40

#### 【0026】

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質において、リガンド結合ドメインを1つ含んでいてもよく、2つ含んでいてもよい。

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質において、リガンド結合ドメインを1つ含む場合、N末端からC末端に向かって、第1の蛍光タンパク質ドメインと、N末端側リンカーと、リガンド結合ドメインと、C末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインとが、直接この順番にペプチド結合で連結してなるポリペプチドを含むことが好ましい。

#### 【0027】

50

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質において、リガンド結合ドメインを2つ含む場合、N末端からC末端に向かって、第1のリガンド結合ドメインと、N末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインと、第1の蛍光タンパク質ドメインと、C末端側リンカーと、第2のリガンド結合ドメインと、が、直接この順番にペプチド結合で連結してなるポリペプチドを含むことが好ましい。また、前記第2の蛍光タンパク質ドメインと前記第1の蛍光タンパク質ドメインとの間にさらにポリペプチドリンカーを有していてもよい。

例えば、リガンド結合ドメインが抗体である場合、分子構造が大きいことから、後述実施例に示すとおり、抗体の重鎖（第1のリガンド結合ドメイン）と軽鎖（第2のリガンド結合ドメイン）とを分けた構成とすることで、リガンド蛍光センサータンパク質内に置いて、当該抗体と蛍光タンパク質との間に立体障害が生じることを防ぐことができる。

#### 【0028】

##### ・蛍光タンパク質

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質は、無脊椎動物由来の蛍光タンパク質の改変体と、リガンド結合タンパク質のリガンド結合ドメインとに基づく人工改変体タンパク質である。無脊椎動物由来の蛍光タンパク質は、下村脩博士らによって発見されたヒドロ虫類に属するオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から単離された緑蛍光タンパク質や、造礁サンゴ *Discosoma sp.* から単離された赤蛍光タンパク質 *DsRed* を含むが、これらに限られない。

#### 【0029】

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質に用いる、無脊椎動物由来の蛍光タンパク質及び該蛍光タンパク質の改変体に含まれるポリペプチドは、典型的には11個のシート構造領域と1個のヘリックス構造領域とを含み、該ヘリックス構造領域はN末端から3個目と4個目のシート領域（以下、それぞれ、「3」及び「4」と称する場合がある。他のシートもこれらに準じて表記する。）の間に存在する。前記ポリペプチドがフォールディングすると、樽状の立体構造を形成する。すなわち、前記11個のシート構造領域はアンチパラレルに配向して樽の側面を形成し、前記ヘリックス構造領域は、樽の側面をなすシート構造領域が終わった前記樽の一方の端から樽の内部を貫いて反対側の端に伸びるポリペプチド部分であって、次のシート構造領域につながる。無脊椎動物由来の蛍光タンパク質及び該蛍光タンパク質の改変体の発色団は、前記ヘリックス領域の2個のアミノ酸残基と、前記ヘリックスを挟んで相対する2本のシート領域（4及び11）に含まれるそれぞれ1個のアミノ酸残基とで形成される。無脊椎動物由来の蛍光タンパク質及び該蛍光タンパク質の改変体がフォールディングして樽状の立体構造を形成するとき、前記の4個のアミノ酸残基は側鎖間で自発的に反応して多員環を形成し、蛍光を発生する発色団となる。無脊椎動物由来の蛍光タンパク質及び該蛍光タンパク質の改変体の発色団は、水分子その他の該蛍光タンパク質の外部環境から前記樽状の立体構造によって保護されるため、いつでも蛍光を発生することができる。また前記発色団は、水分子その他のタンパク質の外部環境から前記樽状の立体構造によって保護されるため、pHその他の外部環境の変化の影響を受けにくい。

#### 【0030】

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質に含まれるポリペプチドの第1の蛍光タンパク質ドメイン及び第2の蛍光タンパク質ドメインは、いずれかの無脊椎動物由来の特定の蛍光タンパク質又はその改変体のN末端側及びC末端側のポリペプチドを含む。本実施形態に用いられる蛍光タンパク質としては、例えば、BFP、GFP、Citrine、mApple等があげられ、これらに限定されない。BFP、GFP、Citrine、mAppleは、それぞれ、Wachter, R.ら (*Biochemistry* 2960, 9759-9765 (1997))、Chalfie, M.ら (*Science* 263(5148), 802-

10

20

30

40

50

805 (1994)、Griesbeck, O.ら、(J. Biol. Chem. 276, 29188-29194 (2001))、及びShaner, N. Cら(Nat. Methods 5, 545-551 (2008))に報告されている。なお、BFP及びmAppleは、Zhao, Y.ら(Science 333, 1888-1891 (2011))を参照して数カ所にアミノ酸置換変異を導入した(配列番号1、2、7及び8)。

#### 【0031】

典型的には、本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質に含まれる第1の蛍光タンパク質ドメインは、無脊椎動物由来の特定の蛍光タンパク質又はその改変体(例えば、BFP、GFP、Citrine又はmApple等)のN末端から、1~3のシート領域と、これに続くヘリックス領域と、4~6のシート領域とを含む。しかし、第1の蛍光タンパク質ドメインのN末端又はC末端にさらに1個~数個のアミノ酸がペプチド結合で追加して連結される場合もある。すなわち、第1の蛍光タンパク質ドメインのN末端は、無脊椎動物由来の特定の蛍光タンパク質又はその改変体(例えば、BFP、GFP、Citrine又はmApple等)のN末端の場合がある。また、該N末端にさらに1個~数個のアミノ酸がペプチド結合で追加して連結される場合がある。あるいは、第1の蛍光タンパク質ドメインのN末端は、無脊椎動物由来の特定の蛍光タンパク質又はその改変体(例えば、BFP、GFP、Citrine又はmApple等)のN末端から1個~数個目のアミノ酸残基の場合がある。

また、第1の蛍光タンパク質ドメインのC末端は、6と7との間のいずれかのアミノ酸残基の場合がある。あるいは、これにさらに1個~数個のアミノ酸がペプチド結合で追加して連結される場合もある。

#### 【0032】

典型的には、本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質に含まれる第2の蛍光タンパク質ドメインは、第1の蛍光タンパク質ドメインと同一の蛍光タンパク質の7~11のシート領域を含む。第2の蛍光タンパク質ドメインのN末端は前記7のN末端の場合がある。また、前記7のN末端にさらに1個~数個のアミノ酸がペプチド結合で追加して連結される場合もある。あるいは、第2の蛍光タンパク質ドメインのN末端は、前記7のN末端から1個~数個目のアミノ酸残基の場合がある。

また、第2の蛍光タンパク質ドメインのC末端は、無脊椎動物由来の特定の蛍光タンパク質又はその改変体(例えば、BFP、GFP、Citrine又はmApple等)のC末端の場合がある。あるいは、これにさらに1個~数個の追加のアミノ酸がペプチド結合で連結される場合もある。

#### 【0033】

第1の蛍光タンパク質ドメイン及び第2の蛍光タンパク質ドメインとして具体的には、例えば、以下の(B1)及び(C1)に示すポリペプチド等が挙げられる。

(B1) 配列番号1、3、5、又は7で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(C1) 配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

#### 【0034】

上記(B1)における配列番号1、3、5、又は7で表されるアミノ酸配列は、それぞれBFP、GFP、Citrine、又はmAppleの1~3のシート領域と、これに続くヘリックス領域と、4~6のシート領域とからなるアミノ酸配列である。

また、上記(C1)における配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列は、それぞれBFP、GFP、Citrine、又はmAppleの7~11のシート領域からなるアミノ酸配列である。

#### 【0035】

本実施形態における第1の蛍光タンパク質ドメイン及び第2の蛍光タンパク質ドメイン

10

20

30

40

50



は、前記 ( B 1 ) 及び ( C 1 ) のポリペプチドと、機能的に同等なポリペプチドとして、下記 ( B 2 ) 及び ( C 2 ) のポリペプチドを含有する。

( B 2 ) 配列番号 1、3、5、又は 7 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 2 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド、

( C 2 ) 配列番号 2、4、6、又は 8 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド。

#### 【 0 0 3 6 】

ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、1 ~ 15 個が好ましく、1 ~ 10 個がより好ましく、1 ~ 5 個が特に好ましい。

10

#### 【 0 0 3 7 】

本実施形態における第 1 の蛍光タンパク質ドメイン及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、前記 ( B 1 ) 及び ( C 1 ) のポリペプチドと、機能的に同等なポリペプチドとして、下記 ( B 3 ) 及び ( C 3 ) のポリペプチドを含有する。

( B 3 ) 配列番号 1、3、5、又は 7 で表されるアミノ酸配列と同一性が 80 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 2 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド、

( C 3 ) 配列番号 2、4、6、又は 8 で表されるアミノ酸配列と同一性が 80 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記第 1 の蛍光タンパク質ドメインと バレル構造を形成し、蛍光を発するポリペプチド。

20

#### 【 0 0 3 8 】

前記 ( B 1 ) 及び ( C 1 ) のポリペプチドと機能的に同等であるためには 80 % 以上の同一性を有する。係る同一性としては、85 % 以上が好ましく、90 % 以上がより好ましく、95 % 以上がさらに好ましく、98 % 以上が特に好ましく、99 % 以上が最も好ましい。

#### 【 0 0 3 9 】

蛍光タンパク質として、BFP、GFP、Citrine、又は mApple を用いるとき、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、「BFP - Nドメイン」及び「BFP - Cドメイン」、「GFP - Nドメイン」及び「GFP - Cドメイン」、「Citrine - Nドメイン」及び「Citrine - Cドメイン」、又は「mApple - Nドメイン」及び「mApple - Cドメイン」と称する場合がある。BFP - Nドメイン及び BFP - Cドメインのアミノ酸配列は配列番号 1 及び 2 として配列表に列挙する。GFP - Nドメイン及び GFP - Cドメインのアミノ酸配列は配列番号 3 及び 4 として配列表に列挙する。Citrine - Nドメイン及び Citrine - Cドメインのアミノ酸配列は配列番号 5 及び 6 として列挙する。mApple - Nドメイン及び mApple - Cドメインのアミノ酸配列は配列番号 7 及び 8 として列挙する。

30

#### 【 0 0 4 0 】

##### ・リガンド結合ドメイン

40

無脊椎動物由来の蛍光タンパク質及び該蛍光タンパク質の改変体を用いて、リガンドの濃度変化に応答して蛍光特性が変化する蛍光センサータンパク質を作成するためには、隣接する 2 個の シート構造領域を連結するポリペプチドに当該リガンドと結合する別のタンパク質のポリペプチドの一部 ( すなわち、リガンド結合ドメイン ) を挿入することが試みられる。これにより、前記物質の影響で蛍光タンパク質の樽状の立体構造が乱れるために蛍光特性が変化することが期待されるからである。

#### 【 0 0 4 1 】

リガンド結合ドメインとしては、特定のリガンドが特異的に結合可能なものであればよく、特別な限定はない。例えば、リガンドが ATP、cAMP、又は cGMP 等のヌクレオチド若しくはその誘導体である場合には、ATP、cAMP、又は cGMP 等のヌクレ

50

オチド若しくはその誘導体の公知の結合ドメインをリガンド結合ドメインとして用いればよい。また、例えば、リガンドが任意の生体分子である場合には、該生体分子に対する抗体をリガンド結合ドメインとして用いればよい。また、例えば、リガンドが抗体である場合には、抗原をリガンド結合ドメインとして用いればよい。また、例えば、リガンドが水素イオン、カルシウム、塩素、酸素その他のイオン、グルコース、酸化還元物質等の低分子化合物である場合には、前記低分子化合物のレセプター（受容体）（具体的には、リガンドがグルコースである場合、グルコース輸送体内のグルコース結合部位等）をリガンド結合ドメインとして用いればよい。

#### 【0042】

リガンド結合ドメインとしてより具体的には、例えば、リガンドがATPである場合、ATP結合ドメインとしては、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニット等が挙げられる。前記サブユニットは細菌の $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットであってもよく、枯草菌の $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットであってもよい。ATP結合ドメインのN末端は、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットのN末端であってもよい。あるいは、前記ATP結合ドメインのN末端は、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットのN末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。ATP結合ドメインのC末端は、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットのC末端であってもよい。あるいは、前記ATP結合ドメインのC末端は、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットのC末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。ATP結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列であってもよい。

10

20

#### 【0043】

また、例えば、リガンドがcAMPである場合、cAMP結合ドメインとしては、exchange factor directly activated by cAMP 1 (EPAC1)等が挙げられる。前記EPAC1はヒト由来のものであってもよく、非ヒト動物由来のものであってもよい。cAMP結合ドメインのN末端は、EPAC1のN末端であってもよい。あるいは、前記cAMP結合ドメインのN末端は、EPAC1のN末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。cAMP結合ドメインのC末端は、EPAC1のC末端であってもよい。あるいは、前記cAMP結合ドメインのC末端は、EPAC1のC末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。cAMP結合ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列であってもよい。

30

#### 【0044】

また、例えば、リガンドがcGMPである場合、cGMP結合ドメインとしては、Phosphodiesterase 5 (PDE5)等が挙げられる。前記PDE5はヒト由来のものであってもよく、非ヒト動物由来のものであってもよい。cGMP結合ドメインのN末端は、PDE5のN末端であってもよい。あるいは、前記cGMP結合ドメインのN末端は、PDE5のN末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。cGMP結合ドメインのC末端は、PDE5のC末端であってもよい。あるいは、前記cGMP結合ドメインのC末端は、PDE5のC末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。cGMP結合ドメインは、配列番号21のアミノ酸配列であってもよい。

40

#### 【0045】

また、例えば、リガンドがオステオカルシン (osteocalcin, bone Gla protein (BGP))である場合、BGP結合ドメインとしては、抗BGP抗体等が挙げられる。前記抗BGP抗体はヒト由来のものであってもよく、非ヒト動物由来のものであってもよい。BGP結合ドメインを2つ含む場合、第1のBGP結合ドメインのN末端は、抗BGP抗体の重鎖のN末端であってもよく、第2のBGP結合ドメインのN末端は、抗BGP抗体の軽鎖のN末端であってもよい。あるいは、前記第1のBGP結合ドメインのN末端は、抗BGP抗体の重鎖のN末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよく、前記第2のBGP結合ドメインのN末端は、抗BGP抗体の軽鎖のN末端から1個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。第1のBGP結合ドメインのC

50

末端は、抗 B G P 抗体の重鎖の C 末端であってもよく、第 2 の B G P 結合ドメインの N 末端は、抗 B G P 抗体の軽鎖の C 末端であってもよい。あるいは、前記第 1 の B G P 結合ドメインの C 末端は、抗 B G P 抗体の重鎖の C 末端から 1 個又は数個目のアミノ酸残基であってもよく、前記第 2 の B G P 結合ドメインの C 末端は、抗 B G P 抗体の軽鎖の C 末端から 1 個又は数個目のアミノ酸残基であってもよい。第 1 の B G P 結合ドメインは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列であってもよく、第 2 の B G P 結合ドメインは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列であってもよい。

#### 【 0 0 4 6 】

##### ・リンカー

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質に含まれるポリペプチドでは、リガンド結合ドメインが、その N 末端側及び C 末端側にそれぞれ 1 個～数個のアミノ酸からなるポリペプチドリinker（以下、それぞれ、「N 末端側リンカー」及び「C 末端側リンカー」と称する場合がある。）を介して第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインの間に挿入される。あるいは、第 2 及び第 1 の蛍光タンパク質ドメインが、その N 末端側リンカー及び C 末端側リンカーを介して第 1 及び第 2 のリガンド結合ドメインの間に挿入される。

N 末端側リンカー及び C 末端側リンカーのアミノ酸配列は、それぞれの本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質ごとに異なる。しかし、アミノ酸には、保存的置換が可能な場合がある。

#### 【 0 0 4 7 】

なお、本明細書において、「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することを意味する。アミノ酸残基はその側鎖によって、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパルギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は、好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

したがって、本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質の C 末端側リンカーのアミノ酸配列は、以下の実施例で特定されたアミノ酸配列と 1 個以上のアミノ酸が異なっている場合でも、同じリガンド結合能及び蛍光特性を示す場合があり、かかるアミノ酸配列も本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質の C 末端側リンカーのアミノ酸配列に含まれる。

#### 【 0 0 4 8 】

##### （好適なリガンド蛍光センサータンパク質）

本実施形態における A T P 蛍光センサータンパク質及び A T P 蛍光センサー陰性対照タンパク質のうち、B F P - N ドメイン及び B F P - C ドメインを第 1 の蛍光タンパク質ドメイン及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインとして用いるものを、「M a L i o n B シリーズ」という。

本実施形態における A T P 蛍光センサータンパク質及び A T P 蛍光センサー陰性対照タンパク質のうち、C i t r i n e - N ドメイン及び C i t r i n e - C ドメインを第 1 の蛍光タンパク質ドメイン及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインとして用いるものを、「M a L i o n G シリーズ」という。

本実施形態における A T P 蛍光センサータンパク質及び A T P 蛍光センサー陰性対照タンパク質のうち、m A p p l e - N ドメイン及び m A p p l e - C ドメインを第 1 の蛍光タンパク質ドメイン及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインとして用いるものを、「M a L i o n R シリーズ」という。

本実施形態における c G M P 蛍光センサータンパク質のうち、C i t r i n e - N ドメイン及び C i t r i n e - C ドメインを第 1 の蛍光タンパク質ドメイン及び第 2 の蛍光タ

10

20

30

40

50

ンパク質ドメインとして用いるものを、「cGullシリーズ」という。

本実施形態におけるcAMP蛍光センサータンパク質のうち、mApple-Nドメイン及びmApple-Cドメインを第1の蛍光タンパク質ドメイン及び第2の蛍光タンパク質ドメインとして用いるものを、「Pink Flamindoシリーズ」という。

本実施形態におけるBGP蛍光センサータンパク質のうち、GFP-Nドメイン及びGFP-Cドメインを第1の蛍光タンパク質ドメイン及び第2の蛍光タンパク質ドメインとして用いるものを、「gBGPシリーズ」という。

【0049】

以下の実施例で説明するとおり、本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質は、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインとして、BFP-Nドメイン及びBFP-Cドメインか、GFP-Nドメイン及びGFP-Cドメインか、Citrine-Nドメイン及びCitrine-Cドメインか、mApple-Nドメイン及びmApple-Cドメインかを用い、ATP結合ドメインとして枯草菌のF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素のサブユニットか、cGMP結合ドメインとしてPDE5か、cAMP結合ドメインとしてEPAC1か、BGP結合ドメインとして抗BGP抗体かを用い、N末端側リンカー及びC末端側リンカーとしてさまざまなポリペプチドの組み合わせを用いて、それぞれ、MaLion B、G及びRシリーズタンパク質、cGullシリーズタンパク質、Pink Flamindoシリーズタンパク質、並びにgBGPシリーズタンパク質の候補分子をエンコードするポリヌクレオチドを合成し、大腸菌発現ベクターに組み込んで、大腸菌で発現させ、それぞれの蛍光特性を解析して、リガンド存在下と、リガンド非存在下とでの蛍光強度の比(ダイナミックレンジ)に基づいて、最もダイナミックレンジの高い候補分子をMaLion B、G及びRシリーズ、cGullシリーズ、Pink Flamindoシリーズ、並びにBGP蛍光センサーシリーズのターン・オン型リガンド蛍光センサータンパク質(以下、それぞれ、「MaLion B」、「MaLion G」及び「MaLion R」、「cGull」、「Pink Flamindo」、並びに「gBGP」と称する場合がある。)として選択した。また、最もダイナミックレンジが1に近い候補分子をMaLion B、G及びRシリーズのATP蛍光センサー陰性対照タンパク質(それぞれ、「negMaLion B」、「negMaLion G」及び「negMaLion R」という。)として選択した。

【0050】

本明細書及び特許請求の範囲において参照する配列表の配列番号で特定されるアミノ酸配列と、本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質及びリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質、あるいは、これらのドメイン及びリンカーとの関係は以下の表に示すとおりである。

【0051】

【表1】

蛍光タンパク質ドメイン

配列番号	説明
1	BFP-Nドメイン
2	BFP-Cドメイン
3	GFP-Nドメイン
4	GFP-Cドメイン
5	Citrine-Nドメイン
6	Citrine-Cドメイン
7	mApple-Nドメイン
8	mApple-Cドメイン

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

【表 2】

## リガンド蛍光センサータンパク質

配列番号	説明
9	MaLi on B全長
10	MaLi on G全長
11	MaLi on R全長
24	negMaLi on B全長
25	negMaLi on G全長
26	negMaLi on R全長
12	cGu ll全長
13	Pi nk Flami ndo全長
14	gBGP全長

10

【 0 0 5 3 】

【表 3】

## リガンド結合ドメイン

配列番号	説明
15	枯草菌F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP合成酵素のεサブユニット
20	EPAC1
21	PDE5α
22	抗BGP抗体の重鎖
23	抗BGP抗体の軽鎖

20

【 0 0 5 4 】

【表 4】

## リンカー

配列番号	説明
16	MaLi on BのN末端側リンカー
17	MaLi on BのC末端側リンカー
	MaLi on GのN末端側リンカー WRG (Trp-Arg-Gly)
18	MaLi on GのC末端側リンカー
19	MaLi on RのN末端側リンカー
	MaLi on RのC末端側リンカー PEE (Pro-Glu-Glu)
27	negMaLi on BのN末端側リンカー
28	negMaLi on BのC末端側リンカー
	negMaLi on GのN末端側リンカー PRG (Pro-Arg-Gly)
29	negMaLi on GのC末端側リンカー
30	negMaLi on RのN末端側リンカー
	negMaLi on RのC末端側リンカー PEG (Pro-Glu-Gly)
31	cGul lのN末端側リンカー
32	cGul lのC末端側リンカー
33	Pink Flamin doのN末端側リンカー
34	Pink Flamin doのC末端側リンカー
35	gBGPのN末端側リンカー
36	gBGPのGFP-Cドメインと GFP-Nドメインとの間のリンカー
37	gBGPのC末端側リンカー

10

20

30

## 【0055】

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質として、より具体的には、例えば、以下の(D1)のポリペプチド等が挙げられる。

(D1) 配列番号9~14のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

## 【0056】

上記(D1)における配列番号9で表されるアミノ酸配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[BFP-Nドメイン]-[N末端側リンカー]-[ATP結合ドメイン]-[C末端側リンカー]-[BFP-Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリッカーが連結された構造である。

40

上記(D1)における配列番号10で表されるアミノ酸配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[Citrine-Nドメイン]-[N末端側リンカー]-[ATP結合ドメイン]-[C末端側リンカー]-[Citrine-Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリッカーが連結された構造である。

上記(D1)における配列番号11で表されるアミノ酸配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[mApple-Nドメイン]-[N末端側リンカー]-[ATP結合ドメイン]-[C末端側リンカー]-[mApple-Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリッカーが連結された構造である。

上記(D1)における配列番号12で表されるアミノ酸配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[Citrine-Nドメイン]-[N末端側リンカー]-[cG

50

MP結合ドメイン] - [C末端側リンカー] - [Citrine - Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリンカーが連結された構造である。

上記(D1)における配列番号13で表されるアミノ酸配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[mApple - Nドメイン] - [N末端側リンカー] - [cAMP結合ドメイン] - [C末端側リンカー] - [mApple - Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリンカーが連結された構造である。

上記(D1)における配列番号14で表されるアミノ酸配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[抗BGP抗体の重鎖] - [N末端側リンカー] - [GFP - Cドメイン] - [ペプチドリンカー] - [GFP - Nドメイン] - [C末端側リンカー] - [抗BGP抗体の軽鎖]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリンカーが連結された構造である。

10

#### 【0057】

本実施形態におけるリガンド蛍光センサータンパク質は、前記(D1)のポリペプチドと、機能的に同等なポリペプチドとして、下記(D2)のポリペプチドを含有する。

(D2)配列番号9~14のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、前記ポリペプチド(D1)と同一の、リガンドへの結合能及び蛍光特性を有するポリペプチド。

#### 【0058】

ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、1~15個が好ましく、1~10個がより好ましく、1~5個が特に好ましい。

20

#### 【0059】

本実施形態におけるリガンド蛍光センサータンパク質は、前記(D1)のポリペプチドと、機能的に同等なポリペプチドとして、下記(D3)のポリペプチドを含有する。

(D3)配列番号9~14のいずれかで表されるアミノ酸配列と同一性が80%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、前記ポリペプチド(D1)と同一の、リガンドへの結合能及び蛍光特性を有するポリペプチド。

#### 【0060】

前記(D1)のポリペプチドと機能的に同等であるためには80%以上の同一性を有する。係る同一性としては、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上がさらに好ましく、98%以上が特に好ましく、99%以上が最も好ましい。

30

#### 【0061】

(その他の構成)

##### ・細胞膜透過性ペプチド

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質又は本実施形態のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質は、細胞膜を透過して細胞内に到達するために、従来技術において周知である細胞膜透過ペプチド(参考文献: Zorko, M. 及び Langel, U., Adv. Drug Deliv. Rev. 57, p529-545, 2005.)を含んでいてもよい。細胞膜透過ペプチドとしては、例えば、配列番号38~41で表されるアミノ酸配列からなるペプチド等が挙げられ、これらに限定されない。

配列番号38で表されるアミノ酸配列は、HIV-1ウイルスタタンパク質の第48番目から第60番目までのアミノ酸配列である。

40

配列番号39で表されるアミノ酸配列は、ショウジョウバエAntennapediaタンパク質の第339番目から第354番目までのアミノ酸配列(penetratinの第43番目から第58番目までのアミノ酸配列)である。

配列番号40で表されるアミノ酸配列のペプチドのC末端がアミド化されたペプチドは、細胞膜を透過して細胞内に局在化できる。このアミノ酸配列はマウスVEカドヘリン前駆体タンパク質の第616番目から第633番目までのアミノ酸配列である。

また、配列番号41で表されるアミノ酸配列は、アルギニンの7量体ホモオリゴマーである。

#### 【0062】

50

・細胞膜局在化ペプチド

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質又は本実施形態のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質は、細胞膜上に局在化させるために、従来技術において周知である細胞膜局在化ペプチドを含んでいてもよい。

細胞膜局在化ペプチドとしては、例えば、配列番号42で表されるアミノ酸配列からなるペプチド等が挙げられ、これらに限定されない。

配列番号42で表されるアミノ酸配列は、Zuber, M.X.ら(Nature, vol.341, p345-348, 1989.)に報告されるヒト神経タンパク質GAP-43(Neuromodulin)由来の細胞膜局在化ペプチドの第1番目から第1番目までのアミノ酸配列である。

【0063】

・オルガネラ局在化シグナルペプチド

本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質又は本実施形態のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質は、特定のオルガネラに局在化させるために、従来技術において周知であるオルガネラ局在化シグナルペプチドを含んでいてもよい。前記オルガネラとしては、例えば、ミトコンドリア、核、核小体、小胞体、クロロプラスト、ペロキシゾーム、細菌ペリプラズム等が挙げられ、これらに限定されない。

【0064】

核局在化シグナルペプチドとしては、例えば、配列番号43で表されるアミノ酸配列からなるペプチド等が挙げられ、これらに限定されない。

配列番号43で表されるアミノ酸配列は、SV40ウイルスT抗原の第126番目から第132番目までのアミノ酸配列である(Lanford, R.E., et al., Cell, vol.46, p575-582, 1986.)。

【0065】

ミトコンドリア局在化シグナルペプチドとしては、例えば、配列番号44、45で表されるアミノ酸配列からなるペプチド等が挙げられ、これらに限定されない。

配列番号44で表されるアミノ酸配列は、ヒトシトクロムcオキシダーゼのサブユニットVII-肝臓/心臓型(8Aサブユニット又は8-2サブユニット)のアミノ酸配列の第2番目から第29番目までのアミノ酸配列である。

配列番号45で表されるアミノ酸配列は、ニワトリアスパラギン酸アミノ転移酵素の第2番目から24番目までのアミノ酸配列である(Jaussi, R. et al., J. Biol. Chem., vol.260, p16060-16063, 1985.)。

【0066】

小胞体(endoplasmic reticulum)局在化シグナルペプチドとしては、例えば、配列番号46、47で表されるアミノ酸配列からなるペプチド等が挙げられ、これらに限定されない。

配列番号46で表されるアミノ酸配列は、ヒト骨格筋筋小胞体高親和性カルシウム結合タンパク質カルレチキュリンのアミノ酸配列の第1番目から17番目までのアミノ酸配列である(Fliegel, L. et al., J. Biol. Chem., vol.264, no.36, p21522-21528, 1989.)。

配列番号47で表されるアミノ酸配列は、ラットgrp78タンパク質の小胞体膜局在化シグナルペプチドの第651番目から第654番目(C末端)のアミノ酸配列である(Munro, S.及びPelham H.R., Cell, vol.48, no.5, p899-907, 1987.)。

【0067】

中でも、本実施形態のリガンド蛍光センサータンパク質又は本実施形態のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質は、核局在化シグナルペプチド又はミトコンドリア局在化シグナルペプチドを含むことが好ましい。

【0068】

10

20

30

40

50



< A T P 蛍光センサータンパク質 >

一実施形態において、本発明は、A T P 濃度に特異的に応答して蛍光特性が変化する A T P 蛍光センサータンパク質であって、該 A T P 蛍光センサータンパク質は、N 末端から C 末端に向けて、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと、N 末端側リンカーと、A T P 結合ドメインと、C 末端側リンカーと、第 2 の蛍光タンパク質ドメインとが、直接この順にペプチド結合で連結したポリペプチドを含み、該ポリペプチドは、第 1 の蛍光タンパク質ドメインは、蛍光タンパク質 B F P、C i t r i n e 又は m A p p l e の N 末端から、1 ~ 3 のシート領域と、これに続くヘリックス領域と、4 ~ 6 のシート領域とを含み、第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、第 1 の蛍光タンパク質ドメインと同一の蛍光タンパク質の 7 ~ 11 のシート領域を含み、A T P 結合ドメインは F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-A T P 合成酵素のサブユニットからなり、N 末端側リンカー及び C 末端側リンカーは、それぞれ、1 個又は数個のアミノ酸からなるポリペプチドである A T P 蛍光センサータンパク質を提供する。

10

【0069】

本実施形態の A T P 蛍光センサータンパク質によれば、生理学的条件下で高濃度の A T P の存在下での蛍光強度と A T P 非存在下での蛍光強度の比が十分に高く、細胞の生理学的及び/又は病理学的な A T P 濃度の変動を検出することができる。また、励起波長及び発光波長が異なる本実施形態の A T P 蛍光センサータンパク質を複数種類用いることで、それぞれを同一細胞の異なるオルガネラに局在させ、あるいは、生物体内の異なる細胞に局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、該細胞又は生物の生理的及び/又は病理的变化に伴う A T P 濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析する技術を提供することができる。

20

【0070】

本実施形態の A T P 蛍光センサータンパク質において、ポリペプチドは、  
 (A 1 1) A T P 結合ドメインは配列番号 1 5 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 1 及び 2 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号 1 6 及び 1 7 のアミノ酸配列である、M a L i o n B ポリペプチドと、  
 (A 1 2) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質ドメイン、N 末端側のリンカー、及び C 末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号 1 5、1、2、1 6、及び 1 7 のアミノ酸配列か、配列番号 1 3、1、2、1 4、及び 1 5 のアミノ酸配列に 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、M a L i o n B ポリペプチド(A 1 1)と同一の A T P 結合能及び蛍光特性を有する、M a L i o n B ポリペプチドと、  
 (B 1 1) A T P 結合ドメインは配列番号 1 5 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 5 及び 6 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、W R G ( T r p - A r g - G l y ) 及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列である、M a L i o n G ポリペプチドと、  
 (B 1 2) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質ドメイン、N 末端側のリンカー及び C 末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号 1 5、5、6、W R G ( T r p - A r g - G l y )、及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列か、配列番号 1 5、5、6、W R G ( T r p - A r g - G l y )、及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列に 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、M a L i o n G ポリペプチド(B 1 1)と同一の A T P 結合能及び蛍光特性を有する、M a L i o n G ポリペプチドと、  
 (C 1 1) A T P 結合ドメインは配列番号 1 5 のアミノ酸配列であり、第 1 及び第 2 の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号 7 及び 8 のアミノ酸配列であり、N 末端及び C 末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号 1 9 及び P E E ( P r o - G l u - G l u ) のアミノ酸配列である、M a L i o n R ポリペプチドと、  
 (C 1 2) A T P 結合ドメイン、第 1 の蛍光タンパク質ドメイン、第 2 の蛍光タンパク質

30

40

50

ドメイン、N末端側のリンカー及びC末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号15、7、8、19、及びPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列か、配列番号15、7、8、19、及びPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、MaLion Rポリペプチド(C11)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLion Rポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含むことが好ましい。

#### 【0071】

本実施形態のATP蛍光センサータンパク質において、ポリペプチドは、

(A21) 配列番号9のアミノ酸配列からなる、MaLion Bポリペプチドと、

(A22) 配列番号9のアミノ酸配列のうち、配列番号16及び17のアミノ酸配列を除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLion Bポリペプチド(A21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLion Bポリペプチドと、

(B21) 配列番号10のアミノ酸配列からなる、MaLion Gポリペプチドと、

(B22) 配列番号10のアミノ酸配列のうち、配列番号10の第146-148位のWRG(Trp-Arg-Gly)のアミノ酸配列と、配列番号18のアミノ酸配列とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLion Gポリペプチド(B21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLion Gポリペプチドと、

(C21) 配列番号11のアミノ酸配列からなる、MaLion Rポリペプチドと、

(C22) 配列番号11のアミノ酸配列のうち、配列番号11の第288-290位のPEE(Pro-Glu-Glu)のアミノ酸配列と、配列番号19のアミノ酸配列とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、MaLion Rポリペプチド(C21)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、MaLion Rポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含むことがより好ましい。

#### 【0072】

本実施形態のATP蛍光センサータンパク質は、さらにオルガネラ局在化シグナルペプチドを含んでもよい。前記オルガネラ局在化シグナルペプチドとしては、上述の(その他の構成)において例示されたものと同様のものが挙げられる。中でも、オルガネラ局在化シグナルペプチドとしては、核局在化シグナルペプチド又はミトコンドリア局在化シグナルペプチドであることが好ましい。

本実施形態のATP蛍光センサータンパク質は、さらに細胞膜透過ペプチドを含んでもよい。

#### 【0073】

<ATP蛍光センサー陰性対照タンパク質>

一実施形態において、本発明は、ATP蛍光センサー陰性対照タンパク質negMaLion B、G及びRを提供する。

#### 【0074】

本実施形態のATP蛍光センサー陰性対照タンパク質は、N末端からC末端に向けて、第1の蛍光タンパク質ドメインと、N末端側リンカーと、ATP結合ドメインと、C末端側リンカーと、第2の蛍光タンパク質ドメインとが、直接この順にペプチド結合で連結したポリペプチドを含み、該ポリペプチドは、

(A31) ATP結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列であり、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号1及び2のアミノ酸配列であり、N末端及びC末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号27及び28のアミノ酸配列である、negMaLion Bポリペプチドと、

(A32) ATP結合ドメイン、第1の蛍光タンパク質ドメイン、第2の蛍光タンパク質ドメイン、N末端側のリンカー及びC末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号1

10

20

30

40

50

5、1、2、27、及び28のアミノ酸配列か、配列番号15、1、2、27、及び28のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、negMaLiOn Bポリペプチド(A31)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、negMaLiOn Bポリペプチドと、

(B31) ATP結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列であり、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号5及び6のアミノ酸配列であり、N末端及びC末端側のリンカーは、それぞれ、PRG(Pro-Arg-Gly)及び配列番号29のアミノ酸配列である、negMaLiOn Gポリペプチドと、

(B32) ATP結合ドメイン、第1の蛍光タンパク質ドメイン、第2の蛍光タンパク質ドメイン、N末端側のリンカー及びC末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号15、5、6、PRG(Pro-Arg-Gly)、及び配列番号29のアミノ酸配列か、配列番号15、5、6、PRG(Pro-Arg-Gly)、及び配列番号29のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、negMaLiOn Gポリペプチド(B31)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、ポリペプチドと、

(C31) ATP結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列であり、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインは、それぞれ、配列番号7及び8のアミノ酸配列であり、N末端及びC末端側のリンカーは、それぞれ、配列番号30及びPEG(Pro-Glu-Gly)のアミノ酸配列である、negMaLiOn Rポリペプチドと、

(C32) ATP結合ドメイン、第1の蛍光タンパク質ドメイン、第2の蛍光タンパク質ドメイン、N末端側のリンカー及びC末端側のリンカーは、それぞれ独立に、配列番号15、7、8、30、及びPEG(Pro-Glu-Gly)のアミノ酸配列か、配列番号15、7、8、30、及びPEG(Pro-Glu-Gly)のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列かであり、かつ、negMaLiOn Rポリペプチド(C31)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有する、ポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含むことが好ましい。

#### 【0075】

本実施形態のATP蛍光センサー陰性対照タンパク質は、

(A41) 配列番号24のアミノ酸配列からなる、negMaLiOn Bポリペプチドと、

(A42) 配列番号24のアミノ酸配列のうち、配列番号27及び28のアミノ酸配列を除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、negMaLiOn Bポリペプチド(A41)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有するポリペプチドと、

(B41) 配列番号25のアミノ酸配列からなるnegMaLiOn Gポリペプチドと、

(B42) 配列番号25のアミノ酸配列のうち、配列番号25の第146-148位のPRG(Pro-Arg-Gly)のアミノ酸配列と、配列番号29とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、negMaLiOn Gポリペプチド(B41)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有するnegMaLiOn Gポリペプチドと、

(C41) 配列番号26のアミノ酸配列からなるnegMaLiOn Rポリペプチドと、

(C42) 配列番号26のアミノ酸配列のうち、配列番号30のアミノ酸配列と、配列番号26の第288-290位のPEG(Pro-Glu-Gly)のアミノ酸配列とを除くアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、negMaLiOn Rポリペプチド(C41)と同一のATP結合能及び蛍光特性を有するポリペプチドとからなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含むことがより好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0076】

本実施形態のATP蛍光センサー陰性対照タンパク質は、さらにオルガネラ局在化シグナルペプチドを含んでいてもよい。前記オルガネラ局在化シグナルペプチドとしては、上述の(その他の構成)において例示されたものと同様のものが挙げられる。中でも、オルガネラ局在化シグナルペプチドとしては、核局在化シグナルペプチド又はミトコンドリア局在化シグナルペプチドであることが好ましい。

本実施形態のATP蛍光センサー陰性対照タンパク質は、さらに細胞膜透過ペプチドを含んでいてもよい。

## 【0077】

(用途)

・蛍光組成物

一実施形態において、本発明は、上述のATP蛍光センサータンパク質を含む蛍光組成物を提供する。

## 【0078】

本実施形態の蛍光組成物において、上述のATP蛍光センサータンパク質は固体支持体に不動化されていてもよい。

## 【0079】

前記固体支持体の形状としては、特別な限定はなく、例えば、平板状、球状等が挙げられる。

## 【0080】

固体支持体の材質としては、たとえば無機物質としてシリカ、アルミナ、ガラス、金属等が挙げられる。また、有機高分子物質として熱可塑性樹脂等が挙げられる。

## 【0081】

固体支持体として、より具体的には、担体(例えば、磁気担体、アフィニティーカラム精製用担体等)、細胞培養用基材、プレパレート、マイクロデバイス、膜等が挙げられる。細胞培養用基材としては、任意の数のウェルが配置されたマルチウェルプレート、シャーレ等が挙げられる。ウェルの数としては、プレート1枚当たり、たとえば、6、12、24、96、384、1,536個等が挙げられる。

## 【0082】

本実施形態の蛍光組成物において、上述のATP蛍光センサータンパク質は、第1及び第2の蛍光タンパク質ドメインの対の異なる少なくとも2種類の励起波長及び蛍光波長のATP蛍光センサータンパク質であってもよい。

後述の実施例に示すとおり、蛍光波長の異なる複数種類のATP蛍光センサータンパク質を用いることにより、該ATP蛍光センサータンパク質をそれぞれ異なるオルガネラに局在させ、あるいは、生物体内の異なる細胞に局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、該細胞又は生物の生理的及び/又は病理的变化に伴うATP濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析することができる。

## 【0083】

また、本実施形態の蛍光組成物の使用方法として、ATP蛍光センサータンパク質が容器の壁面に不動化されている場合に、ATPか、ATP Sのような非加水分解性のATP類縁体を含む溶液を注ぎ、これをブラックライトのようなわずかに眼で見える長波長の紫外線光源を励起光源として照射することができる。あるいは、ATP蛍光センサータンパク質を不動化したビーズのような固体支持体を、ATP又は非加水分解性のATP類縁体を含む溶液に懸濁して、容器又は流路を流すことができる。例えば、容器をシャンパンガラスの形状とし、該容器を複数層に積み上げておき、その頂上の容器に前記溶液を注ぐことにより、最上層の容器からあふれた溶液が直下の層の容器に注がれ、該直下の層の容器からあふれた溶液がさらに下の層の容器に注がれる、いわゆるシャンパンタワー又はトリクルダウン状態を、さまざまな角度及びタイミングの励起光源を照射することにより視覚的効果の高い蛍光照明を行うことができる。

10

20

30

40

50

## 【0084】

## ポリヌクレオチド

一実施形態において、本発明は、上述のリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

## 【0085】

前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号48又は49で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は、配列番号48又は49で表される塩基配列と80%以上、例えば85%以上、例えば90%以上、例えば95%以上の同一性を有し、リガンドへの結合能及び蛍光特性を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド等が挙げられる。なお、配列番号48又は49で表される塩基配列は、配列番号12又は13で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列である。

10

## 【0086】

本実施形態のポリヌクレオチドは、哺乳類、植物、及び/又は線虫における発現のためにコドン選択が最適化されていてもよい。

## 【0087】

なお、本明細書において、「哺乳類、植物、及び/又は線虫における発現のためにコドン選択が最適化され」とは、哺乳類、植物、及び/又は線虫でのコドン使用頻度及び/又はアミノアシルト-RNA分子種の細胞内濃度の生物種間相違に対応して、それぞれの生物種で最も翻訳効率が高いようにコドンが選択された、所望のタンパク質をエンコードするポリヌクレオチドの塩基配列を設計することを意味する。コドン選択の最適化は、例えば、Gustafsson, C.ら(Trends in biotechnology 22.7 (2004): 346-353)等を参照して実行することができる。

20

## 【0088】

## 発現ベクター

一実施形態において、本発明は、上述のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

## 【0089】

なお、本明細書における「発現ベクター」とは、所望のタンパク質を宿主細胞内で発現できるように、該タンパク質をエンコードするポリヌクレオチドと、該ポリヌクレオチドの転写、RNAスプライシング、RNAプロセッシング、RNA成熟、翻訳、翻訳後プロセッシングその他の機能に必要な、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター及びリボソーム結合部位を含むが、これらに限られない、核酸を含むベクターを意味する。

30

## 【0090】

## (発現ベクターの種類)

哺乳類における発現のための発現ベクターとしては特に制限されず、例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13等の大腸菌由来のプラスミド；pUB110、pTP5、pC194等の枯草菌由来のプラスミド；pSH19、pSH15等の酵母由来プラスミド；ファージ等のバクテリオファージ；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス等のウイルス；及びこれらを改変したベクター等を用いることができる。

40

線虫(C. elegans)における発現のための発現ベクターとしては特に制限されず、例えば、Okkema, P.G.及びAndrew F. (Development 120, 2175-2186 (1994))が報告するpOKベクター等を用いることができる。

植物における発現のための発現ベクターとしては特に制限されず、例えば、タバコモザイクウイルス、キュウリモザイクウイルス等のウイルス及びこれらを改変したベクター等を用いることができる。

## 【0091】

50

(発現ベクターの構成)

・哺乳類における発現のための発現ベクターの構成

哺乳類における発現のための発現ベクターは、例えば、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含んでいてもよい。

【0092】

本明細書において、「作動可能に連結」とは、遺伝子発現制御配列（例えば、プロモーター又は一連の転写因子結合部位）と発現させたい遺伝子（本実施形態においては、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチド）との間の機能的連結を意味する。ここで、「発現制御配列」とは、その発現させたい遺伝子（本実施形態においては、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチド）の転写を指向するものを意味する。

10

【0093】

前記プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、細胞の種類等に応じて適宜決定できる。プロモーターの具体例としては、例えば、ウイルス性プロモーター、発現誘導性プロモーター、組織特異的プロモーター、又はエンハンサー配列やプロモーター配列を融合させたプロモーター等が挙げられる。上記プロモーターは、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドの上流（5'側）に連結されていることが好ましい。

20

【0094】

本明細書において、「ウイルス性プロモーター」とは、ウイルス由来のプロモーターを意味する。由来となるウイルスとしては、例えば、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、シミアンウイルス、レトロウイルス等が挙げられる。

【0095】

本明細書において、「発現誘導性プロモーター」とは、化学薬剤、物理的ストレス等の特定の刺激を与えたときに発現させたい遺伝子（本実施形態においては、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチド）を発現することができ、刺激の非存在下では発現活性を示さないプロモーターを意味する。発現誘導性プロモーターとしては、例えば、TetO（テトラサイクリンオペレーター）プロモーター、メタロチオネイン（metallothionein）プロモーター、IPTG/lacIプロモーター系、エクジソンプロモーター系、及び翻訳又は転写についての阻害配列を不可逆的に欠失させるための「lox stop lox」系等が挙げられ、これらに限定されない。

30

【0096】

本明細書において、「組織特異的プロモーター」とは、特定の組織においてのみ活性を有するプロモーターを意味する。

【0097】

エンハンサー配列やプロモーター配列を融合させたプロモーターとしては、例えば、シミアンウイルス40（SV40）の初期遺伝子のプロモーターとヒトT細胞白血病ウイルス1のロング・ターミナル・リピートの一部の配列からなるSRプロモーター、サイトメガロウイルスの前初期（IE）遺伝子エンハンサーとニワトリ - アクチンプロモーターからなるCAGプロモーター等が挙げられる。特に、CAGプロモーターは、発現させたい遺伝子（本実施形態においては、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチド）の3'末端にウサギの - グロビン遺伝子のpolyA signalサイトを有することにより、発現させたい遺伝子（本実施形態においては、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチド）をほぼ全身で過剰発現させることができる。

40

【0098】

哺乳類における発現のための発現ベクターにおいて、さらに、例えば、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドの下流（3'側）に、mRNAの3

50

’末端のポリアデニル化に必要なポリアデニル化シグナルが作動可能に連結されていてもよい。ポリアデニル化シグナルとしては、上記のウイルス由来、各種ヒト又は非ヒト動物由来の各遺伝子に含まれるポリアデニル化シグナル、例えば、SV40の後期遺伝子又は初期遺伝子、ウサギ グロビン遺伝子、ウシ成長ホルモン遺伝子、ヒトA3アデノシン受容体遺伝子等のポリアデニル化シグナル等を挙げることができる。

【0099】

・植物における発現のための発現ベクターの構成

植物における発現のための発現ベクターには、例えば、カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター/エンハンサー、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子由来の5'非翻訳領域(翻訳エンハンサー領域)、及び/又は、熱ショックタンパク質遺伝子由来ターミネーター等を含んでいてもよい。

10

【0100】

・線虫における発現のための発現ベクターの構成

線虫における発現のための発現ベクターには、例えば、Myo2遺伝子由来のプロモーター等を含んでいてもよい。

【0101】

・その他発現ベクターの構成

プラスミドベクターには、例えば、pBluescriptベクターその他の大腸菌を宿主とするベクターを改変したものや、pcDNA3ベクターのように哺乳類で発現効率が高いCMVプロモーター等を含んでいてもよい。

20

【0102】

上述の発現ベクターは、さらに、例えば、マルチクロニングサイト、スプライシングシグナル、選択マーカー、複製起点等を有していてもよい。

前記選択マーカーとしては、例えば、薬剤選択マーカー遺伝子等が挙げられる。

薬剤選択マーカー遺伝子として、具体的には、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。薬剤選択マーカー遺伝子を挿入することにより、後述に示す本実施形態の発現ベクターが導入された細胞において、該薬物を含む培地を用いて細胞を培養することで、発現ベクターが導入された細胞を選択することができる。

【0103】

細胞

上述のリガンド蛍光センサータンパク質又は上述のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質の発現ベクターを細胞に導入することにより、上述のリガンド蛍光センサータンパク質又は上述のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質に含まれる細胞膜透過ペプチドの作用で、あるいは、前記タンパク質を細胞内に送達するための試薬により、前記タンパク質が一時的又は恒久的に存在する細胞を提供することができる。

30

【0104】

本実施形態における細胞の由来となる生物種としては、特別な限定はなく、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞(特に、哺乳動物細胞)等が挙げられ、これらに限定されない。

前記哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、マーモセット、サル等が挙げられ、これらに限定されない。

40

【0105】

動物細胞として具体的には、例えば、生殖細胞(精子、卵子等)、生体を構成する体細胞、幹細胞、前駆細胞、生体から分離されたがん細胞、生体から分離され不死化能を獲得して体外で安定して維持される細胞(細胞株)、生体から分離され人為的に遺伝子改変された細胞、生体から分離され人為的に核が交換された細胞等が挙げられ、これらに限定されない。

【0106】

<第一実施形態>

50

一実施形態において、本発明は、上述のリガンド蛍光センサータンパク質を少なくとも1種類含む細胞を提供する。

【0107】

本実施形態の細胞によれば、生細胞におけるリガンドの濃度の変動を検出することができる。また、励起波長及び発光波長が異なる上述のリガンド蛍光センサータンパク質を複数種類含む細胞を用いることで、それぞれを同一細胞の異なるオルガネラに局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、該細胞の生理的及び/又は病理的变化に伴う各種リガンド濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析する技術を提供することができる。

【0108】

(細胞の作製方法)

上述のリガンド蛍光センサータンパク質又は上述のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質を細胞内に導入するための方法としては、例えば、前記タンパク質を細胞内に送達するための試薬を用いる方法等が挙げられる。

前記試薬としては、例えば、陽イオン性脂質である塩化N-[1-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル]-N,N,N-(DOTMA)と、中性脂質であるジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)との混合物、1,2-ジオレオイル-3-トリメチル-アンモニウム-プロパン(DOTAP)1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)その他の陽イオン性脂質を含む脂質混合物等が挙げられ、これらに限定されない。

これらの試薬には、Lipofectin(登録商標)、Lipofectamine(登録商標)、Pierce(登録商標)タンパク質トランスフェクション試薬(いずれもThermo Fisher Scientific Inc.)等の市販品が含まれる。

また、その他の上述のリガンド蛍光センサータンパク質又は上述のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質を細胞内に送達するための試薬としては、例えば、脂質を含まないXfect(商標)トランスフェクション試薬(Clontech Laboratories, Inc.)等を用いてもよい。この試薬は上述のリガンド蛍光センサータンパク質又は上述のリガンド蛍光センサー陰性対照タンパク質が細胞膜透過性ペプチドを含む場合に細胞内に送達することができる。

【0109】

細胞に含まれる上述のリガンド蛍光センサータンパク質は1種類であってもよく、2種類以上であってもよい。2種類以上含む場合、同一細胞内において容易に検出するために、各リガンド蛍光センサータンパク質は励起波長及び発光波長が異なることが好ましい。

【0110】

<第二実施形態>

一実施形態において、本発明は、上述のリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを少なくとも1種類含む染色体を有する細胞を提供する。

【0111】

本実施形態の細胞によれば、生細胞におけるリガンドの濃度の変動を検出することができる。また、励起波長及び発光波長が異なる上述のリガンド蛍光センサータンパク質を複数種類含む細胞を用いることで、それぞれを同一細胞の異なるオルガネラに局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、該細胞の生理的及び/又は病理的变化に伴う各種リガンド濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析する技術を提供することができる。

【0112】

(細胞の作製方法)

本実施形態の細胞は、例えば、上述の発現ベクターをドナーベクターとして細胞内に導入し、相同組換え修復(HDR)を誘発する公知のゲノム編集技術を用いて作製することができる。

10

20

30

40

50



## 【0113】

上述の発現ベクターを細胞内に導入する方法としては、公知の遺伝子導入の手法を用いることができ、具体的には、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、D E A E - デキストラン法等を用いることができる。

## 【0114】

公知のゲノム編集技術としては、例えば、C R I S P R - C a s 9 システム、T A L E N システム、Z n フィンガーヌクレアーゼシステム等が使用できる。または、例えば、染色体における前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入したい部位と相同な配列を、上述の発現ベクターの前記リガンド蛍光センサータンパク質

10

をコードするポリヌクレオチドの上流及び下流に付加することにより、相同組換え修復を誘発させる方法等が使用できる。  
また、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドに薬剤選択マーカーを持たせておくことにより、薬剤選択により前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドの導入が起きた細胞を効率よく選択できる。

## 【0115】

細胞が植物細胞である場合、例えば、アグロバクテリウム法、単離プロトプラストへの D N A 導入法等を用いて、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物細胞に導入し、相同組換え修復 ( H D R ) を誘発させて作製することができる。

20

また、前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドに薬剤選択マーカーを持たせておくことにより、薬剤選択により前記リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドの導入が起きた細胞を効率よく選択できる。

## 【0116】

(染色体上の構成)

染色体に導入された上述のリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、上流にプロモーター、下流にポリアデニル化シグナル等を備えていてもよい。

プロモーター及びポリアデニル化シグナルとしては、上述の発現ベクターにおいて例示されたものと同様のものが挙げられる。

その他リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに高発現させるために、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、イントロンの一部を、プロモーター領域の 5 ' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間或いは翻訳領域の 3 ' 下流に連結してもよい。

30

また、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドの導入が起きた細胞を効率よく選択するために、選択マーカー (例えば、薬剤選択マーカー遺伝子) を、プロモーター領域の 5 ' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間或いは翻訳領域の 3 ' 下流に連結してもよい。

## 【0117】

染色体に導入されたリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドは 1 種類であってもよく、2 種類以上であってもよい。2 種類以上含む場合、同一細胞内において容易に検出するために、各リガンド蛍光センサータンパク質は励起波長及び発光波長が異なることが好ましい。

40

## 【0118】

また、2 種類以上のリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む場合、同一染色体上であってもよく、異なる染色体上であってもよい。

リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドが導入される遺伝子座としては、セーフハーバー座位であることが好ましい。

## 【0119】

なお、本明細書における「セーフハーバー座位」とは、恒常的且つ安定的に発現が行われている遺伝子領域であり、かつ当該領域に本来コードされている遺伝子が欠損又は改変

50

された場合であっても、生命の維持が可能な領域を意味する。

C R I S P R システムを用いて、外来 D N A (本実施形態においては、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチド) をセーフハーバー座位に挿入する場合には、近傍に P A M 配列を有することが好ましい。

セーフハーバー座位としては、例えば、R o s a 2 6 遺伝子座、A A V S 1 遺伝子座等が挙げられる。

#### 【0120】

< 第三実施形態 >

一実施形態において、本発明は、上述の発現ベクターを少なくとも 1 種類含む細胞を提供する。

10

#### 【0121】

本実施形態の細胞によれば、生細胞におけるリガンドの濃度の変動を検出することができる。また、励起波長及び発光波長が異なる上述のリガンド蛍光センサータンパク質を複数種類含む細胞を用いることで、それぞれを同一細胞の異なるオルガネラに局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、該細胞の生理的及び/又は病理的变化に伴う各種リガンド濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析する技術を提供することができる。

#### 【0122】

(細胞の作製方法)

上述の発現ベクターを細胞内に導入する方法としては、公知の遺伝子導入の手法を用いることができ、上述の<第二実施形態>において例示されたものと同様の方法が挙げられる。

20

#### 【0123】

導入された上述の発現ベクターは 1 種類であってもよく、2 種類以上であってもよい。2 種類以上含む場合、同一細胞内において容易に検出するために、各発現ベクターから発現されるリガンド蛍光センサータンパク質は励起波長及び発光波長が異なることが好ましい。

#### 【0124】

非ヒト生物

一実施形態において、本発明は、上述の細胞を含む非ヒト生物を提供する。

30

#### 【0125】

本実施形態の非ヒト生物によれば、生理学的条件下で高濃度のリガンドの存在下での蛍光強度とリガンド非存在下での蛍光強度の比が十分に高く、非ヒト生物の生理学的及び/又は病理学的なリガンドの濃度の変動を検出することができる。また、励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質を複数種類発現する細胞を生物体内の 1 箇所若しくは複数箇所に含む非ヒト生物を用いることで、それぞれを同一細胞の異なるオルガネラに局在させ、あるいは、生物体内の異なる細胞に局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、非ヒト生物の生理的及び/又は病理的变化に伴うリガンド濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析する技術を提供することができる。

40

#### 【0126】

なお、本明細書における「非ヒト生物」とは、ヒト以外の生物種であればよく、具体的には、上述の細胞において例示されたものうちヒト以外のものが挙げられる。

本実施形態の非ヒト生物は、上述の細胞が移植された非ヒト生物であってもよく、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドが生殖細胞系にも導入され、次世代に受け継がれた遺伝子改変非ヒト生物であってもよい。

#### 【0127】

< 非ヒト生物の作製方法 >

本実施形態の非ヒト生物の作製方法としては、例えば、上述の細胞を非ヒト生物の体内に外科的又は非外科的に導入する方法、上述のベクターを直接非ヒト生物の細胞に導入す

50

る方法等が挙げられる。

【0128】

又は、非ヒト生物が非ヒト哺乳動物である場合、例えば、上述の細胞の<第二実施形態>において、細胞として非ヒト哺乳動物の受精卵、胚性幹細胞、精子又は未受精卵を用いて、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入し、これらの細胞を用いて発生させた個体から、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドが胚芽細胞を含むすべての細胞の染色体上に組み込まれた個体を選択する方法によっても作製することができる。

【0129】

得られた非ヒト哺乳動物の胚芽細胞においてリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドが存在することは、得られた動物の子孫がその胚芽細胞及び体細胞の全てに該導入遺伝子を有することで確認することができる。個体の選択は、個体を構成する組織、例えば、血液組織、上皮組織、結合組織、軟骨組織、骨組織、筋組織、口腔内組織又は骨格系組織の一部から調製したゲノムDNAにリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドが存在することをDNAレベルで確認することによって行われる。このようにして選択された個体は通常、相同染色体の片方にリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを有するヘテロ接合体であるため、ヘテロ接合体の個体同士を交配することにより、子孫の中からリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを相同染色体の両方に持つホモ接合体動物を取得することができる。このホモ接合体の雌雄の動物を交配することにより、すべての子孫がリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを安定に保持するホモ接合体となるので、通常の飼育環境で、非ヒト哺乳動物を繁殖継代することができる。

10

20

【0130】

又は、非ヒト生物が植物である場合、例えば、上述の細胞の<第二実施形態>においてアグロバクテリウム法、又は単離プロトプラストへのDNA導入法によって、作製された植物細胞を、植物組織培養法により遺伝子組換え植物全体を再分化させることで作製することができる。

又は、非ヒト生物が植物である場合、例えば、未成熟胚を酵素で部分的に分解し、エレクトロポレーション法等によって、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入し、前記ポリヌクレオチドが染色体に挿入された胚細胞を植物組織培養法により再分化させることによって作製することができる。

30

【0131】

リガンド濃度測定キット

一実施形態において、本発明は、上述のリガンド蛍光センサータンパク質、上述のポリヌクレオチド、上述の発現ベクター、上述の細胞、及び上述の非ヒト生物からなる群から選ばれる少なくとも一つを含むリガンド濃度測定キットを提供する。

【0132】

本実施形態のリガンド濃度測定キットによれば、生理学的条件下で高濃度のリガンドの存在下での蛍光強度とリガンド非存在下での蛍光強度の比が十分に高く、細胞又は非ヒト生物の生理学的及び/又は病理学的なリガンドの濃度の変動を検出することができる。

40

【0133】

また、例えば、リガンドがATPである場合、本実施形態のリガンド濃度測定キットを用いることで、ATPが、前記細胞又は生物によって代謝されるとATPが産生されるグルコースその他の生体エネルギー源が存在するときのみ蛍光を発生し、検出することができる。

また、リガンドがATPである場合、ルシフェラーゼによる発光反応を利用する従来の生細胞検出技術では、細胞膜を溶解して、酵素ルシフェラーゼ及び基質ルシフェリンに細胞内のATPを接触させる必要があった。しかし、本実施形態のリガンド濃度測定キットを用いれば、細胞を破壊してATPを拡散させることなく生細胞を検出することができるので、微生物フロラのように空間的な構造のどの場所に生細胞が分布するか検出すること

50

ができる。

【0134】

本実施形態のリガンド濃度測定キットは、上述のリガンド蛍光センサータンパク質を含む場合に、1種類のリガンド蛍光センサータンパク質を含んでいてもよく、励起波長及び発光波長が異なる複数種類のリガンド蛍光センサータンパク質を含んでいてもよい。

また、本実施形態のリガンド濃度測定キットは、上述のリガンド蛍光センサータンパク質を含む場合に、前記リガンド蛍光センサータンパク質は固体支持体に固定化されていてもよい。

固体支持体としては、上述のリガンド蛍光センサータンパク質に記載されていたものと同様のもの等が挙げられる。

【0135】

本実施形態のリガンド濃度測定キットは、上述のポリヌクレオチドを含む場合に、リガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを1種類含んでいてもよく、励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを複数種類含んでいてもよい。

【0136】

本実施形態のリガンド濃度測定キットは、上述の発現ベクターを含む場合に、1種類のリガンド蛍光センサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含んでいてもよく、励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質を含む発現ベクターを複数種類含んでいてもよい。

【0137】

本実施形態のリガンド濃度測定キットは、上述の細胞を含む場合に、1種類の細胞を含んでいてもよく、複数種類の細胞を含んでいてもよい。

また、本実施形態のリガンド濃度測定キットは、リガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されている細胞を1種類含んでいてもよく、励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されている細胞を複数種類含んでいてもよい。

また、細胞内において1種類のリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されていてもよく、複数種類の励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されていてもよい。

【0138】

本実施形態のリガンド濃度測定キットは、上述の非ヒト生物を含む場合に、1種類の非ヒト生物を含んでいてもよく、複数種類の非ヒト生物を含んでいてもよい。

また、本実施形態のリガンド濃度測定キットは、リガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されている非ヒト生物を1種類含んでいてもよく、励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されている非ヒト生物を複数種類含んでいてもよい。

また、本実施形態のリガンド濃度測定キットに含まれる非ヒト生物の同一細胞内において、1種類のリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されていてもよく、複数種類の励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されていてもよい。

また、本実施形態のリガンド濃度測定キットに含まれる非ヒト生物の異なる細胞内において、1種類のリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されていてもよく、複数種類の励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質が発現又は導入されていてもよい。

【0139】

本実施形態において、上述のリガンド蛍光センサータンパク質を含む場合、本実施形態のリガンド濃度測定キットは、さらに、上述の細胞の<第一実施形態>において例示された試薬を含んでいてもよい。

【0140】

10

20

30

40

50

本実施形態において、上述の発現ベクターを含む場合、本実施形態のリガンド濃度測定キットは、さらに、ベクター導入用のトランスフェクション試薬を含んでもよい。

ベクター導入用のトランスフェクション試薬としては、例えば、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬及びリン酸カルシウムからなる群より選択される。このようなトランスフェクション試薬としては、例えば、Effectene Transfection Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA)、TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI)、Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI)、SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA)、PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA)、Lipofect AMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA)、JetPEI (x4) conc. (101-30, Polypplus-transfection, France)、ExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD)等が挙げられ、それらに限定されない。

10

#### 【0141】

本実施形態において、上述の細胞を含む場合、本実施形態のリガンド濃度測定キットは、さらに、細胞培養用培地を備えていてもよい。

細胞培養用培地としては、細胞の生存増殖に必要な成分（無機塩、炭水化物、ホルモン、必須アミノ酸、非必須アミノ酸、ビタミン）等を含む基本培地であればよく、細胞の種類により適宜選択することができる。

20

前記細胞培養用培地として具体的には、例えば、LB培地、大腸菌用最少培地（Davis培地）、大腸菌用最少塩培地（MS）等の大腸菌培養用培地；枯草菌用最少培地（Spizizen最少培地）、枯草菌用最少塩培地、枯草菌形質転換用培地I、枯草菌形質転換用培地II等の枯草菌培養用培地；酵母用最少培地（YPD培地）、酵母用完全培地（YPAD培地）等の酵母培養用培地；MurashigeとSkoogの培地（MS培地）、B5培地、ハイポネックス培地等の植物培養用培地；グレース昆虫培地、シュナイダー昆虫培地等の昆虫細胞培養用培地；DMEM、Minimum Essential Medium（MEM）、RPMI-1640、Basal Medium Eagle（BME）、Dulbecco's Modified Eagle's Medium：Nutrient Mixture F-12（DMEM/F-12）、Glasgow Minimum Essential Medium（Glasgow MEM）等の動物細胞培養用培地等が挙げられ、これらに限定されない。

30

#### 【0142】

本実施形態のリガンド濃度測定キットは、さらに、励起用光源を含んでもよい。励起用光源は、蛍光センサータンパク質の励起波長に応じて、適宜選択すればよい。

#### 【0143】

被検試料中のリガンド濃度の決定方法

一実施形態において、本発明は、上述のリガンド蛍光センサータンパク質と、既知の濃度のリガンドを含む標準溶液と接触させて、蛍光強度を測定し、検量線を作成する検量線作成工程と、前記リガンド蛍光センサータンパク質と、未知の濃度のリガンドを含む溶液と接触させて、蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、前記検量線作成工程において、作成された検量線に基づいて、前記蛍光測定工程において測定された蛍光強度に対するリガンド濃度を決定する濃度決定工程と、を備える被検試料中のリガンド濃度の決定方法を提供する。

40

#### 【0144】

本実施形態の被検試料中のリガンド濃度の決定方法によれば、被検試料中のリガンド濃度を簡便且つ正確に決定することができる。

本実施形態の被検試料中のリガンド濃度の決定方法の各工程について、以下に詳細に説

50

明する。

#### 【0145】

##### [ 検量線作成工程 ]

まず、上述のリガンド蛍光センサータンパク質と、既知の濃度のリガンドを含む標準溶液とを接触させ、蛍光強度を測定する。

リガンドとしては、特別な限定はなく、上述のリガンド蛍光センサータンパク質において例示されたものと同様のものが挙げられる。

標準溶液は、1種類の濃度のリガンドを含む溶液を用いてもよく、複数種類の濃度のリガンドを含む溶液を用いてもよい。中でも、検量線を正確に作成するために、標準溶液は、複数種類の濃度のリガンドを含む溶液を用いることが好ましい。

10

#### 【0146】

前記リガンド蛍光センサータンパク質は、溶媒中に懸濁された状態であってもよく、固体支持体に固定化された状態であってもよい。

前記リガンド蛍光センサータンパク質を懸濁する溶媒としては、リガンド蛍光センサータンパク質のリガンド結合能及び蛍光特性に影響を与えないものであればよい。溶媒として具体的には、例えば、水、塩化ナトリウム溶液（例えば、0.9% (w/v) NaCl）、グルコース溶液（例えば、5%グルコース）、界面活性剤含有溶液（例えば、0.01%ポリソルベート20）、pH緩衝溶液（緩衝剤として、例えば、HEPES-KOH、Tris-HCl、酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム、リン酸、ホウ酸、MES、PIPESHEPES-KOH、Tris-HCl、酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム、リン酸、ホウ酸、MES、PIPES等を含む溶液）等が挙げられ、これらに限定されない。

20

固体支持体としては、上述のリガンド蛍光センサータンパク質に記載されていたものと同様のもの等が挙げられる。

#### 【0147】

蛍光強度の測定は、公知の定常蛍光測定装置を用いればよい。次いで、得られた蛍光強度と既知のリガンド濃度から、検量線を作成する。

#### 【0148】

##### [ 蛍光測定工程 ]

次いで、前記リガンド蛍光センサータンパク質と、未知の濃度のリガンドを含む溶液と接触させて、蛍光強度を測定する。蛍光強度の測定は、公知の定常蛍光測定装置を用いればよい。

30

未知の濃度のリガンドを含む溶液としては、特別な限定はなく、例えば、ヒト又は非ヒト生物から採取された体液試料、ヒト又は非ヒト生物から採取された細胞の抽出液、ヒト又は非ヒト生物から採取された細胞の培養上清、ヒト又は非ヒト生物由来の培養細胞の抽出液、ヒト又は非ヒト生物由来の培養細胞の培養上清等が挙げられ、これらに限定されない。

#### 【0149】

前記体液試料として、より具体的には、例えば、血液、血清、血漿、尿、パフィーコート、唾液、精液、胸部滲出液、脳脊髄液、涙液、痰、粘液、リンパ液、腹水、胸水、羊水、膀胱洗浄液、気管支肺胞洗浄液等が挙げられ、これらに限定されない。

40

#### 【0150】

##### [ 濃度決定工程 ]

次いで、前記検量線作成工程において、作成された検量線に基づいて、前記蛍光測定工程において測定された蛍光強度に対するリガンド濃度を決定する。

前記検量線の作成及び蛍光強度に対するリガンド濃度の決定については、市販のデータ解析ソフトウェア等を用いて実施してもよい。

#### 【0151】

リガンド濃度の経時変化の検知方法

上述の細胞又は上述の非ヒト生物を用いることで、生理学的条件下で高濃度のリガンド

50

の存在下での蛍光強度とリガンド非存在下での蛍光強度の比が十分に高く、生きた細胞又は生きた非ヒト生物の生理学的及び/又は病理学的なリガンドの濃度の変動を簡便に検出することができる。

【0152】

< 第一実施形態 >

一実施形態において、本発明は、上述の細胞を用いて、経時的な蛍光強度を測定する工程を備える生細胞におけるリガンド濃度の経時変化の検知方法を提供する。

【0153】

本実施形態の検知方法によれば、生細胞におけるリガンドの濃度の経時的な変化を簡便に検出することができる。また、励起波長及び発光波長が異なる上述のリガンド蛍光センサータンパク質が複数種類導入された又は発現している細胞を用いることで、それぞれを同一細胞の異なるオルガネラに局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、該細胞の生理的及び/又は病理的变化に伴う各種リガンド濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析する技術を提供することができる。

10

【0154】

本実施形態の検知方法において、細胞を生きたままの状態、定常蛍光測定装置を有する蛍光顕微鏡等を用いて、蛍光強度を測定することができる。さらに、継続的に蛍光強度を測定することにより、蛍光強度の経時的な変化を測定することができる。

【0155】

20

< 第二実施形態 >

一実施形態において、本発明は、上述の非ヒト生物を用いて、経時的な蛍光強度を測定する工程を備える生きた非ヒト生物におけるリガンド濃度の経時変化の検知方法を提供する。

【0156】

本実施形態の検知方法によれば、生理学的条件下で高濃度のリガンドの存在下での蛍光強度とリガンド非存在下での蛍光強度の比が十分に高く、非ヒト生物の生理学的及び/又は病理学的なリガンドの濃度の変動を検出することができる。また、励起波長及び発光波長が異なるリガンド蛍光センサータンパク質を複数種類発現する細胞を生物体内の1箇所若しくは複数箇所を含む非ヒト生物を用いることで、それぞれを同一細胞の異なるオルガネラに局在させ、あるいは、生物体内の異なる細胞に局在させ、蛍光顕微鏡の同一視野で同時に、あるいは、ほぼ同時に検出して、非ヒト生物の生理的及び/又は病理的变化に伴うリガンド濃度の経時的及び/又は空間的变化(時空間ダイナミクス)を光学的に解析する技術を提供することができる。

30

【0157】

本実施形態の検知方法において、非ヒト生物を生きたままの状態、定常蛍光測定装置を有する蛍光顕微鏡等を用いて、蛍光強度を測定することができる。さらに、継続的に蛍光強度を測定することにより、蛍光強度の経時的な変化を測定することができる。

【実施例】

【0158】

40

以下、実施例及び比較例等を挙げて本発明をさらに詳述するが、本発明はこれらの実施例等に限定されるものではない。

【0159】

[ 実施例 1 ] A T P 特異的蛍光センサータンパク質の構築

1. 試薬等

A T P、A D P、及びA M Pは和光純薬工業株式会社から購入し、G T Pはシグマ-アルドリッジから購入した。フッ化ナトリウム(N a F)、オリゴマイシン、イソプロテレノール及び3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチルウレア(D C M U)のようなその他の試薬はシグマ-アルドリッジから購入した。d A T Pはサーモサイエンティフィックから購入した。プライマー用の全てのポリヌクレオチドはシグマ-アルドリッ

50

ジから購入した。ライゲーションはそれぞれの最適バッファー（タカラ）中でT4 DNA リガーゼを用いて反応を行った。PCRには、PrimeSTAR HS DNAポリメラーゼ（タカラバイオ株式会社）を用いた。PCR反応産物又は制限酵素消化産物は、ルーティンとして、電気泳動（アガロースゲル）により精製し、その後ゲル抽出（QIAquick、株式会社キアゲン）を行った。大腸菌からのプラスミドDNA単離には、Axy Prep（商標）ミニプレップキット（Axygenbio、コーニングジャパン株式会社）を用いた。

#### 【0160】

2. ATP蛍光センサータンパク質及びこれに対応する陰性対照タンパク質の設計

本発明のATP蛍光センサータンパク質は、ATP結合ドメインとして枯草菌F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素のイプシロン（ $\epsilon$ ）サブユニットを用い、蛍光タンパク質として、BFP（Wachter, R.ら、Biochemistry 2960, 9759-9765（1997））、Citrine（Griesbeck, O.ら、J. Biol. Chem. 276, 29188-29194（2001））、及びmApple（Shaner, N.C.ら、Nature Methods 5:545-551（2008））を用いた。

なお、BFP及びmAppleは、Zhao, Y.ら（Science. 333, 1888-1891（2011））を参照して数カ所にアミノ酸置換変異を導入した（配列番号1、2、7、及び8）。蛍光タンパク質BFP、Citrine、及びmAppleの励起波長は、それぞれ、380、490、及び550nmで、発光波長域は、それぞれ、410~600、505~650及び575~700nmである。サブユニットのアミノ末端及びカルボキシル末端にさまざまなポリペプチドリinkerを連結して、蛍光タンパク質BFP、Citrine及びmAppleの内部に挿入した融合タンパク質を、ATP蛍光センサータンパク質の候補タンパク質として作製した（それぞれMalion B、G、及びRシリーズと称する場合がある。）。

#### 【0161】

ATP蛍光センサーの候補タンパク質のドメイン及びリンカーの構成は以下のとおりである。まず、ATPと特異的に結合するドメインを「ATP結合ドメイン」と称する場合がある。ATP結合ドメインは、枯草菌F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素のサブユニットに由来し、そのアミノ酸配列は配列番号15として配列表に列挙する。ATP結合ドメインのアミノ末端に連結するポリペプチドリinkerを「N末端側リンカー」、ATP結合ドメインのカルボキシル末端に連結するポリペプチドリinkerを「C末端側リンカー」と称する場合がある。挿入により分断された各蛍光タンパク質BFP、Citrine、及びmAppleのアミノ末端側ドメイン及びカルボキシル末端側ドメインを、以下では、「BFP-Nドメイン」、「BFP-Cドメイン」、「Citrine-Nドメイン」、「Citrine-Cドメイン」、「mApple-Nドメイン」、及び「mApple-Cドメイン」と称する場合がある。BFP-Nドメイン及びBFP-Cドメインのアミノ酸配列は配列番号1及び2として列挙する。Citrine-Nドメイン及びCitrine-Cドメインのアミノ酸配列は配列番号5及び6として列挙する。mApple-Nドメイン及びmApple-Cドメインのアミノ酸配列は配列番号7及び8として列挙する。

#### 【0162】

したがって、Malion BシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[BFP-Nドメイン]-[N末端側リンカー]-[ATP結合ドメイン]-[C末端側リンカー]-[BFP-Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリinkerが配置される。

同様に、Malion GシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[Citrine-Nドメイン]-[N末端側リンカー]-[ATP結合ドメイン]-[C末端側リンカー]-[Citrine-Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリinkerが配置される。



また、MaLi on RシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[mA p p l e - Nドメイン] - [N末端側リンカー] - [ATP結合ドメイン] - [C末端側リンカー] - [mA p p l e - Cドメイン]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリナーが配置される。

### 【0163】

ATP蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築の手順は概略以下のとおりである。まず、ATP結合ドメインとして、枯草菌 $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットをコードするポリヌクレオチドを合成した(Integrated DNA Technologies、株式会社医学生物学研究所)。つぎに、ATP結合ドメインの両端にさまざまなアミノ酸配列のN末端側リンカー及びC末端側リンカーをコードするポリヌクレオチドを連結した。前記N末端側リンカー、ATP結合ドメイン及びC末端側リンカーをエンコードするポリヌクレオチドが、アミノ酸配列の読み枠がずれないように、各蛍光タンパク質の発色団よりカルボキシル末端側で挿入された融合したキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドをPCR法により作製した。前記ATP蛍光センサーの候補タンパク質をコードするポリヌクレオチドをpRSET<sub>A</sub>ベクター(Invitrogen、Life Technologies Corporation)に挿入するために、MaLi on GシリーズはXhoI/BstBI部位を、MaLi on B及びRシリーズはBamHI/HindIII部位を用いた。ATP蛍光センサーの候補タンパク質を含むpRSET<sub>A</sub>ベクターコンストラクトは大腸菌JM109(DE3)に形質転換され、ATP蛍光センサーの各候補タンパク質を含む発現ベクターのクローンが単離された。各クローンの大腸菌は2.5mLのLB培地中で20℃で3~4日間培養された。その後、該大腸菌の懸濁液を15,300gで5分間遠心して、ペレットにし、PBSバッファ液で再懸濁して、30秒間超音波処理(130W、20kHz、強度30%、Vibra cell(商標)、SONICS & Materials, Inc.)を施して菌体溶解液を得た。該菌体溶解液の遠心上清40μLに、460μLのバッファ液(50mM Mops-KOH(pH 7.4)、50mM KCl、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、及び0.05% Triton X-100)を添加した。最終濃度10mMのATPの存在下又は非存在下で、各クローンのATP蛍光センサーの候補タンパク質の蛍光特性を蛍光分光光度計(日立F-2700、株式会社日立ハイテクサイエンス)を用いて測定した。

### 【0164】

#### 3. ATP蛍光センサーの候補タンパク質の蛍光特性の測定結果

図1AはMaLi on BシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質19種類のATPの存在下での蛍光強度とATP非存在下での蛍光強度の比(以下、「ダイナミックレンジ」という。)のヒストグラムであり、図1BはMaLi on GシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質27種類のダイナミックレンジのヒストグラムであり、図1CはMaLi on RシリーズのATP蛍光センサーの候補タンパク質47種類のF/F<sub>0</sub>のヒストグラムである。ここでATP存在下のATP濃度はすべて10mMである。図1A、図1B、及び図1Cの横軸はダイナミックレンジで、目盛の数字は各区間の端を表し、縦軸は、ダイナミックレンジの区間内にダイナミックレンジが含まれる候補タンパク質の個数を表す。図1A、図1B、及び図1Cにおいて、ダイナミックレンジが1であれば、ATPの有無で蛍光特性に変化がないことを意味し、ダイナミックレンジが1を超える場合はATP存在下で蛍光が強くなり(以下、「ターン・オン型」(turn-on type))と称する場合がある。)、ダイナミックレンジが1未満の場合はATP存在下で蛍光が弱くなる(以下、「ターン・オフ型」(turn-off type))と称する場合がある。)

### 【0165】

MaLi on B、G、及びRシリーズで最もダイナミックレンジが大きい候補タンパク質をそれぞれMaLi on B、G及びRと命名した。MaLi on BのN末端側リンカー及びC末端側リンカーのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号16及び17に列挙する

。MaLi on GのN末端側リンカーのアミノ酸配列はWRG (Trp - Arg - Gly)で、MaLi on GのC末端側リンカーのアミノ酸配列を配列番号18に列挙する。MaLi on RのN末端側リンカーのアミノ酸配列を配列番号19に列挙する。MaLi on RのC末端側リンカーのアミノ酸配列はPEE (Pro - Glu - Glu)である。MaLi on B、G、及びRの全長アミノ酸配列を、それぞれ、配列番号9、10、及び11に列挙する。

#### 【0166】

MaLi on B、G、及びRシリーズでダイナミックレンジが1に近い候補タンパク質の1つをそれぞれnegMaLi on B、G、及びRと命名した。negMaLi on BのN末端側リンカー及びC末端側リンカーのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号27及び28に列挙する。配列番号negMaLi on GのN末端側リンカーのアミノ酸配列はPRG (Pro - Arg - Gly)で、negMaLi on GのC末端側リンカーのアミノ酸配列を配列番号29に列挙する。negMaLi on RのN末端側リンカーのアミノ酸配列を配列番号30に列挙する。negMaLi on RのC末端側リンカーのアミノ酸配列はPEG (Pro - Glu - Gly)である。negMaLi on B、G、及びRの全長アミノ酸配列を、それぞれ、配列番号24、25、及び26に列挙する。

10

#### 【0167】

[実施例2] ATP蛍光センサータンパク質等の蛍光特性の解析

20

##### 1. ATP蛍光センサータンパク質等の精製

MaLi on B、G、及びRと、negMaLi on B、G、及びRとを以下では「ATP蛍光センサータンパク質等」と称する場合がある。タンパク質精製の目的には、ATP蛍光センサータンパク質等をpRSET<sub>A</sub>ベクターに連結して、翻訳開始コドン、ヒスチジンヘキサマーポリペプチド等を含む融合タンパク質をT7プロモーターで駆動するコンストラクトとして大腸菌JM109 (DE3)に導入した。ATP蛍光センサータンパク質等の発現ベクターを含む大腸菌は、100mLのLB培地中で20-4日間培養した。その後、大腸菌の懸濁液は15,300g、20分間、4℃で遠心して上清を除去し、ペレットの凍結及び溶解を3回繰り返し、氷上で3分間超音波処理(30W、20kHz、強度70%、Vibra cell (商標))を施して菌体溶解液を得た。該菌体溶解液の遠心上清をNi-NTAアガロース(株式会社キアゲン)を充填したPD-10カラム(GEヘルスケア・ジャパン株式会社)に吸着させ、常法に従い、カラムを洗浄し、ATP蛍光センサータンパク質等の融合タンパク質を前記カラムから溶出した。ATP蛍光センサータンパク質等の融合タンパク質はBradford法タンパク質アッセイ(バイオラッドタンパク質アッセイ、バイオラッド ラボラトリーズ株式会社)を用いて、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質とする較正曲線により定量した。

30

#### 【0168】

##### 2. 精製ATP蛍光センサータンパク質等の蛍光特性の測定

精製されたATP蛍光センサータンパク質等の融合タンパク質を蛍光分光光度計(日立F-2700)による測定実験に用いた。以下の実験では、pHを変化させる実験を除いて、Mopsバッファー(50mM Mops - KOH (pH7.4)、50mM KCl、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、及び0.05% トリトン X-100)を用いた。ATP濃度による蛍光特性の変化を調べる実験では、0-8mMのさまざまな最終濃度のATPを用いた。分子特異性を調べる実験では、ATPの類縁体化合物のうち、ADP、AMP、GTP、又はdATPを最終濃度10mMで用いた。精製されたATP蛍光センサータンパク質等の融合タンパク質の吸光スペクトルの測定には該融合タンパク質の濃度を20µMに調整し、紫外線-可視光分光光度計(日本分光株式会社)を用いた。精製されたATP蛍光センサータンパク質等の融合タンパク質の反応速度論的解析には、ストップフロー装置を備えた蛍光分光光度計(RX2000、Applied photophysic s Limited)を用いた。該タンパク質は、異なるATP濃度の溶液と1:1で迅速に混合され、所定の波長(440nm、520nm及び585nm)での蛍光変化を記

40

50

録して、各 ATP 濃度での見かけの速度定数 ( $k_{app}$ ) を指数曲線の当てはめにより算出した。その後、各 ATP 濃度での  $k_{app}$  をプロットして、結合定数 ( $k_{on}$ ) 及び解離定数 ( $k_{off}$ ) をそれぞれ決定した。ここで、これら 3 種類の定数の関係は以下の式 (1) で表される。

【0169】

【数1】

$$k_{app} = k_{on} \times [\text{ATP 濃度}] + k_{off} \quad (1)$$

【0170】

10

### 3. ATP 蛍光センサータンパク質等の蛍光特性の測定結果

図 2 A は 10 mM の ATP 存在下及び非存在下での MaLion B、G、及び R の励起スペクトル図であり、図 2 B は 10 mM の ATP 存在下及び非存在下での MaLion B、G、及び R の励起スペクトル及び蛍光スペクトル図である。図 2 A 及び図 2 B の横軸は、それぞれ、励起波長及び蛍光波長を表し、縦軸は蛍光強度の相対値を表す。グラフの実線及び点線は、それぞれ、ATP 存在下及び非存在下でのスペクトル曲線を表す。図 2 A 及び図 2 B から明らかとなっており、MaLion B、G、及び R はいずれも ATP 非存在下と比較して 10 mM の ATP 存在下での蛍光が、それぞれ、80%、390% 及び 350% も増大した。図 2 C は 10 mM の ATP 存在下及び非存在下での negMaLion B、G、及び R の蛍光スペクトル図である。図 2 C から、negMaLion B、G、及び R はいずれも ATP 非存在下と比較して 10 mM の ATP 存在下での蛍光が、それぞれ、104%、95%、及び 106% 増大した。

20

【0171】

図 3 A は MaLion B、G、及び R の蛍光強度の ATP 濃度依存的変化を示すグラフである。図 3 A の異なる ATP 濃度と蛍光強度変化のプロットから解離平衡定数 ( $K_D$ ) を算出した結果は以下の表 5 のとおりであった。

【0172】

【表5】

	MaLionG	MaLionB	MaLionR
$K_D$ (mM)	1.10	0.34	0.85
Hill係数	2.0	1.6	1.4

30

【0173】

細胞内の ATP 濃度は、従来 of 知見より、諸説あるが、ほとんどの場合、5 mM 以下であることが知られている (Rangarajuru, Cell. 156, 825-35 (2014)、Traut, T. W., Mol. Cell. Biochem. 140, 1-22 (1994))。したがって、MaLion B、G、及び R の解離平衡定数を考慮すると、それぞれ、生理的な条件下で、十分に機能するものと期待できる。

40

【0174】

図 3 B は MaLion B、G、及び R の蛍光強度の分子特異性を示すグラフである。ATP 非存在下と比較した 10 mM の ATP 存在下での蛍光強度の相対値を正規化ダイナミックレンジとすると、ATP 類縁体化合物は正規化ダイナミックレンジの 10% 以下しか蛍光強度に影響を与えないことが明らかになった。したがって、今回の ATP 蛍光センサーは非常に ATP に特異性が高い。またこの結果から、同じ枯草菌  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素のサブユニットを ATP 結合ドメインとして利用する ATP センサータンパク質であっても、改変体ごとに ATP 類縁体化合物の影響が異なり、MaLion B、及び G では、ADP、AMP、及び dATP 存在下では蛍光が減少するが、MaLion R では蛍光が増大した。したがって、個々の蛍光センサーの蛍光特性は、ATP 結合ドメイ

50

ンの両端に連結されたN末端側リンカー及びC末端側リンカーの配列が決定しているといえる。

#### 【0175】

図4A、図4B、及び図4Cは、それぞれ、MaLion B、G、及びRのATP存在下又はATP非存在下での蛍光強度と、ダイナミックレンジとのpH依存的变化を示すグラフである。図4A、図4B、及び図4Cの横軸はpH、左側の縦軸は蛍光強度、右側の縦軸はダイナミックレンジを表す。図4A、図4B、及び図4Cから、MaLion B、G、及びRは、ATP濃度が同じでも、pHが変化すると蛍光特性が変化し、そのpHによる蛍光特性への影響は、改変体ごとに異なる。これは、図3Bに示すATP類縁体化合物の蛍光特性への影響と同様である。実際、ATP蛍光センサー陰性対照タンパク質 *negMaLion B*、*G*、及び*R*のpHによる蛍光特性の変化パターンは、*MaLion B*、*G*、及び*R*のpHによる蛍光特性の変化パターンと同じであった。そこで、ATP濃度の変化と同時にpHも変化する可能性のある実験系では、*MaLion B*、*G*、及び*R*による蛍光測定と、*negMaLion B*、*G*、及び*R*の蛍光測定とを並行して行うことによって、pH変化による影響を除外してATP濃度を決定することができる。

10

#### 【0176】

[実施例3] ATP蛍光センサータンパク質等の細胞内発現用ベクターの構築

##### 1. 哺乳類細胞内発現用ベクターの構築

哺乳類細胞内で発現させるために、*MaLion G*又は*negMaLion G*をコードするポリヌクレオチドをpCDNA3.1(-)ベクターのXhoI/HindIII部位に挿入した。*MaLion B*及び*R*、あるいは、*negMaLion B*及び*R*をコードするポリヌクレオチドをpCDNA3.1(-)ベクターのBamHI/HindIII部位に挿入した。ATP蛍光センサータンパク質等を哺乳類細胞ミトコンドリアに局在化させるために、ATP蛍光センサータンパク質のアミノ末端にシトクロムcオキシダーゼのサブユニットVII由来局在化シグナル配列(SVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSL、配列番号44)を連結した融合タンパク質をミトコンドリア特異的発現ベクターで発現させた。すなわち、*MaLion R*又は*negMaLion R*をコードするポリヌクレオチドをpEYFP-Mitoベクター(Clontech Laboratories, Inc.)のBamHI/NotI部位に挿入した。*MaLion R*又は*negMaLion R*のアミノ末端にシトクロムcオキシダーゼのサブユニットVII由来局在化シグナル配列が連結した融合タンパク質を、「mito-MaLion R」又は「mito-negMaLion R」と命名した。

20

30

#### 【0177】

##### 2. 線虫細胞内発現用ベクターの構築

線虫のミトコンドリアで*MaLion R*又は*negMaLion R*を局在化させるために、*MaLion R*又は*negMaLion R*のアミノ末端に、ニワトリアスパラギン酸アミノ転移酵素由来のミトコンドリア局在化シグナル(ALLQSRLLLSAPRRAAATARASS、配列番号45)が連結した融合タンパク質を「Cemito-MaLion R」又は「Cemito-negMaLion R」と命名した。線虫の咽頭筋でATP蛍光センサータンパク質等を発現させるためには、myo2pプロモーターを導入したpBueScript由来のベクターに、*MaLion G*、*negMaLion G*、*Cemito-MaLion R*、又は*Cemito-negMaLion R*のそれぞれをコードするポリヌクレオチドをXhoI/SacI部位に挿入した。

40

#### 【0178】

##### 3. 植物細胞内発現用ベクターの構築

植物のミトコンドリアで*MaLion R*又は*negMaLion R*を局在化させるために、*MaLion R*又は*negMaLion R*のアミノ末端に、AR791(AT1G52080、NM\_104089.3)が連結した融合タンパク質を、「Plmito-MaLion R」又は「Plmito-negMaLion R」と命名した。植物でATP蛍光センサータンパク質等を発現させるためには、35Sプロモーター2重

50

連結した pGreen\_0281 ベクターに、植物（シロイヌナズナ）での翻訳にコドンが最適化された Malion G、negMalion G、Cemito-Malion R、又は Cemito-negMalion R のそれぞれをコードするポリヌクレオチドを XhoI / SacI 部位に挿入した。

【0179】

[実施例4] ATP 蛍光センサータンパク質等を用いる細胞内 ATP 濃度測定

1. HeLa 細胞の細胞内 ATP の蛍光センサー測定

HeLa 細胞は、ATCC (American Type Culture Collection、米国バージニア州) から入手し、ウシ胎仔血清 10%、ペニシリン 100 IU/mL 及びストレプトマイシン 100 µg/mL を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (グルコース 4.5 g/L、以下、「増殖培地」と称する場合がある。) 中 37、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。HeLa 細胞内で発現した ATP 蛍光センサータンパク質等の蛍光顕微鏡測定には、HeLa 細胞を播種して 50% コンフルエントになった 3.5 cm のガラス底ディッシュを用意した。ATP 蛍光センサータンパク質等を含む発現ベクター 0.2 µg と 0.2 µL の FuGENE HD トランスフェクション試薬 (プロメガ株式会社) とを予め添加した 10 µL の Opti-MEM 培地 (Life Technologies Corporation、Thermo Fisher Scientific Inc.) を前記 3.5 cm のガラス底ディッシュ上の HeLa 細胞に添加した。8 時間培養後、新鮮な増殖培地に交換して、さらに 2 - 3 日培養した。蛍光測定の直前に培地をフェノールレッド不含増殖培地に交換した。

10

20

【0180】

蛍光顕微鏡測定には、冷却 CCD カメラ (Cool SNAP HQ2、Photometrics) 及び油浸対物レンズ (Plan Apo 60x1.42 NA) を備えた倒立顕微鏡 (IX81、オリンパス株式会社) を用いた。細胞質 ATP 産生阻害実験には NaF を用いた。

【0181】

1. 5 mL の増殖培地中で HeLa 細胞を培養しているディッシュに NaF 40 mM を含む増殖培地 0.5 mL を添加して NaF の最終濃度を 10 mM にした。ミトコンドリア ATP 産生阻害実験には オリゴマイシン を用いた。900 µL の増殖培地中で HeLa 細胞を培養しているディッシュに オリゴマイシン 100 µg/mL を含む増殖培地 100 µL を添加して、オリゴマイシンの最終濃度を 20 µg/mL にした。

30

【0182】

細胞の蛍光顕微鏡画像は 10 秒ごとに撮影した。カメラ及びフィルターの制御と、データ記録には、MetaFluor ソフトウェア (Molecular Devices, LLC) を用いた。Malion G の単色蛍光撮像には、励起フィルターに FF01-500/24 を、ダイクロイックミラーに Di02-FF520 を、発光フィルターに FF01-542/27 を用いた (全て Semrock、株式会社オプトライン)。Malion R の単色蛍光撮像には、励起フィルターに BP535-555HQ を、ダイクロイックミラーに DM565HQ を、発光フィルターに BA570-625HQ を用いた (全てオリンパス株式会社)。Malion G 及び R の細胞質又はミトコンドリア局在化融合タンパク質の同時撮像には、励起フィルターに BP460-480HQ 及び BP535-555HQ (オリンパス株式会社) を、ダイクロイックミラーに Di01-FF493/574 (Semrock、株式会社オプトライン) を、発光フィルターに BA495-540HQ 及び BA570-625HQ を用いた (オリンパス株式会社)。Malion B の単色蛍光撮像には、励起フィルターに FF01-377 を、ダイクロイックミラーに Di03-FF409 を、発光フィルターに FF02-447 を用いた (全て Semrock、株式会社オプトライン)。全ての実験は、CO<sub>2</sub> インキュベーター付きの温度制御循環チャンバーを用いて実行した。

40

【0183】

図 5 A、図 5 B、及び図 5 C は、それぞれ、Malion G、R、及び B を発現させ

50

た HeLa 細胞に解糖系 ATP 産生を阻害する NaF を投与後の蛍光の変化を示すグラフである。図 5 A、図 5 B、及び図 5 C では、縦軸は正規化した蛍光強度を表し、横軸は時間 (分) を表す。測定開始 3 分後に NaF を最終濃度 10 mM となるように添加した。各図の薄い灰色の 3 本の波形は、異なる 3 個のディッシュでの測定値を示し、濃い灰色の 1 本の波形はこれら 3 本の波形の平均値を示す。ターン・オン型の ATP 蛍光センサー MaLion G、R、及び B では NaF 添加から 15 分後まで蛍光強度が減少した。これは細胞内の ATP 濃度が低下したことを意味する。

#### 【0184】

図 5 D、図 5 E、及び図 5 F は、negMaLion G、R、及び B を発現させた HeLa 細胞に解糖系 ATP 産生を阻害する NaF を投与後の蛍光の変化を示すグラフである。図 5 G は、図 5 A ~ 図 5 F のグラフの実験結果に基づいて、MaLion G、R、及び B と、negMaLion G、R、及び B について、HeLa 細胞で発現させた各蛍光タンパク質の蛍光測定開始から 25 分後の正規化した蛍光強度の平均値及び標準偏差を示す棒グラフである。

10

#### 【0185】

図 5 D、図 5 E、及び図 5 F から、NaF 投与後の蛍光の変化には、ATP の濃度変化にはほとんど反応しない negMaLion G、R、及び B でも蛍光強度の変化が起こった。これは、細胞質の pH が変化が原因である可能性がある (Berg, J. ら、Nat. Methods 6, 161-166 (2009))。しかし、図 5 G に示されるとおり、MaLion G、R、及び B の測定結果と、negMaLion G、R、及び B の測定結果とを組み合わせると、前者の蛍光強度は後者の蛍光強度より有意に低かった。そこで、MaLion G、R、及び B の測定結果と、negMaLion G、R、及び B の測定結果とを組み合わせることにより、解糖系が阻害された細胞の細胞質のように、ATP 濃度の変化が pH の変化と同時に起こる条件でも、ATP 濃度を pH 変化の影響を除外して測定することが可能になった。

20

#### 【0186】

つぎに、蛍光波長の異なる 2 種類の ATP 蛍光センサータンパク質を一方は細胞質に局在させ、他方はミトコンドリアに局在させて、ミトコンドリアでの ATP 産生を阻害するが細胞質での解糖系 ATP 産生は阻害しないオリゴマイシンを投与後の細胞質及びミトコンドリア両方の ATP 濃度変化を同時に測定した。2 種類の ATP 蛍光センサータンパク質の発現ベクターの同時トランスフェクションには、細胞質に局在する ATP 蛍光センサータンパク質を含む発現ベクター 0.2 µg と、ミトコンドリアに局在する ATP 蛍光センサータンパク質を含む発現ベクター 0.2 µg と、0.2 µL の FuGENE HD トランスフェクション試薬 (プロメガ株式会社) とを予め添加した 10 µL の Opti-MEM 培地 (Life Technologies Corporation、Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。図 6 は、MaLion G の発現ベクターと、mito-MaLion R の発現ベクターとを HeLa 細胞に同時にトランスフェクションした後、同一視野での 2 種類の異なる ATP 蛍光センサータンパク質に対応する 2 つの波長での蛍光顕微鏡撮像開始から 3 分後にオリゴマイシンを投与し、その後の蛍光の変化を示したグラフである。

30

40

#### 【0187】

図 6 から明らかとなっており、ミトコンドリアでの ATP 濃度は、ミトコンドリアの ATP 産生阻害に伴って低下した。細胞質の ATP 濃度は、オリゴマイシン投与直後は減少したが、その後 15 分間にわたって増大した。この細胞質及びミトコンドリアの ATP 動態は、ミトコンドリアの ATP 産生阻害により細胞内 ATP が減少しはじめると、解糖系の ATP 産生が亢進したことを示唆する。本実施例は、同一細胞内の異なるオルガネラでの ATP 動態の同時観察に成功した世界最初の実験である。がん細胞では、ミトコンドリアの ATP 産生よりも解糖系の ATP 産生のほうが発達していることが知られている (Warburg 効果)。抗がん剤の開発では、これら 2 つの ATP 産生系を阻止して細胞死に至らしめることをねらう戦略を採用することが多い。しかし、本実施例から、これら 2 つの A

50

ATP産生系は相互作用することが具体的に示された。そこで、ATP産生系を作用点とする制がん剤等の今後の医薬開発では、ATP蛍光センサータンパク質を用いる細胞質及びミトコンドリアのATP動態の同時観察が薬物評価に利用されることが推察される。

#### 【0188】

##### 2. 褐色脂肪細胞での細胞内ATPの蛍光センサー測定

不死化褐色脂肪細胞（前脂肪細胞）株のマウスWT-1細胞は、ウシ胎仔血清10%、GlutaMax（商標）、並びにペニシリン100IU/mL及びストレプトマイシン100µg/mLを添加したダルベッコ変法イーグル培地（低グルコース、Thermo Fisher Scientific Inc.）中37℃、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。WT-1細胞はDr. Yu-Hua Tseng（Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, アメリカ合衆国）から恵与された。WT-1細胞は、BMP（骨形成タンパク質）-7による分化誘導によりガラス底ディッシュ上で褐色脂肪細胞に分化した（Tsengら（Nature, 454:1000-1004（2008））。簡潔には、細胞がコンフルエント状態に達した後、3.3nMのBMP-7（354-BP, R&D Systems, Inc.）、20nMのインシュリン（Sigma-Aldrich Co. LLC.）及び1nMのT3（Sigma-Aldrich Co. LLC.）を添加した基本培地を用いて3日間前処理することで細胞分化を開始させた。コンフルエント状態の細胞は誘導カクテル（0.5mMの3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）、0.125mMのインドメタシン、5µMのデキサメタゾン、20nMのインシュリン（全てSigma-Aldrich Co. LLC.））を添加した基本培地で2日間処理された。

10

20

#### 【0189】

その後、培地を20nMのインシュリン及び1nMのT3を添加した基本培地に交換して、ATP蛍光センサータンパク質の発現ベクターのトランスフェクションを行った。分化したWT-1細胞の細胞質及びミトコンドリアのATP濃度を測定する実験には、0.4µgのMaLion Gの発現ベクターと、0.4µgのmito-MaLion Rの発現ベクターと、2µLのLipofectamine 2000（Invitrogen）とを用いてトランスフェクションを行った。分化したWT-1細胞のカルシウムイオン、cAMP及びミトコンドリア内ATPの濃度を測定する実験には、1.0µgのB-Geco（Zhao, Y.ら、Science, 333, 1888-91（2011））の発現ベクター、0.3µgのFlamindo2（Odaka, H.ら、PLoS One 9, e100252（2014））の発現ベクターと、0.2µgのmito-MaLion R発現ベクターと、2µLのLipofectamine 2000（Invitrogen）とを用いてトランスフェクションを行った。ここで、これらの蛍光タンパク質の発現ベクターは、すべてpcDNA3.1（-）ベクターを用いた。トランスフェクション後、細胞を37℃、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で12時間培養し、その後、培地を20nMのインシュリン及び1nMのT3を添加した基本培地に交換して、28℃で2日間培養した。蛍光観察実験の前に、ウシ胎仔血清やホルモンを含まない、4.5g/Lのグルコースを添加したDMEM培養で1日細胞を培養した。MaLion G及びmito-MaLion Rを用いる2波長蛍光観察は前節1. HeLa細胞の細胞内ATPの蛍光センサー測定と同じプロトコールで行った。

30

40

#### 【0190】

3波長蛍光観察は、油浸対物レンズ（PLAPO、60×1.45NA）を備えた共焦点顕微鏡（FV1000、オリンパス株式会社）で行った。B-Geco、Flamindo2及びmito-MaLion Rは、それぞれ、405nm、488nm、及び543nmのレーザー光で励起され、蛍光は、それぞれ、405-475nm、500-530nm、及び560nmを超える波長で撮像された。撮像は10秒ごとに行った。薬物刺激実験には、イソプロテレノール及びフェニレフリンの原液200µLを1.8mLの培養に添加して、それぞれ、最終濃度1µM及び10µMとした。全ての実験は、CO<sub>2</sub>イ

50

ンキュベーター付きの温度制御循環チャンバーを用いて実行された。

【0191】

図7Aは、同一視野の分化したWT-1細胞のB-Geco ( $Ca^{2+}$ イオン、青色)、Flamindo2 (cAMP、緑色)及びmito-Malio n R (ATP、赤色)の蛍光顕微鏡画像である。各コマの左上の数字は観察開始後の時間(分)を表す。図7Bは、各プローブの正規化された蛍光強度の経時的变化を示すグラフである。矢印は1  $\mu$ Mのイソプロテレノールを添加したのが観察開始5分後(図7Aでは1コマ目と2コマ目との間)であることを表す。イソプロテレノールは アドレナリン受容体のアゴニストであり、B-Gecoは $Ca^{2+}$ イオンのターン・オン型蛍光プローブ(励起波長378 nm、蛍光波長446 nm)で、Flamindo2はcAMPのターン・オフ型蛍光プローブ(励起波長504 nm、蛍光波長523 nm)である。

10

【0192】

したがって、図7A及び図7Bから、イソプロテレノールによる アドレナリン受容体の活性化にともなって、まずcAMPが増大し、少し遅れてATPが減少することがわかった。褐色脂肪細胞は、受容体の刺激によって活性化された細胞膜上のアデニル酸シクラーゼがcAMPを合成し、これがシグナル伝達となって、cAMP依存性のPKAを活性化する。その後、脂肪酸を遊離、ミトコンドリア膜上の脱共役タンパク質UCP1と作用して、ミトコンドリア膜上の膜電位のもととなるプロトン勾配を解消させることが知られている(褐色脂肪細胞の熱産生)。図7A及び図7Bの結果は、この提唱されているメカニズムに合致する。本実施例では、cAMP及びATPの蛍光プローブに加えて $Ca^{2+}$ イオンの蛍光プローブも同時に細胞内に発現させ、cAMP、ATP及び $Ca^{2+}$ イオンの同一細胞内での局在をほぼ同時に経時的に定量測定することが可能であることを実証した。そこで、褐色脂肪細胞における熱産生におけるカルシウムイオンの役割の解明には、ATP蛍光センサータンパク質が利用できると推察された。

20

【0193】

3. 線虫咽頭筋の細胞内ATPの蛍光センサー測定

ATP蛍光センサータンパク質等を発現するトランスジェニック線虫(C. elegans)の成虫は、少量のシアノアクリル酸糊(Aron Alpha A, Daiic hi-Sanky o)を用いて、3.5cmガラス底ディッシュ上に固定し、その上を厚さ0.5cmの1.7%寒天ゲルパッドで覆った。固定された線虫はM9バッファー(22mM  $KH_2PO_4$ 、86mM NaCl、42mM  $Na_2HPO_4$ 及び1mM  $MgSO_4$ )中に浸漬され、顕微鏡撮像に供された。室温は25°Cに保たれ、試料調製は30分以内に完了した。

30

【0194】

線虫の撮像は、20倍乾燥系対物レンズと、Nipkow-ディスク共焦点スキャナ(CSU-10、Yokogawa)と、電子増倍電荷結合素子(EM-CCD)カメラ(C9100-02、Hamamatsu Photonics)とを備えた倒立落射蛍光顕微鏡(Observer D1、Zeiss)を用いて行った。Malio n G及びMalio n RのNipkow-ディスク共焦点照明による撮像には、それぞれ、光励起半導体488nmレーザ(Sapphire 488LP、50mW、Coherent)及び568nmレーザ(Sapphire 568LP、50mW、Coherent)を、ダイクロミックミラー及び発光フィルターのセット(Di01-T 405/488/568/647ビームスプリッター及びFF01-524/628デュアルバンド帯域通過フィルター、Semrock)とともに用いた。レーザ光束の光路に電磁駆動シャッター(SSH-C4RA、Sigma koki CO., LTD.)を配置して、該シャッターの開閉は前記EM-CCDカメラと同期し、MetaMorphソフトウェア(Molecular Devices, LLC)が制御した。露出時間は100ミリ秒であった。撮像は10秒ごとに30分間行った。線虫の麻酔は、撮像開始5分後に0.5%の1-フェノキシ-2-プロパノールを含むM9生理食塩水を適用して行った。

40

【0195】

50



図 8 A 及び図 8 B は、線虫咽頭筋の細胞質及びミトコンドリアの A T P 濃度の経時的変化の同時測定結果を示すグラフで、矢印は、麻酔剤として 0 . 5 % の 1 - フェノキシ - 2 - プロパノールを含む ( 図 8 A ) 又は含まない ( 図 8 B ) M 9 生理食塩水を観察開始 5 分後に投与したことを表す。

【 0 1 9 6 】

図 8 A から、線虫咽頭筋の細胞質 A T P 濃度は麻酔剤投与の直後から急激に低下し、麻酔剤投与の 3 0 秒後には正規化蛍光強度は麻酔剤投与時の 2 0 % まで低下した。これに対しミトコンドリア A T P 濃度は、ゆっくりと低下して、正規化蛍光強度が麻酔剤投与時の 2 0 % まで低下するのは麻酔剤投与の 3 分後であった。この結果から、麻酔剤はミトコンドリアでの A T P 産生をまず阻害し、これにともなって、細胞質の A T P が低下したと考えられる。

10

図 8 B から、線虫咽頭筋の A T P 濃度は、細胞質でもミトコンドリアでも、対照の M 9 生理食塩水投与直後に大きい変化は認められなかった。正規化蛍光強度は観測開始から 5 分間で、ミトコンドリアで 8 0 % に、細胞質で 6 0 % まで低下した。これは、紫外線レーザー照射による線虫の疲労のためミトコンドリアでの A T P 産生が低下し、これに伴って細胞質の A T P 濃度も低下したことが考えられる。本実施例は、単一動物個体内の同一細胞内の A T P 動態を異なるオルガネラで同時観察した世界で初めての例であり、本発明がなければ成し得なかったものである。A T P センサーを恒常的に発現している線虫を用いることで、A T P 合成を阻害する薬物スクリーニングツール、つまり、抗がん剤や毒性スクリーニングの有用なツールとして利用できる可能性がある。

20

【 0 1 9 7 】

[ 実施例 5 ] c G M P 特異的蛍光センサータンパク質の構築

1 . c G M P 蛍光センサータンパク質の設計

c G M P 蛍光センサータンパク質は、c G M P 結合ドメインとして P h o s p h o d i e s t e r a s e 5 ( P D E 5 ) を用い、蛍光タンパク質として、C i t r i n e ( G r i e s b e c k , O . 5 , J . B i o l . C h e m . 2 7 6 , 2 9 1 8 8 - 2 9 1 9 4 ( 2 0 0 1 ) ) を用いた。蛍光タンパク質 C i t r i n e の励起波長は、4 9 0 n m で、発光波長域は、5 0 5 ~ 6 5 0 n m である。P D E 5 のアミノ末端及びカルボキシル末端にさまざまなポリペプチドリンカーを連結して、蛍光タンパク質 C i t r i n e の内部に挿入した融合タンパク質を、c G M P 蛍光センサータンパク質の候補タンパク質として作製した ( c G u l l シリーズと称する場合がある。 ) 。

30

【 0 1 9 8 】

c G M P 蛍光センサーの候補タンパク質のドメイン及びリンカーの構成は以下のとおりである。まず、c G M P と特異的に結合するドメインを「c G M P 結合ドメイン」と称する場合がある。c G M P 結合ドメインは、P D E 5 に由来し、そのアミノ酸配列は配列番号 2 1 として配列表に列挙する。c G M P 結合ドメインのアミノ末端に連結するポリペプチドリンカーを「N 末端側リンカー」、c G M P 結合ドメインのカルボキシル末端に連結するポリペプチドリンカーを「C 末端側リンカー」と称する場合がある。

【 0 1 9 9 】

したがって、c G u l l シリーズの c G M P 蛍光センサーの候補タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[ C i t r i n e - N ドメイン ] - [ N 末端側リンカー ] - [ c G M P 結合ドメイン ] - [ C 末端側リンカー ] - [ C i t r i n e - C ドメイン ] の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリンカーが配置される。

40

【 0 2 0 0 】

c G M P 蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築の手順としては、c G M P 結合ドメインとして、P D E 5 をコードするポリヌクレオチドを合成した ( I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s , 株式会社医学生物学研究所 ) 以外は、実施例 1 の「A T P 蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築」と同様の方法を用いて行った。最終濃度 1 0 0 μ M の c G M P の存在下又は非存在下で、各クローンの c G M P 蛍光センサーの候補タンパク質の蛍光特性を蛍光分光光度計 ( 日立 F - 2 7 0 0 , 株式

50

会社日立ハイテクサイエンス)を用いて測定した。

#### 【0201】

詳細は省略するが、N末端側リンカー及びC末端側リンカーのアミノ酸配列がそれぞれ配列番号31及び32のとき、ダイナミックレンジが6.5倍となり、cGMP存在下での蛍光強度が最も大きいcGMP蛍光センサータンパク質が得られた。

この最もダイナミックレンジが大きい候補タンパク質をcGul1と命名した。cGul1の全長アミノ酸配列を配列番号12に示す。

#### 【0202】

図9Aは、100 $\mu$ MのcGMP存在下及び非存在下でのcGul1の蛍光スペクトル図である。図9Aの横軸は、蛍光波長を表し、縦軸は蛍光強度の相対値を表す。グラフの実線及び点線は、cGMP存在下及び非存在下でのスペクトル曲線を表す。

図9Aから明らかとなり、cGul1はcGMP非存在下と比較して100 $\mu$ MのcGMP存在下での蛍光が、それぞれ、550%も増大した。

#### 【0203】

##### 2. HeLa細胞の細胞内cGMPの蛍光センサー測定

実施例4と同様の方法を用いて、HeLa細胞にcGMP蛍光センサータンパク質を含む発現ベクターを導入した。次いで、蛍光測定の直前に培地をフェノールレッド不含増殖培地(1mM 8-Br-cGMP含有)に交換した。蛍光顕微鏡測定には、冷却CCDカメラ(Cool SNAP HQ2、Photometrics)及び油浸対物レンズ(Plan Apo 60 $\times$ 1.42 NA)を備えた倒立顕微鏡(IX81、オリンパス株式会社)を用いた。

細胞質cGMP産生阻害実験には一酸化窒素供与体であるSNAP(S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine)を用いた。1.5mLの増殖培地中でHeLa細胞を培養しているディッシュにSNAPを添加してSNAPの最終濃度を300 $\mu$ Mにした。細胞の蛍光顕微鏡画像は5分ごとに撮影した。カメラ及びフィルターの制御と、データ記録には、MetaFluorソフトウェア(Molecular Devices, LLC)を用いた。単色蛍光撮像には、励起フィルターにFF01-500/24を、ダイクロイックミラーにDi02-FF520を、発光フィルターにFF01-542/27を用いた(全てSemrock、株式会社オプトライン)。全ての実験は、CO<sub>2</sub>インキュベーター付きの温度制御循環チャンバーを用いて実行した。

#### 【0204】

図9Bは、cGul1を発現させたHeLa細胞に8-Br-cGMP(1mM)又は一酸化窒素供与体であるSNAP(300 $\mu$ M)を投与での蛍光顕微鏡画像撮影開始から20分後までの蛍光の変化を示す画像である。

また、図9Cは、cGul1を発現させたHeLa細胞に8-Br-cGMP(1mM)又は一酸化窒素供与体であるSNAP(300 $\mu$ M)を投与での蛍光顕微鏡画像撮影開始から20分後までの蛍光の変化を示すグラフである。図9Cでは、縦軸は正規化した蛍光強度を表し、横軸は時間(分)を表す。各図の薄い灰色の2又は3本の波形は、異なる2又は3個のディッシュでの測定値を示し、濃い灰色の1本の波形はこれら3本の波形の平均値を示す。

#### 【0205】

ターン・オン型のcGMP蛍光センサーcGul1では、8-Br-cGMP添加から5分後まで蛍光強度が上昇し維持されたのに対し、SNAP添加から20分後まで蛍光強度が緩やかに上昇した。これは細胞内のcGMP産生が一部阻害されたことを意味する。

#### 【0206】

##### [実施例6] cAMP特異的蛍光センサータンパク質の構築

##### 1. cAMP蛍光センサータンパク質の設計

cAMP蛍光センサータンパク質は、cAMP結合ドメインとしてexchange factor directly activated by cAMP 1(EFAC

10

20

30

40

50

1) を用い、蛍光タンパク質として、mApple (Shaner, N. C. ら、Nature Methods 5: 545 - 551 (2008)) を用いた。なお、mApple は、Zhao, Y. ら (Science. 333, 1888 - 1891 (2011)) を参照して数カ所にアミノ酸置換変異を導入した (配列番号 7 及び 8)。蛍光タンパク質 mApple の励起波長は、550 nm で、発光波長域は、575 ~ 700 nm である。EPAC1 のアミノ末端及びカルボキシル末端にさまざまなポリペプチドリンカーを連結して、蛍光タンパク質 mApple の内部に挿入した融合タンパク質を、cAMP 蛍光センサータンパク質の候補タンパク質として作製した (Pink Flamingo シリーズと称する場合がある。 )。

#### 【0207】

cAMP 蛍光センサーの候補タンパク質のドメイン及びリンカーの構成は以下のとおりである。まず、cAMP と特異的に結合するドメインを「cAMP 結合ドメイン」と称する場合がある。cAMP 結合ドメインは、EPAC1 に由来し、そのアミノ酸配列は配列番号 20 として配列表に列挙する。cAMP 結合ドメインのアミノ末端に連結するポリペプチドリンカーを「N 末端側リンカー」、cAMP 結合ドメインのカルボキシル末端に連結するポリペプチドリンカーを「C 末端側リンカー」と称する場合がある。

#### 【0208】

したがって、Pink Flamingo シリーズの cAMP 蛍光センサーの候補タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[mApple - N ドメイン] - [N 末端側リンカー] - [cAMP 結合ドメイン] - [C 末端側リンカー] - [mApple - C ドメイン] の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリンカーが配置される。

#### 【0209】

cAMP 蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築の手順としては、cAMP 結合ドメインとして、EPAC1 をコードするポリヌクレオチドを合成した (Integrated DNA Technologies、株式会社医学生物学研究所) 以外は、実施例 1 の「ATP 蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築」と同様の方法を用いて行った。最終濃度 100  $\mu$ M の cAMP の存在下又は非存在下で、各クローン of cAMP 蛍光センサーの候補タンパク質の蛍光特性を蛍光分光光度計 (日立 F - 2700、株式会社日立ハイテクサイエンス) を用いて測定した。

#### 【0210】

詳細は省略するが、N 末端側リンカー及び C 末端側リンカーのアミノ酸配列がそれぞれ配列番号 33 及び 34 のとき、ダイナミックレンジが 4.5 倍となり、cAMP 存在下での蛍光強度が最も大きい cAMP 蛍光センサータンパク質が得られた。

この最もダイナミックレンジが大きい候補タンパク質を Pink Flamingo と命名した。Pink Flamingo の全長アミノ酸配列を配列番号 13 に示す。

#### 【0211】

図 10A は、100  $\mu$ M の cAMP 存在下及び非存在下での Pink Flamingo の蛍光スペクトル図である。図 10A の横軸は、蛍光波長を表し、縦軸は蛍光強度の相対値を表す。グラフの実線及び点線は、cAMP 存在下及び非存在下でのスペクトル曲線を表す。

図 10A から明らかとなっており、Pink Flamingo は cAMP 非存在下と比較して 100  $\mu$ M の cAMP 存在下での蛍光が、それぞれ、350% も増大した。

#### 【0212】

### 2. HeLa 細胞の細胞内 cGMP の蛍光センサー測定

実施例 4 と同様の方法を用いて、HeLa 細胞に cAMP 蛍光センサータンパク質を含む発現ベクターを導入した。次いで、蛍光測定の直前に培地をフェノールレッド不含増殖培地 (アデニル酸シクラーゼ活性剤である Forskolin 100  $\mu$ M 含有) に交換した。蛍光顕微鏡測定には、冷却 CCD カメラ (Cool SNAP HQ2、Photometrics) 及び油浸対物レンズ (Plan Apo 60x1.42 NA) を

10

20

30

40

50

備えた倒立顕微鏡 (IX81、オリンパス株式会社) を用いた。

細胞質 cAMP 産生阻害実験にはホスホジエステラーゼ阻害剤である IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) を用いた。1.5 mL の増殖培地中で HeLa 細胞を培養しているディッシュに IBMX を添加して IBMX の最終濃度を 500  $\mu$ M にした。細胞の蛍光顕微鏡画像は 5 分ごとに撮影した。カメラ及びフィルターの制御と、データ記録には、MetaFluor ソフトウェア (Molecular Devices, LLC) を用いた。単色蛍光撮像には、励起フィルターに BP535-555HQ を、ダイクロイックミラーに DM565HQ を、発光フィルターに BA570-625HQ を用いた (全てオリンパス株式会社)。全ての実験は、CO<sub>2</sub> インキュベーター付きの温度制御循環チャンバーを用いて実行した。

10

#### 【0213】

図 10B は、Pink Flamindo を発現させた HeLa 細胞に Forskolin (100  $\mu$ M) 又は IBMX (500  $\mu$ M) を投与での蛍光顕微鏡画像撮影開始から 20 分後までの蛍光の変化を示す画像である。

また、図 10C は、Pink Flamindo を発現させた HeLa 細胞に Forskolin (100  $\mu$ M) 又は IBMX (500  $\mu$ M) を投与での蛍光顕微鏡画像撮影開始から 20 分後までの蛍光の変化を示すグラフである。図 9C では、縦軸は正規化した蛍光強度を表し、横軸は時間 (分) を表す。各図の薄い灰色の 3 本の波形は、異なる 3 個のディッシュでの測定値を示し、濃い灰色の 1 本の波形はこれら 3 本の波形の平均値を示す。

20

#### 【0214】

ターン・オン型の cAMP 蛍光センサー Pink Flamindo では、Forskolin 添加から 3 分後まで蛍光強度が急激に上昇し徐々に減少したのに対し、IBMX 添加から 20 分後まで蛍光強度が緩やかに上昇した。これは細胞内の cAMP 産生が一部阻害されたことを意味する。

#### 【0215】

[実施例 7] BGP 特異的蛍光センサータンパク質の構築

##### 1. BGP 蛍光センサータンパク質の設計

オステオカルシン (osteocalcin、bone Gla protein (BGP)) の細胞内での局在を観察するために、BGP 蛍光センサータンパク質を設計した。

30

BGP 蛍光センサータンパク質は、BGP 結合ドメインとして抗 BGP 抗体を用い、蛍光タンパク質として、GFP (Griesbeck, O. ら、(J. Biol. Chem. 276, 29188-29194 (2001))) を用いた。蛍光タンパク質 GFP の励起波長は、480 nm で、発光波長域は、500 ~ 520 nm である。また、GFP の N 末端側 1 番目から 144 番目までのアミノ酸残基からなるドメインを「GFP-N ドメイン」、GFP の N 末端側から 145 番目から 238 番目までのアミノ酸残基からなるドメインを「GFP-C ドメイン」と称する場合がある。GFP-N ドメインのアミノ酸配列は配列番号 3、GFP-C ドメインのアミノ酸配列は配列番号 4 としてそれぞれ配列表に列挙する。GFP-C ドメインのアミノ末端及び GFP-N ドメインのカルボキシル末端にさまざまなポリペプチドリンカーを連結して、抗 BGP 抗体の重鎖と軽鎖との間に挿入した融合タンパク質を、BGP 蛍光センサータンパク質の候補タンパク質として作製した (gBGP シリーズと称する場合がある。)

40

#### 【0216】

BGP 蛍光センサーの候補タンパク質のドメイン及びリンカーの構成は以下のとおりである。まず、BGP と特異的に結合するドメインを「BGP 結合ドメイン」と称する場合がある。BGP 結合ドメインは、抗 BGP 抗体に由来し、そのアミノ酸配列は配列番号 22 (重鎖) 及び 23 (軽鎖) として配列表に列挙する。GFP-C ドメインのアミノ末端に連結するポリペプチドリンカーを「N 末端側リンカー」、GFP-C ドメインのカルボキシル末端及び GFP-N ドメインのアミノ末端に結合するポリペプチドリンカーを「中

50

間リンカー」、GFP-Nドメインのカルボキシル末端に連結するポリペプチドリッカーを「C末端側リンカー」と称する場合がある。

【0217】

したがって、gBGPシリーズのBGP蛍光センサーの候補タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[抗BGP抗体の重鎖]-[N末端側リンカー]-[GFP-Cドメイン]-[中間リンカー]-[GFP-Nドメイン]-[C末端側リンカー]-[抗BGP抗体の軽鎖]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリッカーが配置される。

【0218】

BGP蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築の手順としては、BGP結合ドメインとして、抗BGP抗体の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ合成した(Integrated DNA Technologies、株式会社医学生物学研究所)以外は、実施例1の「ATP蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築」と同様の方法を用いて行った。最終濃度100 $\mu$ MのBGP7Cの存在下又は非存在下で、各クローンのBGP蛍光センサーの候補タンパク質の蛍光特性を蛍光分光光度計(日立F-2700、株式会社日立ハイテクサイエンス)を用いて測定した。

10

【0219】

詳細は省略するが、N末端側リンカー、中間リンカー、及びC末端側リンカーのアミノ酸配列がそれぞれ配列番号35、36、及び37のとき、ダイナミックレンジが4.0倍となり、BGP7C存在下での蛍光強度が最も大きいBGP蛍光センサータンパク質が得られた。

20

この最もダイナミックレンジが大きい候補タンパク質をgBGPと命名した。gBGPの全長アミノ酸配列を配列番号14に、塩基配列を配列番号50に示す。

【0220】

図11Aは、100 $\mu$ MのBGP7C存在下及び非存在下でのgBGPの励起/蛍光スペクトル図である。図11Aの横軸は、励起波長及び蛍光波長を表し、縦軸は蛍光強度の相対値を表す。グラフの実線及び点線は、BGP7C存在下及び非存在下でのスペクトル曲線を表す。

図11Aから明らかとなり、gBGPはBGP7C非存在下と比較して100 $\mu$ MのBGP7C存在下での蛍光が、それぞれ、300%も増大した。

30

【0221】

図11Bは、gBGPの蛍光強度のリガンド特異性及びBGP7C濃度依存的変化を示すグラフである。図11Bの横軸は、BGP7C又は対照であるMycの濃度を表し、縦軸は蛍光強度の相対値を表す。

図11Bから明らかとなり、gBGPの蛍光強度はBGP7Cの濃度により依存的に変化することが示された。

【0222】

2. HeLa細胞の細胞内BGPの蛍光センサー測定

まず、細胞膜局在性ペプチド(配列番号42)及びmCherryが結合したBGP7C(以下、「PMmCherry-BGP7C」と称する場合がある。)並びに、核局在性ペプチド(配列番号43)及びmCherryが結合したBGP7C(以下、「NLsmCherry-BGP7C」と称する場合がある。)を発現するベクターを調製した。

40

次いで、実施例4と同様の方法を用いて、HeLa細胞にBGP蛍光センサータンパク質を含む発現ベクター又はGFPのみを含む発現ベクター、及びPMmCherry-BGP7C、又はNLsmCherry-BGP7Cを含む発現ベクターを導入した。次いで、蛍光測定の直前に培地をフェノールレッド不含増殖培地に交換した。測定には、共焦点レーザー顕微鏡(FV1000、オリンパス株式会社)を用いた。レーザーの波長は、488nm及び543nmであり、500~530nm、及び560nmを超える波長で撮像された。

【0223】

50

図11Cは、gBGP又はGFP、及び細胞膜局在性mCherry-BGP7C又は細胞膜局在性mCherryを発現させたHeLa細胞での蛍光を示す画像である。

また、図11Dは、gBGP又はGFP、及び核局在性mCherry-BGP7C又は細胞膜局在性mCherryを発現させたHeLa細胞での蛍光を示す画像である。

【0224】

ターン・オン型のBGP蛍光センサーgBGPでは、PMmCherry-BGP7Cとともに導入した場合には、細胞膜上での局在が観察され、NLSmCherry-BGP7Cとともに導入した場合には、核内での局在が観察された。

【0225】

[実施例8] HSA特異的蛍光センサータンパク質の構築

1. HSA蛍光センサータンパク質の設計

ヒト血清アルブミン(Human Serum Albumin; HSA)蛍光センサータンパク質を設計した。

HSA蛍光センサータンパク質は、HSA結合ドメインとして抗HSA抗体を用い、蛍光タンパク質として、GFP(Griesbeck, O.ら、(J. Biol. Chem. 276, 29188-29194 (2001)))を用いた。蛍光タンパク質GFPの励起波長は、480nmで、発光波長域は、500~520nmである。また、GFPのN末端側1番目から144番目までのアミノ酸残基からなるドメインを「GFP-Nドメイン」、GFPのN末端側から145番目から238番目までのアミノ酸残基からなるドメインを「GFP-Cドメイン」と称する場合がある。GFP-Nドメインのアミノ酸配列は配列番号3、GFP-Cドメインのアミノ酸配列は配列番号4としてそれぞれ配列表に列挙する。GFP-Cドメインのアミノ末端及びGFP-Nドメインのカルボキシル末端にさまざまなポリペプチドリンカーを連結して、抗HSA抗体の重鎖と軽鎖との間に挿入した融合タンパク質を、HSA蛍光センサータンパク質の候補タンパク質として作製した(gHSAシリーズと称する場合がある。)

【0226】

HSA蛍光センサーの候補タンパク質のドメイン及びリンカーの構成は以下のとおりである。まず、HSAと特異的に結合するドメインを「HSA結合ドメイン」と称する場合がある。HSA結合ドメインは、抗HSA抗体に由来する。GFP-Cドメインのアミノ末端に連結するポリペプチドリンカーを「N末端側リンカー」、GFP-Cドメインのカルボキシル末端及びGFP-Nドメインのアミノ末端に結合するポリペプチドリンカーを「中間リンカー」、GFP-Nドメインのカルボキシル末端に連結するポリペプチドリンカーを「C末端側リンカー」と称する場合がある。

【0227】

したがって、gHSAシリーズのHSA蛍光センサーの候補タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端の向きに、[抗HSA抗体の重鎖]-[N末端側リンカー]-[GFP-Cドメイン]-[中間リンカー]-[GFP-Nドメイン]-[C末端側リンカー]-[抗HSA抗体の軽鎖]の順にポリペプチドドメイン及びポリペプチドリンカーが配置される。

【0228】

HSA蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築の手順としては、HSA結合ドメインとして、抗HSA抗体の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ合成した(Integrated DNA Technologies、株式会社医学生物学研究所)以外は、実施例1の「ATP蛍光センサータンパク質の候補タンパク質の構築」と同様の方法を用いて行った。最終濃度2 $\mu$ MのHSAの存在下又は非存在下で、各クローンのHSA蛍光センサーの候補タンパク質の蛍光特性を蛍光分光光度計(日立F-2700、株式会社日立ハイテクサイエンス)を用いて測定した。

【0229】

詳細は省略するが、N末端側リンカー、中間リンカー、及びC末端側リンカーのアミノ酸配列がそれぞれ、「LE」(Leu-Glu)、「GGTGG」(配列番号53)、

10

20

30

40

50

及び「TR」(Thr - Arg)のとき、ダイナミックレンジが1.2倍となり、HSA存在下での蛍光強度が最も大きいHSA蛍光センサータンパク質が得られた。

この最もダイナミックレンジが大きい候補タンパク質をgHSAと命名した。gHSAの全長アミノ酸配列を配列番号51に、塩基配列を配列番号52に示す。

【0230】

図12は、2µMのHSA存在下及び非存在下でのgHSAの蛍光スペクトル図である。図12の横軸は、蛍光波長を表し、縦軸は蛍光強度の相対値を表す。グラフの実線及び点線は、HSA存在下及び非存在下でのスペクトル曲線を表す。

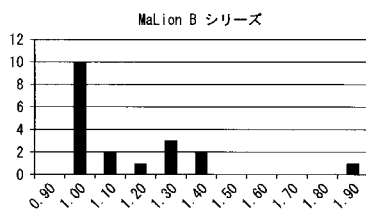
図12から明らかとなり、gHSAはHSA非存在下と比較して2µMのHSA存在下での蛍光が、20%も増大した。

【産業上の利用可能性】

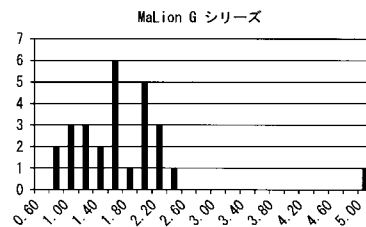
【0231】

本発明によれば、検出するリガンドの種類を選ばず、高感度なりガンド蛍光センサータンパク質を提供することができる。本発明によれば、生理学的条件下で高濃度のリガンドの存在下での蛍光強度とリガンド非存在下での蛍光強度の比が十分に高く、細胞又は非ヒト生物の生理学的及び/又は病理学的なりガンドの濃度の変動を検出することができる。

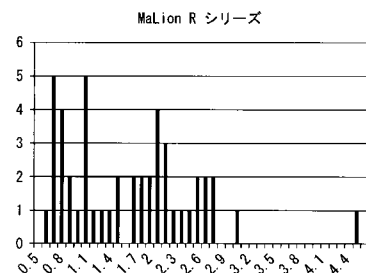
【図1A】



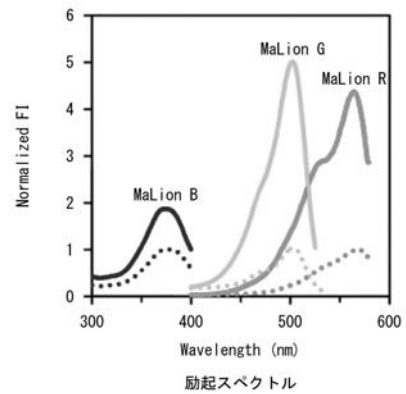
【図1B】



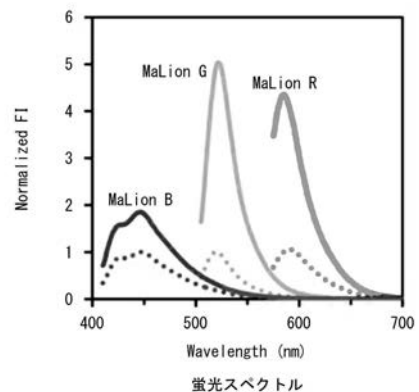
【図1C】



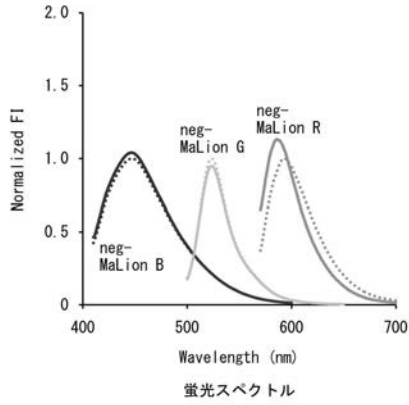
【図2A】



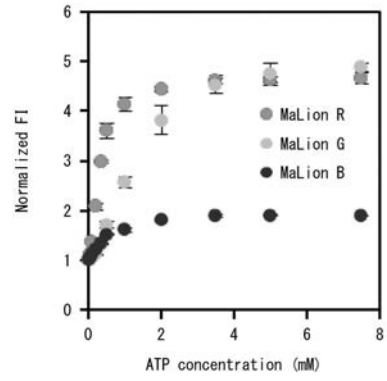
【図2B】



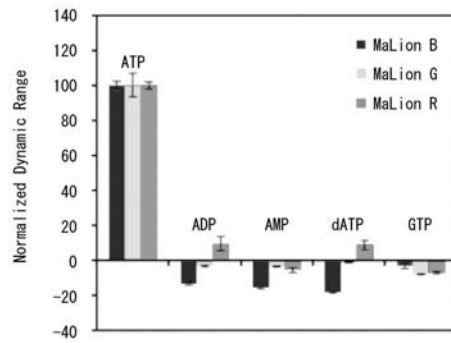
【 図 2 C 】



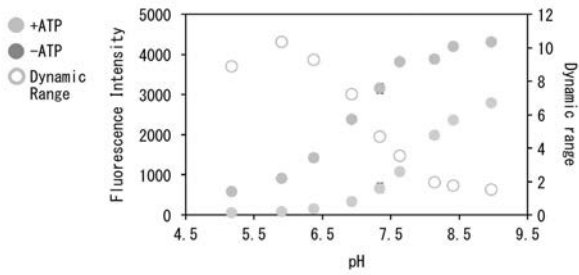
【 図 3 A 】



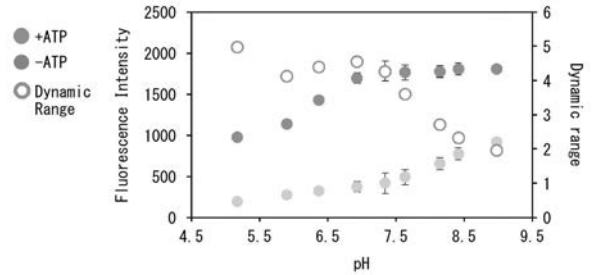
【 図 3 B 】



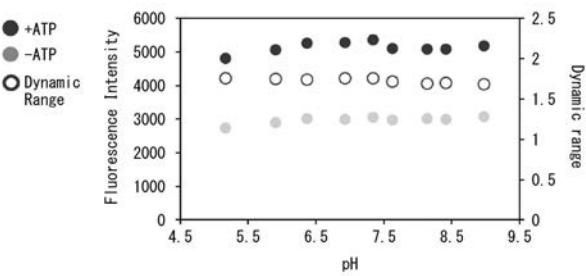
【 図 4 A 】



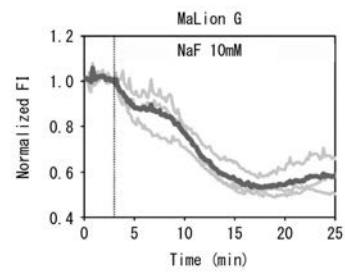
【 図 4 C 】



【 図 4 B 】

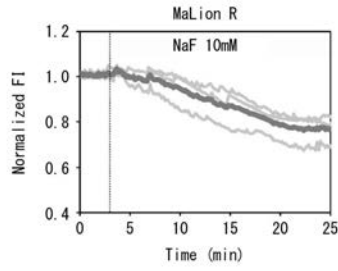


【 図 5 A 】

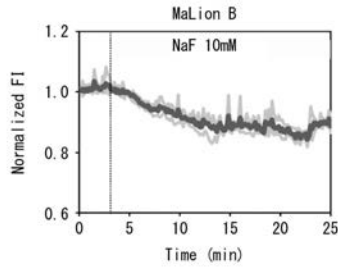




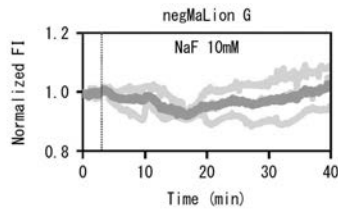
【 図 5 B 】



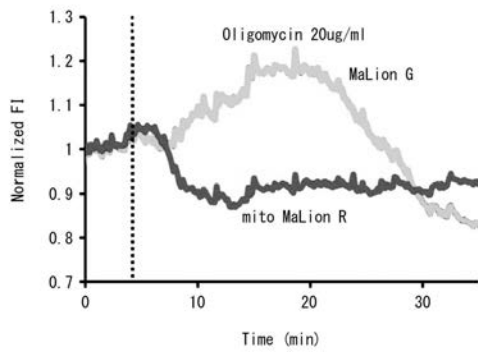
【 図 5 C 】



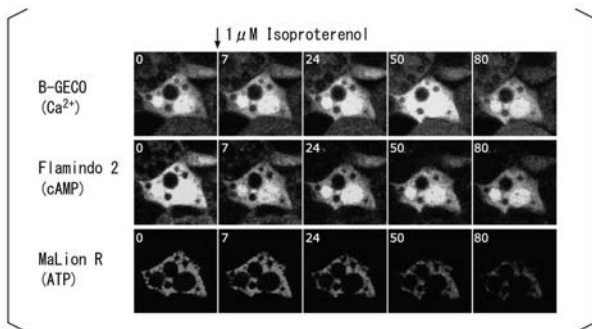
【 図 5 D 】



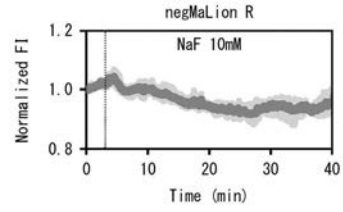
【 図 6 】



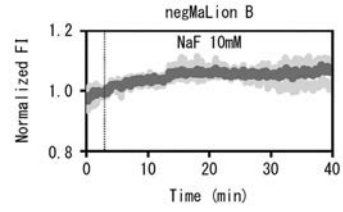
【 図 7 A 】



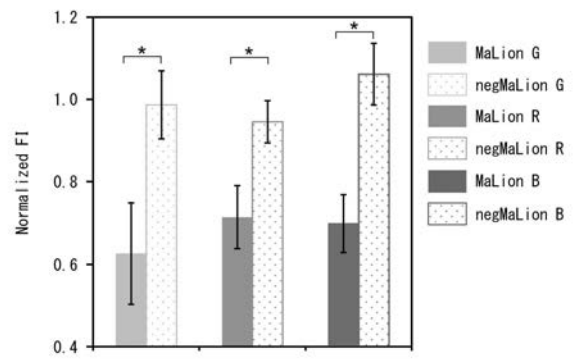
【 図 5 E 】



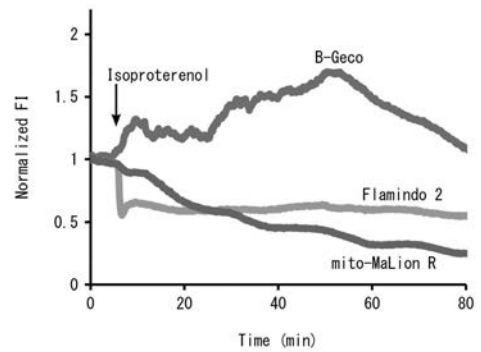
【 図 5 F 】



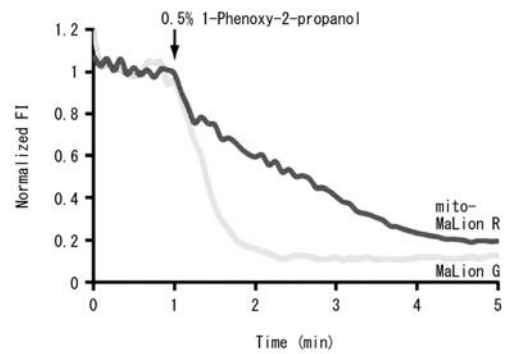
【 図 5 G 】



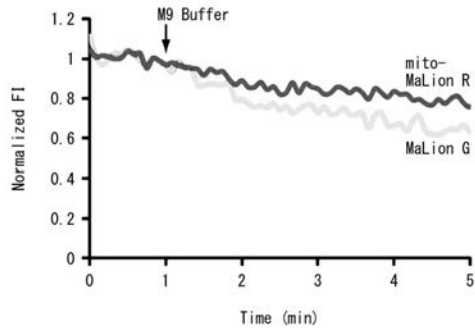
【 図 7 B 】



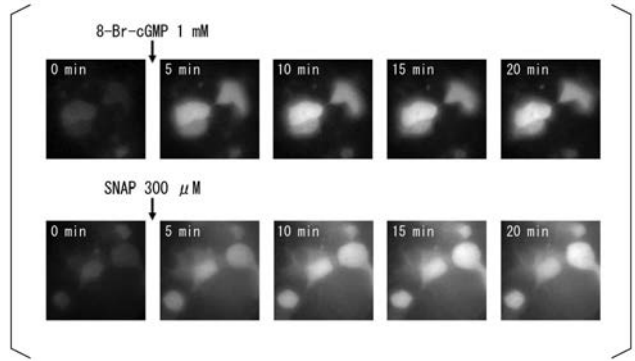
【 図 8 A 】



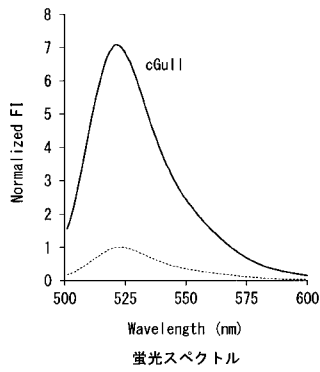
【 図 8 B 】



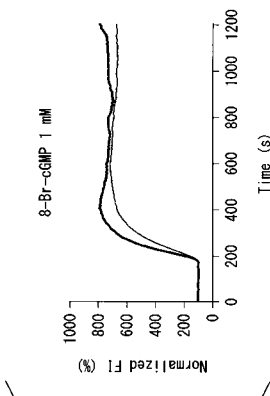
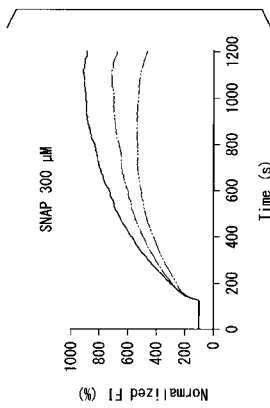
【 図 9 B 】



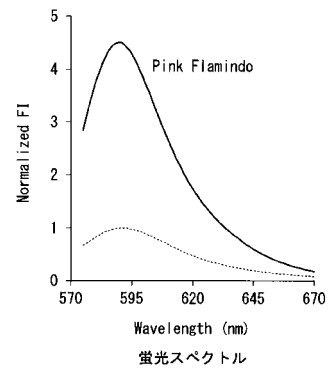
【 図 9 A 】



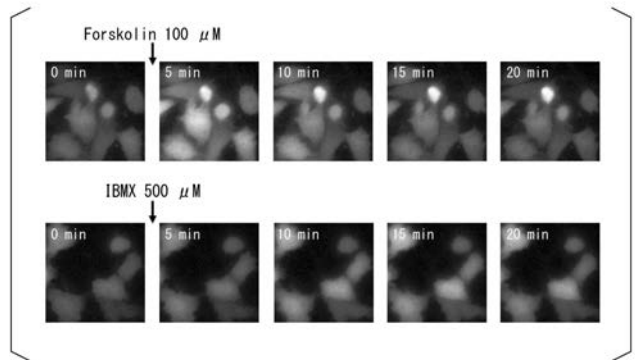
【 図 9 C 】



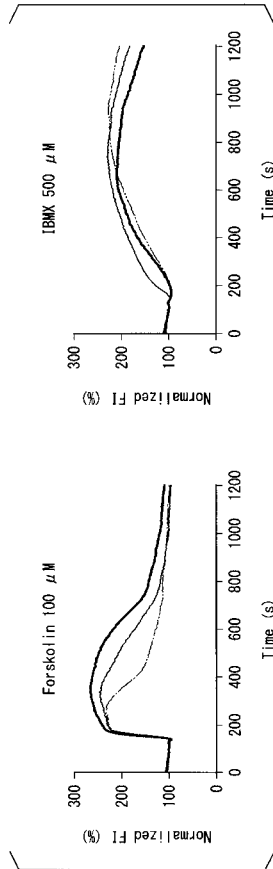
【 図 10 A 】



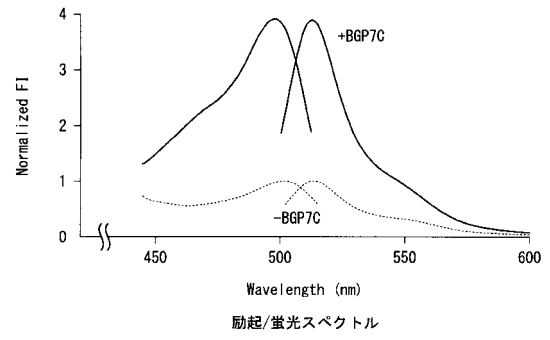
【 図 10 B 】



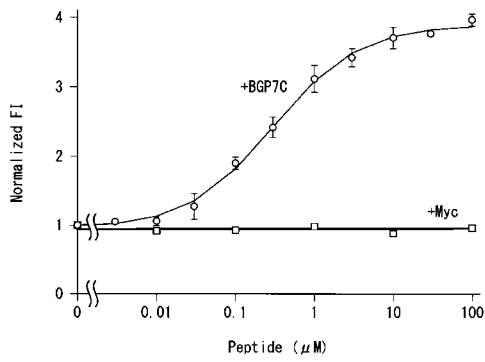
【 図 1 0 C 】



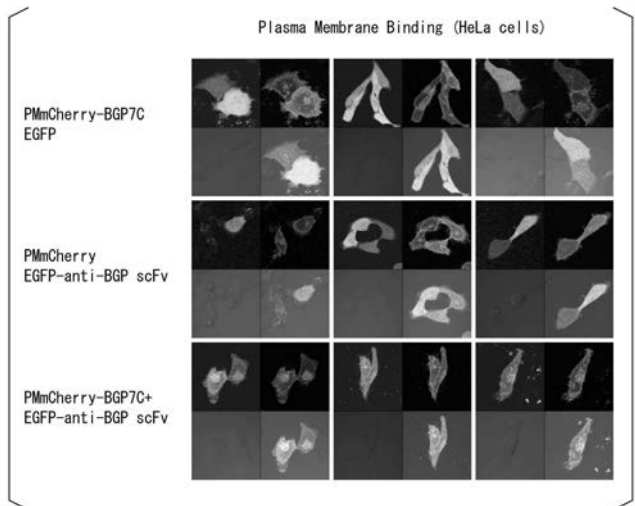
【 図 1 1 A 】



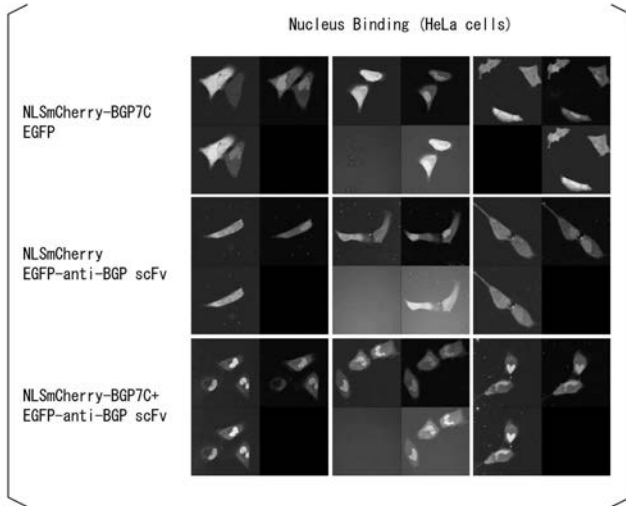
【 図 1 1 B 】



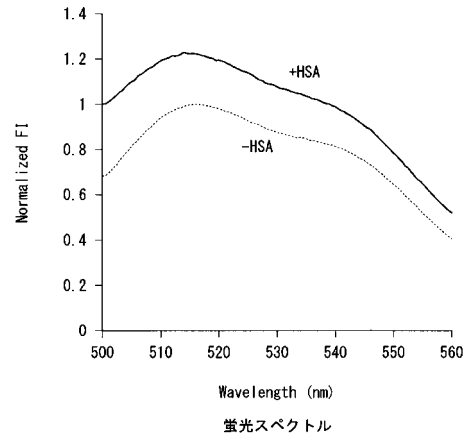
【 図 1 1 C 】



【 図 1 1 D 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2017094885000001.app

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2016/085902
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C07K14/435, C07K17/00, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX (STN), PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	BATRD, Geoffrey, S., ZACHARIAS, David, A., and TSIEN, Roger, Y., Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999.09, Vol. 96, p.11241-11246, particularly, summary, material and method, page 11243, left column, 2nd paragraph, lines 16 to 19, page 11244, right column, lowest paragraph to page 11245, right column, 1st paragraph, fig. 1 to 2, 4 to 5	1,3,10-23/ 1-29
X/Y	KITAGUCHI, Tetsuya et al., Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells, Biochem. J., 2013, Vol.450, p.365-373, particularly, summary, 'EXPERIMENTAL', 'Results', 1st paragraph, fig. 1 to 6	1-3,5-7, 9-23/1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 February 2017 (24.02.17)		Date of mailing of the international search report 07 March 2017 (07.03.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085902

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	ODAKA, Haruki et al., Genetically-Encoded Yellow Fluorescent cAMP Indicator with an Expanded Dynamic Range for Dual-Color Imaging, PLOS ONE, 2014.06, Vol.9, Issue 6, e100252, particularly, summary, page 2, left column, 4th paragraph to right column, 1st paragraph, 'Results', 1st paragraph, fig. 1 to 4	1-3,5-7, 9-23/1-29
X/Y	Jun'ichi NAKAI, Masamichi OKURA, "GFP o Mochiita Keiko Calcium Probe G-CaMP no Kaihatsu", Comparative Physiology and Biochemistry, vol.19, no.2, 2002, pages 135 to 145, particularly, summary, fig. 1 to 4, 5 to 8	1-2,6,11, 13-23/1-29
X/Y	Wang, Jing, W. et al., Two-Photon Calcium Imaging Reveals an Odor-Evoked Map of Activity in the Fly Brain, Cell, 2003.01.24, Vol.112, p.271-282, particularly, summary	1-2,6,10-23, /1-29
Y	WO 2015/060430 A1 (The Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology), 30 April 2015 (30.04.2015), claim 4 & US 2016/0305933 A1 claim 4	1-29
Y	TANIMURA, Akihiko, Development and application of fluorescent protein-based indicators for live cell imaging, Journal of Oral Biosciences, 2015.04.07, Vol. 57, p.54-60, particularly, fig. 4	1-29
Y	WO 2015/108102 A1 (National University Corporation Gunma University), 23 July 2015 (23.07.2015), claims 1 to 3, 6 to 9; paragraphs [0007] to [0009]; examples (Family: none)	1-29
Y	BISWAS, Kabir, Hassan, SOPORY, Shailaja, and VISWESWARIAH, Sandhya, S., The GAF DOMAIN of the cGMP-Binding, cGMP-Specific Phosphodiesterase (PDE5) Is a Sensor and a Sink for cGMP, Biochemistry, 2008, Vol.47, p.3534-3543, particularly, summary, fig. 1 to 8	1-29

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 5 9 0 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C07K14/435, C07K17/00, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX (STN), PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X /Y	BAIRD, Geoffrey, S., ZACHARIAS, David, A., and TSIEN, Roger, Y., Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999.09, Vol. 96, , p.11241-11246, 特に要旨, 材料と方法, 第11243頁左欄第2段落の第16-19行, 第 11244頁右欄最下段落-第11245頁右欄第1段落, 図1-2, 4-5	1, 3, 10-23 /1-29	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 24.02.2017		国際調査報告の発送日 07.03.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 坂崎 恵美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 6115

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 5 9 0 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X /Y	KITAGUCHI, Tetsuya et al., Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells, Biochem. J., 2013, Vol.450, p.365-373, 特に要旨, 「EXPERIMENTAL」, 「結果」の第1段落, 図1-6	1-3, 5-7, 9-23 /1-29
X /Y	ODAKA, Haruki et al., Genetically-Encoded Yellow Fluorescent cAMP Indicator with an Expanded Dynamic Range for Dual-Color Imaging, PLOS ONE, 2014.06, Vol.9, Issue 6, e100252, 特に要旨, 第2頁左欄第4段落-右欄第1段落, 「結果」の第1段落, 図1-4	1-3, 5-7, 9-23 /1-29
X /Y	中井淳一, 大倉正道, G F Pを用いた蛍光カルシウムプローブG-C a M Pの開発, 比較生理生化学, Vol.19, No.2, 2002, p.135-145, 特に要旨, 図1-4, 5-8	1-2, 6, 11, 13-23 /1-29
X /Y	Wang, Jing, W. et al., Two-Photon Calcium Imaging Reveals an Odor-Evoked Map of Activity in the Fly Brain, Cell, 2003.01.24, Vol.112, p.271-282, 特に要旨	1-2, 6, 10-23, /1-29
Y	WO 2015/060430 A1 (地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター) 2015.04.30, 請求項4 & US 2016/0305933 A1, 請求項4	1-29
Y	TANIMURA, Akihiko, Development and application of fluorescent protein-based indicators for live cell imaging, Journal of Oral Biosciences, 2015.04.07, Vol. 57, p.54-60, 特に図4	1-29
Y	WO 2015/108102 A1 (国立大学法人 群馬大学) 2015.07.23, 請求項1-3, 6-9, 段落[0007]-[0009], 実施例 (ファミリーなし)	1-29
Y	BISWAS, Kabir, Hassan, SOPORY, Shailaja, and VISWESWARIAH, Sandhya, S., The GAF DOMAIN of the cGMP-Binding, cGMP-Specific Phosphodiesterase (PDE5) Is a Sensor and a Sink for cGMP, Biochemistry, 2008, Vol.47, p.3534-3543, 特に要旨, 図1-8	1-29



## 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 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q 1/6811 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6811	Z
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 7 5
	G 0 1 N	33/53	S

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

(72) 発明者 北口 哲也  
シンガポール共和国 11 バイオポリスウェイ、 5階2号室 ヘリオス、 早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所内

(72) 発明者 新井 敏  
シンガポール共和国 11 バイオポリスウェイ、 5階2号室 ヘリオス、 早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所内

(72) 発明者 上田 宏  
神奈川県横浜市緑区長津田町4259 R1-18 東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所内

Fターム(参考) 4B063 QQ05 QQ41 QQ67 QQ70 QQ79 QR33 QR48 QR80 QS05 QX02  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 BA02 CA46  
4H045 AA30 BA10 BA41 CA50 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。