

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年7月19日(19.07.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/096384 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12Q 1/42 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/050628
- (22) 国際出願日: 2012年1月13日(13.01.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-005797 2011年1月14日(14.01.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). 独立行政法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 御子柴 克彦(MIKOSHIBA, Katsuhiko) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研

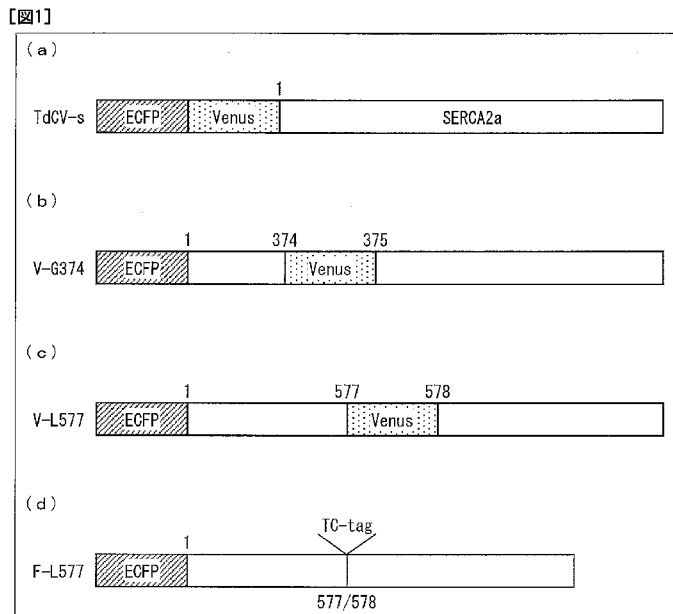
究所内 Saitama (JP). 松浦 徹(MATSU-URA, Toru) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 佐藤嘉名与(SATO, Kanayo) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所(HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: ENDOPLASMIC RETICULUM CALCIUM ATPASE KINETICS INDICATOR AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 小胞体カルシウムATPアーゼ動態指示薬及びその利用



(57) Abstract: A fusion protein of the present invention comprises an endoplasmic reticulum calcium ATPase, a fluorescence donor for FRET and a fluorescence acceptor for FRET. One of the fluorescence donor and the fluorescence acceptor is connected to the N-terminus of the ATPase, and the other is inserted between the one and the ATPase or inserted into an amino acid sequence in the ATPase corresponding to the first to sixth amino acids, the 369th to 380th amino acids or the 572nd to 583rd amino acids of SERCA2a.

(57) 要約: 本発明の融合タンパク質は、小胞体カルシウムATPアーゼと、FRETの蛍光供与体と、蛍光受容体とを備え、蛍光供与体と蛍光受容体とのうち一方は、当該ATPアーゼのN末端側に連結され、他方は、当該一方と当該ATPアーゼとの間、又は、当該ATPアーゼにおけるSERCA2aの1~6番目のアミノ酸、369~380番目のアミノ酸、もしくは572~583番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されている。

WO 2012/096384 A1

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

小胞体カルシウムATPアーゼ動態指示薬及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、小胞体カルシウムATPアーゼの動態を検出するプローブとするための融合タンパク質及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 小胞体カルシウムATPアーゼ（SERCA）は、小胞体膜上に存在する細胞内カルシウムポンプである。SERCAは、細胞内のカルシウムイオンの恒常性維持に極めて重要な働きを担っており、SERCA活性が妨げられると、心不全、糖尿病、癌及びアルツハイマー病などの病気が引き起こされる。SERCAは、遺伝性の心臓病の原因遺伝子の一つでもある。

[0003] 非特許文献1には、SERCAの蛍光プローブが記載されている。この蛍光プローブは、FRET（fluorescence resonance energy transfer）を利用するプローブである。この蛍光プローブには、SERCAのN末にFRETのドナーとしてCFP（Cyan fluorescent protein）が融合されており、また、515番目のリジン残基がFRETのアクセプタとしてのFITC（fluorescein isothiocyanate）で標識されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：D.L. Winters, J.M. Autry, B. Svensson, D.D. Thomas, *Biochemistry* 2008, 47, 4246-4256.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、非特許文献1の蛍光プローブは、FITC標識されたものであるため、SERCAの活性が失われている。したがって、従来の蛍光プローブでは、活性を保持した状態でのSERCAの動態を観察することがで

きないという問題がある。

[0006] 本発明は、上記の従来技術が有する問題に鑑みてなされたものであり、その目的は、活性を保持した状態でのSERCAの動態を観察することができるFRETプローブに利用可能な融合タンパク質を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 上記の課題を解決するために、本発明に係る融合タンパク質は、小胞体カルシウムATPアーゼと、FRETの蛍光供与体と、FRETの蛍光受容体とを備え、上記蛍光供与体と上記蛍光受容体とのうち、一方は、上記小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結されており、他方は、上記一方と上記小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、上記小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～6番目のアミノ酸、369～380番目のアミノ酸、もしくは572～583番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されていることを特徴とする。

[0008] また、本発明に係る融合タンパク質では、特に、以下に示すより具体的な例に限定されないが、上記蛍光供与体及び上記蛍光受容体の少なくとも1つは、ドナーもしくはアクセプタとしての蛍光タンパク質、又はドナーもしくはアクセプタとしての蛍光物質であって特定のペプチド配列に特異的に結合しているものを利用することが好ましい。

[0009] また、本発明に係る融合タンパク質では、特に、以下に示すより具体的な例に限定されないが、上記蛍光供与体が青色蛍光タンパク質であり、上記蛍光受容体が黄色蛍光タンパク質又はテラシステインタグに特異的に結合するFlAsHもしくはその類縁体であることが好ましい。

[0010] また、本発明に係る融合タンパク質では、特に、以下に示すより具体的な例に限定されないが、上記他方は、上記一方と上記小胞体カルシウムATPアーゼのN末端との間、又は、上記小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの374番目のアミノ酸と375番目のアミノ酸との間、もしくは577番目のアミノ酸と578番目のアミノ酸との間に対応する位置に挿入されていることが好ましい。

- [0011] 本発明に係る融合タンパク質は、特に、以下に示すより具体的な例に限定されないが、配列番号1～4のいずれか1つに示されるアミノ酸配列からなる融合タンパク質；あるいは
- 配列番号1～4のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の1又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る、融合タンパク質である。
- [0012] 本発明はまた、上述したいずれかの融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。
- [0013] 本発明はまた、特に、以下に示すより具体的な例に限定されないが、配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；
- 配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列の1個又は数個の塩基配列が欠失、置換又は付加された塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；
- 配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；あるいは
- 配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列と少なくとも66%同一な塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；を提供する。
- [0014] 本発明はまた、本発明に係るポリヌクレオチドを含んでいるベクターを提供する。本発明はさらに、本発明に係るポリヌクレオチド又は本発明に係るベクターを含んでいる形質転換体を提供する。
- [0015] 本発明はまた、小胞体カルシウムATPアーゼの挙動観察方法であって、本発明に係る融合タンパク質を用いて、蛍光供与体からの蛍光強度と蛍光受容体からの蛍光強度とを検出することを特徴とする方法を提供する。
- [0016] 本発明はまた、小胞体カルシウムATPアーゼを標的分子とする化合物のスクリーニング方法であって、本発明に係る融合タンパク質を用いて、試験化合物を処理した場合と処理しない場合とにおける、蛍光供与体からの蛍光強度と蛍光受容体からの蛍光強度との比を比較する工程を含むことを特徴とする方法を提供する。

[0017] 本発明はまた、本発明に係るポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、小胞体カルシウムATPアーゼの挙動を観察するためのキットを提供する。

[0018] 本発明はまた、小胞体カルシウムATPアーゼと、FRETの蛍光供与体と、FRETの蛍光受容体とを備えた融合タンパク質の設計方法であって、上記蛍光供与体と上記蛍光受容体とのうち、一方が、上記小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結され、他方が、上記一方と上記小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、上記小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～10番目のアミノ酸、364～384番目のアミノ酸、もしくは567～587番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されるように設計することを特徴とする方法を提供する。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、活性を保持した状態でのSERCAの動態を観察することができるFRETプローブに利用可能な融合タンパク質を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図1中の(a)～(d)は、本発明に係る融合タンパク質のいくつかの実施例を示す図である。

[図2]図2中の(a)～(e)は、FRETプローブを発現する形質転換体にTgを添加したときの、FRET効率の変化を示すグラフである。

[図3]図3中の(a)～(d)は、FRETプローブを発現する細胞内のカルシウム濃度を変化させたときの、FRET効率の変化を示すグラフである。

[図4]図4中の(a)～(c)は、FRETプローブを各構造に固定したときのFRET効率を示すグラフである。

[図5]図5中の(a)～(b)は、F-L577のFRET効率の変化と、ERにおけるCa²⁺の蓄積との関係を示すグラフである。

[図6]図6中の(a)～(b)は、図5(a)～(b)に示したF-L577のFRET効率の一次導関数と、ERにおける、Ca²⁺の蓄積の一次導関数とを重ね合わせたグラフである。

[図7]図7中の(a)は、ATP濃度と、F-L577のFRET効率の変化との関係を示すグラフであり、図7中の(b)は、ATP濃度と、ERにおける Ca^{2+} の蓄積との関係を示すグラフである。

[図8]F-L577のFRET効率と、ERにおける Ca^{2+} の蓄積との相関関係を示す図である。

発明を実施するための形態

[0021] [融合タンパク質]

本発明に係る融合タンパク質は、小胞体カルシウムATPアーゼと、FRETの蛍光供与体と、FRETの蛍光受容体とを備えている。蛍光供与体と蛍光受容体とのうち、一方は、小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結されている。また、蛍光供与体と蛍光受容体とのうち、他方は、蛍光供与体と蛍光受容体とのうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2a（配列番号11；参考文献：P. Vangheluwe et al., Cell Calcium 38 (2005) 291-302）の1～6番目のアミノ酸、369～380番目のアミノ酸、もしくは572～583番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されている。

[0022] 本明細書中、「小胞体カルシウムATPアーゼ」または「SERCA」は、SERCA (Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) ファミリーに属するタンパク質をさす。SERCAファミリーに属するタンパク質としては、例えばSERCA 1a、1b、2a、2b、3a、3b、3c等が知られているが、本発明における小胞体カルシウムATPアーゼは、これらのタンパク質のいずれかと相同性を有するタンパク質であればよい。小胞体カルシウムATPアーゼは、SERCAファミリーに属する公知のタンパク質と、少なくとも70%以上の相同性を有するタンパク質であることが好ましく、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有する。

[0023] 本発明における蛍光供与体とは、本発明における蛍光受容体に対してFRETのドナーとして働く分子又はその前駆体であればよい。すなわち、蛍光

供与体は、蛍光受容体の励起スペクトルと重なりがある励起スペクトルを有する分子又はその前駆体であることが好ましい。例えば蛍光供与体としては、ドナーとしての蛍光タンパク質、又はドナーとしての蛍光物質であって特定のペプチド配列に特異的に結合しているものを利用するものであることが好ましい。

[0024] ここで、本明細書中「ドナー」とは、一般的にFRET技術において励起エネルギーを発する分子として利用しうる分子をさす。

[0025] 本発明における蛍光供与体として用いることができる、ドナーとしての蛍光タンパク質としては、例えば青色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質等を用いることができ、具体的にはCFP、EGFP、YFP、Venus等が挙げられる。

[0026] ドナーとしての蛍光物質が特異的に結合する特定のペプチド配列としては、例えばテトラシステインタグ (TC-tag)、HaloTag (登録商標) (標識試薬：多数あり；Promega)、SNAP-tag、CLIP-tag、ACP-tag及びMCP-tag (以上、標識：多数あり；New England Biolabs)、Fluorogen activating proteins (FAPs) (Nat. Biotechnol. 2008; 26(2):235-240) などを含むが、これらに限定されない。例えば、TC-tagは、MW664.5の蛍光物質であるFlAsH又はその類縁体の特異的に結合するペプチド配列である。

[0027] 本発明における蛍光受容体とは、本発明における蛍光供与体に対してFRETのアクセプタとして働く分子又はその前駆体であればよい。すなわち、蛍光受容体は、蛍光供与体の励起スペクトルと重なりがある励起スペクトルを有する分子又はその前駆体であることが好ましい。例えば蛍光受容体としては、アクセプタとしての蛍光タンパク質、又はアクセプタとしての特定のペプチド配列に特異的に結合する蛍光物質を利用するものであることが好ましい。

[0028] 本明細書中「アクセプタ」とは、一般的にFRET技術においてドナーからの励起エネルギーを受けて蛍光を発する分子として利用しうる分子をさす。

- [0029] 本発明における蛍光受容体として用いることができる、アクセプタとしての蛍光タンパク質としては、例えば青色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質等を用いることができ、具体的にはCFP、ECFP、YFP、Venus等が挙げられる。
- [0030] アクセプタとしての蛍光物質が特異的に結合する特定のペプチド配列としては、例えばテトラシステインタグ (TC-tag)、HaloTag (登録商標) (標識試薬：多数あり；Promega)、SNAP-tag、CLIP-tag、ACP-tag及びMCP-tag (以上、標識：多数あり；New England Biolabs)、Fluorogen activating proteins (FAPs) (参考文献：Nat. Biotechnol. 2008; 26(2):235-240) などを含むが、これらに限定されない。
- [0031] 蛍光供与体と蛍光受容体との組合せは、FRETの蛍光供与体及び蛍光受容体として互いに機能する組合せであればよい。例えば、青色蛍光タンパク質 (例えばECFP) と黄色蛍光タンパク質 (例えばVenus) との組合せ、青色蛍光タンパク質とテトラシステインタグに結合するFLASH又はその類縁体との組合せなどが挙げられる。
- [0032] 蛍光供与体及び蛍光受容体の一方は、小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結される。この一方は、小胞体カルシウムATPアーゼのN末端にリンカーを介して連結されてもよい。リンカーとしては、ペプチド等を用いることができ、1アミノ酸以上5アミノ酸以下のペプチドが好ましく、1アミノ酸以上3アミノ酸以下のペプチドがより好ましい。
- [0033] 小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～6番目のアミノ酸、369～380番目のアミノ酸、もしくは572～583番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列とは、本発明における小胞体カルシウムATPアーゼとSERCA2aとのアミノ酸配列上、又は立体構造上での相同性を鑑みて、SERCA2aにおけるこれらのアミノ酸に対応するアミノ酸配列をさす。
- [0034] 例えば、小胞体カルシウムATPアーゼとしてSERCA1a (配列番号12；参考文献：C. Toyoshima et al., Nature 405 (2000) 647-655.) を用

いた場合、SERCA 1 aにおけるSERCA 2 aの1～6番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列は、SERCA 1 aの1～6番目である。また、SERCA 1 aにおけるSERCA 2 aの369～380番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列は、SERCA 1 aの369～380番目である。また、SERCA 1 aにおけるSERCA 2 aの572～583番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列は、SERCA 1 aの573～584番目である。

[0035] なお、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方は、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA 2 aの1～5番目のアミノ酸、370～379番目のアミノ酸、もしくは573～582番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されていることが好ましい。

[0036] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方は、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA 2 aの1～4番目のアミノ酸、371～378番目のアミノ酸、もしくは574～581番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されていることがより好ましい。

[0037] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方は、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA 2 aの1～3番目のアミノ酸、372～377番目のアミノ酸、もしくは575～580番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されていることがさらに好ましい。

[0038] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方は、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA 2 aの1番目のアミノ酸と2番目のアミノ酸との間、373～376番目のアミノ酸、もしくは576～579番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されていることがよりさらに好ましい。

[0039] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方は、蛍光供与体及び蛍光受

容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの374番目のアミノ酸と375番目のアミノ酸との間、もしくは577番目のアミノ酸と578番目のアミノ酸との間に対応する位置、に挿入されていることが最も好ましい。

[0040] 以上の構成により、本発明に係る融合タンパク質は、小胞体カルシウムATPアーゼとしての活性を保持している。

[0041] ここで、SERCAは、活性変化に伴って構造変化する。SERCAの主要な構造としては、E1-2Ca²⁺、E1-ATP、E2P、及びE2がある（参考文献：C. Toyoshima, *Annu. Rev. Biochem.* 2004, 73:269-92；C. Toyoshima, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 941-946.；T.L. Sorensen et al., *Science* 304 (2004) 1672-1675.；C. Toyoshima, T. Mizutani, *Nature* 430 (2004) 529-535.；C. Toyoshima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 19831-19836.）。E1-2Ca²⁺は、SERCA内に2分子のCa²⁺を取り込んだ状態であり、これにさらにATPが結合すると、E1-ATPになる。そして、ATPが分解されるとともにCa²⁺が放出されてE2Pとなり、リン酸基が外れてE2となる。このE2がCa²⁺を取り込み、E1-2Ca²⁺となる。

[0042] 本発明に係る融合タンパク質は、小胞体カルシウムATPアーゼの活性の変化に伴って構造変化し、この構造変化に伴って蛍光供与体と蛍光受容体との距離が変化する。したがって、本発明に係る融合タンパク質を利用したFRETプローブは、とりうる各構造において、蛍光供与体と蛍光受容体との距離が異なるため、それぞれ異なるFRET効率を有する。したがって、FRETプローブがとりうる各構造において予めFRET効率を調べておき、ある条件下でのFRET効率を検出することによって、このある条件下でFRETプローブがいずれの構造をとっているのかを検出することができる。なお、このFRET効率は、FRETプローブの構成により異なる値となる。

[0043] 「FRET効率」とは、蛍光供与体から蛍光受容体への励起エネルギー移

動の効率をさす。FRET効率としては、例えば、蛍光供与体からの蛍光強度と、蛍光受容体からの蛍光強度との比として表すことができる。

[0044] 以上のように、本発明に係る融合タンパク質は、蛍光のエネルギー移動（FRET）技術を用いたFRETプローブの提供に利用することができる。特に、活性を保持した状態でのSERCAの動態を観察することができるFRETプローブに利用することができる。

[0045] また、本発明に係る融合タンパク質は、小胞体カルシウムATPアーゼの構造変化、つまり活性の変化を、FRET効率の変化として可視化することができるFRETプローブの提供に利用することができる。

[0046] また、本発明に係る融合タンパク質は、生細胞内において、小胞体カルシウムATPアーゼとしての活性を保持している。したがって、本発明に係る融合タンパク質を生細胞内において発現させることにより、活性を保持した状態での小胞体カルシウムATPアーゼの動態を、FRET技術を用いて容易に可視化するためのFRETプローブの提供に利用することができる。また、本発明は、小胞体カルシウムATPアーゼの構造と機能との相関を解析するために有用である。特に、状態が遷移した場合にどのような構造変化が起こっているのかを調べる際に有用である。

[0047] したがって、本発明は、小胞体カルシウムATPアーゼ動態指示薬として、好適に利用することができる。また、本発明は、SERCAの動態に関する研究だけでなく、SERCAに関連する病気を治療、改善又は予防するための分子標的薬のスクリーニング、これらの病気の診断などに非常に有用である。

[0048] また、SERCAは、カルシウムイオン濃度の変化に伴い活性変化する。したがって、本発明に係る融合タンパク質は、カルシウムイオンのレベルを検出するためのFRETプローブ、カルシウムイオン濃度の変化を検出するFRETプローブなどに利用可能である。

[0049] なお、本明細書中において、「融合タンパク質」とは、由来の異なるいくつかのタンパク質又はポリペプチドが人工的に連結されたものであってもよ

い。

[0050] 本発明に係る融合タンパク質は、蛍光供与体と蛍光受容体とが、FRETのドナーとアクセプタとして働く分子である場合には、そのままFRETプローブとして利用できる。また、本発明に係る融合タンパク質は、蛍光供与体及び蛍光受容体のいずれか一方または両方が、FRETのドナー又はアクセプタとして働く分子の前駆体である場合には、この前駆体をドナー又はアクセプタとして働く分子に変換した状態で、FRETプローブとして利用できる。

[0051] 本明細書中において、「ポリペプチド」は、「ペプチド」又は「タンパク質」と交換可能に使用される。本発明に係るポリペプチドはまた、化学合成されても、天然供給源より単離されてもよい。用語「単離された」ポリペプチド又はタンパク質は、その天然の環境から取り出されたポリペプチド又はタンパク質が意図される。例えば、宿主細胞中で発現され産生された組換えポリペプチド及びタンパク質は、任意の適切な技術によって実質的に精製されている天然の、又は組換えのポリペプチド及びタンパク質と同様に、単離されていると考えられる。

[0052] 本発明に係る融合タンパク質において、各構成要素のポリペプチドは、天然の精製産物、化学合成手順の産物、及び原核生物宿主又は真核生物宿主（例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、及び哺乳動物細胞を含む）から組換え技術によって産生された産物を含む。

[0053] また、本発明に係る融合タンパク質及び各構成要素のポリペプチドは、付加的なペプチドを含むものであってもよい。付加的なペプチドとしては、例えば、Hisタグ、HAタグ、Mycタグ、Flagタグ等のエピトープ標識ペプチドが挙げられる。本発明に係る融合タンパク質は、好ましい形態に改変され、組換え発現され得る。例えば、本発明に係る融合タンパク質は、N末端又はC末端に特定のアミノ酸、特に荷電性アミノ酸の領域等を付加することによって、宿主細胞内、精製、精製に引き続く操作、及び保存等における安定性、持続性等を改善することができる。

- [0054] 一実施形態において、本発明に係る融合タンパク質は、配列番号1～4のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる融合タンパク質又はその変異体であることが好ましい。ここで、この変異体とは、配列番号1～4のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1又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る融合タンパク質であることが好ましい。
- [0055] 本明細書中において融合タンパク質、ポリペプチド又はタンパク質に関して用いられる場合、用語「変異体」は、本来のアミノ酸の少なくとも1つ以上がポイント変異、挿入、逆転、反復、欠損、タイプ置換されたポリペプチド又はタンパク質が意図される。
- [0056] このような変異体としては、欠失、挿入、逆転、反復、タイプ置換（例えば、親水性残基の別の残基への置換、しかし通常は強い親水性の残基を強い疎水性の残基には置換しない）、及びポイント変異などを含む変異体が挙げられる。アミノ酸の置換には、例えば、ポリペプチドにおける中性アミノ酸を別の中性アミノ酸に置換する場合等が含まれる。
- [0057] ポリペプチドのアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、このポリペプチドの構造又は機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、人為的に改変させるだけでなく、天然のタンパク質において、当該タンパク質の構造又は機能を有意に変化させない変異体が存在することもまた周知である。
- [0058] 当業者は、周知技術を使用してポリペプチドのアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸を容易に変異させることができる。例えば、公知の点変異導入法に従えば、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの任意の塩基を変異させることができる。また、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの任意の部位に対応するプライマーを設計して欠失変異体又は付加変異体を作製することができる。さらに、本明細書中に記載される方法を用いれば、作製した変異体が所望の活性を有するか否かを容易に決定し得る。
- [0059] 「1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により欠失、置換又は付加

できる程度の数（好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、最も好ましくは5個以下）のアミノ酸が欠失、置換又は付加されていることを意味する。このような変異タンパク質は、上述したように、公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を有するタンパク質に限定されるものではなく、天然に存在する変異タンパク質を単離精製したものであってもよい。

[0060] なお、本発明に係る融合タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合しているポリペプチドであればよいが、これに限定されるものではなく、ポリペプチド以外の構造を含む複合ポリペプチドであってもよい。本明細書中で使用される場合、「ポリペプチド以外の構造」としては、糖鎖やイソプレノイド基等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

[0061] また、本発明に係る融合タンパク質は、後述する本発明にかかるポリヌクレオチド（すなわち本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子）を宿主細胞に導入して、その融合タンパク質を細胞内で発現させた状態であってもよいし、細胞、組織などから単離精製された場合であってもよい。

[0062] 他の実施形態において、本発明に係る融合タンパク質の変異体は、配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列の1個又は数個の塩基配列が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされることが好ましい。

[0063] 他の実施形態において、本発明に係る融合タンパク質の変異体は、配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされることが好ましい。

[0064] ハイブリダイゼーションは、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring

Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法のような周知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が

低いほどストリンジエンシーは高くなり（ハイブリダイズし難くなる）、より相同なポリヌクレオチドを取得することができる。適切なハイブリダイゼーション温度は、塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えば、アミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとして用いる場合、50℃以下の温度が好ましい。

[0065] 本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジエントな条件」は、ハイブリダイゼーション溶液（50%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート液、10%硫酸デキストラン、及び20μg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む）中にて42℃で一晩インキュベーションした後、約65℃にて0.1×SSC中でフィルターを洗浄することが意図される。

[0066] また、他の実施形態において、本発明に係る融合タンパク質の変異体は、配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列と少なくとも66%同一、より好ましくは少なくとも80%同一、さらに好ましくは少なくとも85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%又は99%同一である塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされることが好ましい。

[0067] [ポリヌクレオチド]

本発明はまた、本発明に係る融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明に係るポリヌクレオチドは、上述した融合タンパク質のいずれかをコードする。

[0068] 本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、「遺伝子」、「核酸」又は「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。本明細書中で使用される場合、用語「塩基配列」は、「核酸配列」又は「ヌクレオチド配列」と交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド（A、G、C及びTと省略される）もしくはリボヌクレオチド（C、A、G及びU）の配列として示される。また、「配列番号6に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド又はそのフラグメント」とは、配列番号6の

各デオキシヌクレオチドA、G、C及び／又はTによって示される配列を含むポリヌクレオチド又はその断片部分が意図される。

[0069] 本発明に係るポリヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）の形態、又はDNAの形態（例えば、cDNA又はゲノムDNA）で存在し得る。DNAは、二本鎖又は一本鎖であり得る。一本鎖DNA又はRNAは、コード鎖（センス鎖としても知られる）であり得るか、又は、非コード鎖（アンチセンス鎖としても知られる）であり得る。

[0070] 一実施形態において、本発明に係るポリヌクレオチドは、配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその変異体であることが好ましい。

[0071] 一実施形態において、本発明に係るポリヌクレオチドの変異体は、以下のポリヌクレオチドのいずれかであることが好ましい：

配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列の1個又は数個の塩基配列が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるポリヌクレオチド；

配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

配列番号6～9のいずれかに示される塩基配列と少なくとも66%同一、より好ましくは少なくとも80%同一、さらに好ましくは少なくとも85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%又は99%同一である塩基配列からなるポリヌクレオチド。

[0072] 本発明に係るポリヌクレオチドは、非翻訳領域（UTR）の配列又はベクター配列（発現用ベクター配列を含む）などの配列を含むものであってもよい。

[0073] 本発明に係るポリヌクレオチドは、例えば、発現用ベクター等にサブクローニングして、融合タンパク質を発現させるためのベクター（プラスミド）を製作し、これを細胞内に導入することによって、このポリヌクレオチドがコードする融合タンパク質を細胞内に発現させることができる。

[0074] なお、本発明に係るポリヌクレオチドは、融合タンパク質をコードする領域の上流に、細胞内において融合タンパク質を発現させるためのプロモーター配列等が組み込まれたものであってもよい。

[0075] また、本発明に係るポリヌクレオチドは、Hisタグ、HAタグ、Mycタグ、Flagタグ等のタグ配列をコードするポリヌクレオチドが付加されたものであってもよい。

[0076] 本発明に係るポリヌクレオチドは、例えば、各構成要素のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを直鎖状に連結することによって生産することができる。

[0077] [ベクター]

本発明は、本発明に係る融合タンパク質を生産するために使用されるベクターを提供する。本発明に係るベクターは、宿主細胞において組換え発現するためのベクターであってもよいし、インビトロでの融合タンパク質の生産に用いるベクターであってもよい。

[0078] 本発明に係るベクターは、本発明に係るポリヌクレオチドを含むものであれば、特に限定されない。例えば、本発明に係るポリペプチドをコードするcDNA（ポリヌクレオチドの一形態）が挿入されたベクターなどが挙げられる。ベクターの作製方法としては、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを用いる方法が挙げられるが特に限定されない。

[0079] ベクターの具体的な種類は特に限定されず、宿主細胞に目的のポリヌクレオチドを導入することができるベクター、ポリヌクレオチドにコードされた融合タンパク質を宿主細胞中で発現させることができるベクター等を、適宜選択することが好ましい。ベクターとしては、例えば大腸菌由来のプラスミド、動物細胞内でタンパク質を発現させることが可能なプラスミド、動物ウイルスなどを利用することができる。

[0080] また、ベクターは、適当なプロモーター配列が、本発明に係るポリヌクレオチドとともに組み込まれていることが好ましい。プロモーター配列は、宿主細胞の種類に応じて、本発明に係るポリヌクレオチドを発現させるために

適宜選択することが好ましい。

[0081] 本発明において利用可能なプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応した適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、宿主が大腸菌 (*Escherichia coli*) である場合は、*trp* プロモーター、*lac* プロモーター、*recA* プロモーター、 λ P L プロモーター、*lpp* プロモーターなど、宿主が動物細胞である場合は、S R α プロモーター、S V 4 0 プロモーター、L T R プロモーター、C M V プロモーター、H S V - T K プロモーターなどが挙げられる。

[0082] また本発明に係るベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー、S V 4 0 複製起点などを付加することができる。また、必要に応じて、本発明のポリヌクレオチドにコードされた融合タンパク質と他のタンパク質とを連結させて発現させることも可能である。このような連結されたタンパク質は、適当なプロテアーゼを使用して切断することによって、それぞれのタンパク質に分離することができる。

[0083] 本発明に係るベクターには、少なくとも 1 つの選択マーカーが含まれていることが好ましい。選択マーカーとしては、公知の薬剤耐性遺伝子等を用いることができる。選択マーカーを用いれば、本発明に係るポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認することができる。

[0084] 本発明に係るベクターを用いれば、生物又は細胞に導入することにより、当該生物又は細胞中に本発明に係る融合タンパク質を発現させることができる。

[0085] [形質転換体]

本発明は、本発明に係るポリヌクレオチドを含む形質転換体を提供する。ここで「形質転換体」とは、細胞、組織、器官等だけでなく、生物の個体をも含む概念である。

[0086] 形質転換体は、例えば、本発明に係るベクターで宿主細胞を形質転換する

ことにより生産することができる。

[0087] 本明細書中において、「細胞」又は「宿主細胞」とは、生物における細胞（原核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、ヒトを含めた哺乳動物細胞等）のみならず、その本来の機能を維持した状態の培養細胞（原核細胞及び真核細胞）を含む。また、「細胞」又は「宿主細胞」は、初代細胞、継代細胞、株化細胞、形質転換細胞、単離された胚性幹(ES)細胞、組織幹細胞、遺伝子操作等の人為的操作により分化多能性が付与された細胞（例えば人工多能性(iPS)細胞を含み、当該細胞より分化した細胞なども非限定的に包含する）、生物個体内に移植、感染した細胞などを含む。また、組織、器官、生物の個体そのものなどをも含む概念である。

[0088] ベクターを宿主細胞に導入する方法、すなわち形質転換法は、特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

[0089] なお、本発明に係る形質転換体は、本発明に係る融合タンパク質を発現させ得る形質転換体であることが好ましい。この形質転換体としては、真核培養細胞を用いることが好ましく、ヒト由来の培養細胞を用いることがより好ましい。これにより、形質転換体内で発現した融合タンパク質の活性を保持させることができ、生細胞内での小胞体カルシウムATPアーゼの動態を観察することが可能となる。

[0090] [融合タンパク質の生産方法]

本発明に係る融合タンパク質は、本発明に係る形質転換体において発現させることによって、生産することができる。また、形質転換体内で発現した融合タンパク質を、さらに精製することによって生産してもよい。

[0091] 形質転換体内で発現した融合タンパク質を精製する方法は、用いた宿主細胞、融合タンパク質の性質によって異なるが、タグの利用等によって比較的容易に目的の融合タンパク質を精製することが可能である。本発明に係る融合タンパク質を精製する場合、周知の方法で宿主細胞から細胞抽出液を調製した後、この細胞抽出液から周知の方法によって融合タンパク質を精製する

ことができる。

[0092] なお、本発明に係る融合タンパク質は、周知の化学合成技術を利用して、各構成要素のポリペプチドを化学合成法等で得た後に、それぞれを連結することによって生産してもよい。また、融合タンパク質は、上述したベクターを用いてインビトロで、例えば周知の無細胞タンパク質合成系において、生産してもよい。

[0093] [小胞体カルシウムATPアーゼの挙動観察方法]

本発明は、小胞体カルシウムATPアーゼの挙動観察方法を提供する。この挙動観察方法は、本発明に係る融合タンパク質を用いて、蛍光供与体からの蛍光強度と蛍光受容体からの蛍光強度とを検出する工程を含む。融合タンパク質として、本発明に係る形質転換体において発現している融合タンパク質を用いることが好ましい。

[0094] 本発明により、融合タンパク質の蛍光供与体からの蛍光強度と蛍光受容体からの蛍光強度との比を算出することができ、すなわちFRET効率を検出することができる。融合タンパク質がとりうる各構造についてのFRET効率を予め調べておき、所定の条件下でのFRET効率を検出することによって、このある条件下で融合タンパク質がいずれの構造をとっているのかを検出することができる。

[0095] また、本発明により、第1の状態から第2の状態に遷移した際のFRET効率の変化を検出することによって、融合タンパク質がどのように構造変化したのかを検出することができる。

[0096] このように、本発明であれば、活性を保持した状態でのSERCAの挙動を観察することができる。したがって、SERCAに関連する病気を治療するための分子標的薬のスクリーニング、これらの病気の診断などを行なうことができる。

[0097] [スクリーニング方法]

本発明は、小胞体カルシウムATPアーゼを標的分子とする化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、本発明に係る融合

タンパク質を用いて、試験化合物を処理した場合と処理しない場合とにおける、蛍光供与体からの蛍光強度と蛍光受容体からの蛍光強度との比を比較する工程を含む。融合タンパク質として、本発明に係る形質転換体において発現している融合タンパク質を用いることが好ましい。

[0098] 試験化合物を処理した場合と処理しない場合とで、FRET効率の比を比較し、これらが異なる値である場合には、この試験化合物は、融合タンパク質の構造を変化させている可能性が高い。このような試験化合物は、小胞体カルシウムATPアーゼの構造に影響を与え、さらに活性に影響を与える化合物である可能性が高い。そのため、このような場合には、この試験化合物が、小胞体カルシウムATPアーゼの構造及び活性に影響を与え得る化合物であると判断することができる。

[0099] すなわち、本発明は、試験化合物を処理した場合における比と、試験化合物を処理しない場合における比とが異なる場合は、この試験化合物を、小胞体カルシウムATPアーゼを標的分子とする化合物の候補化合物として選抜する工程をさらに含んでもよい。

[0100] ここで、小胞体カルシウムATPアーゼは、遺伝性の心臓病の原因遺伝子の一つであり、また、その活性が、心不全、糖尿病、癌及びアルツハイマー病などの病気に関連していることが知られている。したがって、小胞体カルシウムATPアーゼを標的分子とする化合物は、小胞体カルシウムATPアーゼが関連する病気、症状等の治療、予防などに有用な薬剤の候補となりうる。

[0101] [キット]

本発明はまた、本発明に係るポリヌクレオチドを含むキットを提供する。ポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドを含むベクターとして含まれていてもよいし、このポリヌクレオチドを含む形質転換体として含まれていてもよい。

[0102] このキットは、本発明に係る融合タンパク質を利用するためのキットである。例えば、小胞体カルシウムATPアーゼの挙動を観察するためのキット

であってもよいし、小胞体カルシウムATPアーゼを標的分子とする化合物をスクリーニングするためのキットであってもよい。本発明に係るキットは、上述した挙動観察方法及びスクリーニング方法に好適に利用できる。

[0103] また、本発明に係るキットは、細胞内のカルシウム濃度の変化を検出するためのキットであってもよい。

[0104] なお、本発明に係るキットは、本発明に係るポリヌクレオチドに加え、このポリヌクレオチドを挿入してベクターを製造するためのプラスミド、ベクターを形質転換するための宿主細胞等をさらに含むものであってもよい。また、本発明に係るキットは、本発明に係るポリヌクレオチドをベクターとして含み、さらに、このベクターを形質転換するための宿主細胞等を含むものであってもよい。また、本発明に係るキットは、本発明に係るポリヌクレオチドを形質転換体として含み、さらに、挙動観察方法又はスクリーニング方法に用いる試薬、コントロール化合物等を含むものであってもよい。さらに、本キットは、キットの使用説明書を含むものであってもよい。

[0105] [融合タンパク質の設計方法]

本発明はまた、小胞体カルシウムATPアーゼと、FRETの蛍光供与体と、FRETの蛍光受容体とを備えた融合タンパク質の設計方法を提供する。

[0106] この設計方法は、蛍光供与体と蛍光受容体とのうち、一方が、小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結されるように設計する。また、他方が、小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結されている一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～6番目のアミノ酸、369～380番目のアミノ酸、もしくは572～583番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されるように設計する。

[0107] 小胞体カルシウムATPアーゼ、蛍光供与体及び蛍光受容体としては、上述したものと同一ものを例示することができる。

[0108] なお、蛍光供与体及び蛍光受容体のうち他方を、蛍光供与体及び蛍光受

容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～5番目のアミノ酸、370～379番目のアミノ酸、もしくは573～582番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されるよう設計することが好ましい。

[0109] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方を、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～4番目のアミノ酸、371～378番目のアミノ酸、もしくは574～581番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されるよう設計することがより好ましい。

[0110] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方を、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～3番目のアミノ酸、372～377番目のアミノ酸、もしくは575～580番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されるよう設計することがさらに好ましい。

[0111] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方を、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1番目のアミノ酸と2番目のアミノ酸との間、373～376番目のアミノ酸、もしくは576～579番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されるよう設計することがよりさらに好ましい。

[0112] また、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの他方を、蛍光供与体及び蛍光受容体のうちの一方と小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの374番目のアミノ酸と375番目のアミノ酸との間、もしくは577番目のアミノ酸と578番目のアミノ酸との間に対応する位置、に挿入されるよう設計することが最も好ましい。

[0113] 以上の設計方法により、活性を保持した状態でのSERCAの動態を観察することができるFRETプローブに利用可能な融合タンパク質を設計する

ことができる。

[0114] 本発明は上述した実施形態及び下記の各実施例に限定されるものではない。

実施例

[0115] [1 : 発現ベクターの作製]

以下のFRETプローブ（融合タンパク質）を発現させるための発現ベクターを作製した。各FRETプローブの構成を図1中の（a）～（d）に示す。図1中の（a）～（d）は、本発明に係る融合タンパク質のいくつかの実施例を示す図である。

（1）T d C V - s（配列番号1）：S E R C A 2 a（小胞体カルシウムA T Pアーゼ）のN末端にE C F P（蛍光供与体）が連結され、V e n u s（蛍光受容体）がE C F PのC末端とS E R C A 2 aのN末端との間に挿入されたFRETプローブ（図1中の（a））。

（2）V - G 3 7 4（配列番号2）：S E R C A 2 aのN末端にE C F Pが連結され、S E R C A 2 aの3 7 4番目のアミノ酸と3 7 5番目のアミノ酸との間にV e n u sが挿入されたFRETプローブ（図1中の（b））。

（3）V - L 5 7 7（配列番号3）：S E R C A 2 aのN末端にE C F Pが連結され、S E R C A 2 aの5 7 7番目のアミノ酸と5 7 8番目のアミノ酸との間にV e n u sが挿入されたFRETプローブ（図1中の（c））。

（4）F - L 5 7 7（配列番号4）：S E R C A 2 aのN末端にE C F Pが連結され、S E R C A 2 aの5 7 7番目のアミノ酸と5 7 8番目のアミノ酸との間にT C - t a gが挿入されたFRETプローブ（図1中の（d））。

（5）V - G 5 1 9（配列番号5）：S E R C A 2 aのN末端にE C F Pが連結され、S E R C A 2 aの5 1 9番目のアミノ酸と5 2 0番目のアミノ酸との間にV e n u sが挿入されたFRETプローブ（図示せず）。

[0116] これらのFRETプローブを発現させるための発現ベクターを、以下の方法によって作製した。

[0117]（T d C V - s）

TdCV-sを生産するための発現ベクターを作製するため、ECFPをコードするDNA断片、VenusをコードするDNA断片、及びSERCA2aをコードするDNA断片を、それぞれPCRによって増幅した。ECFPをコードするDNA断片は、pECFP1 (Invitrogen) をテンプレートとして用いて増幅した。VenusをコードするDNA断片は、pRSETb-Venus (参考文献: Nagai et al., Nature Biotechnology, 2002;20:87-90) をテンプレートとして用いて増幅した。SERCA2aをコードするDNA断片は、pTN3-GFP-SERCA2a (Uchida et al., J. Biol. Chem., 2003;278(19):16551-60) をテンプレートとして用いて増幅した。

[0118] そして、これらの増幅した断片を、5'側からこの順に連結させ、TdCV-sをコードする遺伝子(配列番号6)を含むDNA断片を得た。このDNA断片を、pcDNA3.1/Zeo(+)(Invitrogen)にクローニングした。

[0119] Bacterio-Bacバキュロウイルス発現システム (Invitrogen) を利用するため、この連結したDNA断片を、pFastBac1 (Invitrogen) にクローニングした。これにより、発現ベクターを得た。

[0120] (V-G374、V-L577、F-L577、及びV-G519)

V-G374、V-L577、F-L577、及びV-G519についても、上述したTdCV-sと同様に、それぞれの構成要素ごとにDNAをPCRによって増幅した後に連結させ、V-G374、V-L577、F-L577、及びV-G519をコードする遺伝子(配列番号7~10)を含むDNA断片を得た。これらのDNA断片をpFastBac1にクローニングすることにより、発現ベクターを得た。

[0121] V-G374を例として説明する。V-G374を生産するための発現ベクターを作製するため、ECFPをコードするDNA、SERCA2aの1~374番目のアミノ酸配列をコードするDNA、Venusをコードする

DNA、及びSERCA2aの375～C末端のアミノ酸配列をコードするDNAのそれぞれをPCRによって増幅した。そして、これらの増幅した断片を、5'側からこの順に連結させ、pcDNA3.1/Zeo(+)にクローニングした。なお、ECFPとSERCA2aのN末との間に、リンカー(Gly-Ser-Leu)が挿入されるように設計した。この連結したDNA断片を、pFastBac1にクローニングし、発現ベクターを得た。

[0122] V-G519、V-L577及びF-L577についても、V-G374と同様の方法によって、発現ベクターを得た。なお、F-L577の発現ベクターを作製する際、TC-tag(配列番号13)をコードするDNA断片(配列番号14)は、2つのオリゴDNA、BamHI-CCPGCC-FW(配列番号15)とEcoRI-CCPGCC-BW(配列番号16)とをアニーリングすることにより得た。

[0123] [2. 阻害剤添加によるFRET効率の変化]

それぞれの発現ベクターをCOS7細胞(RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan)にトランスフェクションし、形質転換体を得た。これらの形質転換体を用いて、SERCA特異的な阻害剤であるタプシガルジン(Tg: Thapsigargin)を用いて、SERCAの活性を阻害した場合について、各FRETプローブのFRET効率の変化を調べた。

[0124] F-L577を形質転換した形質転換体については、FLASH-EDT₂試薬(Invitrogen)により室温で60～90分処理することによって、FLASHを付加させた。それぞれの発現ベクターを形質転換した形質転換体について、細胞膜を透過性にして、Tgを含む、細胞内液に模したインターナル溶液(19mM NaCl, 125mM KCl, 10mM HEPES-KOH pH7.4)内で還流した。その後、IX71インバータ蛍光顕微鏡(オリンパス)下で蛍光強度を測定し、蛍光供与体と蛍光受容体との蛍光強度比の変化量(dR/R_{base})を算出した。

- [0125] その結果を図2中の(a)～(e)に示す。図2中の(a)～(e)は、FRETプローブを発現する形質転換体にTgを添加したときの、FRET効率の変化を示すグラフである。
- [0126] dR/R_{base} は、Tgの添加によって、V-G374を発現する形質転換体では12%減少し(図2中の(b))、V-L577を発現する形質転換体では8%減少し(図2中の(d))、F-L577を発現する形質転換体では20%増加した(図2中の(e))。一方、TdCV-s及びV-G519を発現する形質転換体では、Tgの添加によって dR/R_{base} が変化しなかった(図2中の(a),(c))。
- [0127] 以上の結果より、V-G374、V-L577及びF-L577のFRET効率は、Tgの存在の有無によって変化することが示された。すなわち、V-G374、V-L577及びF-L577は、少なくともTg添加によって生じるSERCAの活性の変化に伴う構造変化により、FRET効率が増加することが示唆された。
- [0128] [3. 細胞内カルシウム濃度の変化によるFRET効率の変化]
細胞内カルシウム濃度の変化によってSERCAの活性が変化するときの、各FRETプローブのFRET効率の変化を調べた。
- [0129] それぞれの形質転換体に対してアゴニスト処理(ATP)を行ない、細胞内のカルシウム濃度を上昇させた。そして、IX71インバータ蛍光顕微鏡(オリンパス)下で蛍光強度を測定し、 dR/R_{base} を算出した。またこのときの細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を見るためにIndo-5F(Dojindo)を用い、このIndo-5Fの dF/F_{base} を算出した。
- [0130] その結果を図3中の(a)～(d)に示す。図3中の(a)～(d)は、FRETプローブを発現する細胞内のカルシウム濃度を変化させたときの、FRET効率の変化を示すグラフである。図3中の(a)～(d)において、aはFRETプローブの dR/R_{base} をさし、bはIndo-5Fの dF/F_{base} をさす。
- [0131] なお、図3中の(a)は、TdCV-sについての結果であり、図3中の

(b) は、V-L 5 7 7 についての結果であり、図 3 中の (c) は、F-L 5 7 7 についての結果であり、図 3 中の (d) は、V-G 5 1 9 についての結果である。それぞれ、アゴニスト処理は、2 分～8 分の間行なった。

[0132] dR/R base は、細胞内のカルシウムイオン濃度上昇に伴って、TdCV-s を発現する形質転換体では 5% 上昇した (図 3 中の (a))。また、V-L 5 7 7 及び F-L 5 7 7 のそれぞれを発現する形質転換体では 4% 減少した (図 3 中の (b), (c))。一方、V-G 5 1 9 を発現する形質転換体では、変化が見られなかった (図 3 中の (d))。

[0133] 以上の結果より、TdCV-s、V-L 5 7 7 及び F-L 5 7 7 の FRET 効率は、細胞内のカルシウム濃度上昇によって変化することが示された。すなわち、TdCV-s、V-L 5 7 7 及び F-L 5 7 7 は、少なくとも細胞内カルシウムイオン濃度の変動によって生じる SERCA の活性の変化に伴う構造変化により、FRET 効率が変化することが示唆された。

[0134] 以上の実験結果によって、TdCV-s、V-G 3 7 4、V-L 5 7 7 及び F-L 5 7 7 は、SERCA の構造変化を検出するための FRET プローブの提供に利用できることが示された。また、これらのプローブは、細胞内のカルシウムイオン濃度の変化によって FRET 効率が変化するため、細胞内のカルシウムイオン濃度の変化を検出するための FRET プローブの提供に利用できることが示された。

[0135] [4. SERCA の活性変化に伴う各構造に固定したときの FRET 効率の変化]

TdCV-s、V-L 5 7 7 及び F-L 5 7 7 が、それぞれ SERCA のどのような構造変化を検出可能であるかについて調べた。なお、ここでは、SERCA の主要な 4 つの構造である、E1-2Ca²⁺、E1-ATP、E2P、又は E2 に固定した。

[0136] TdCV-s、V-L 5 7 7 及び F-L 5 7 7 それぞれを発現する形質転換体について、それぞれ細胞膜を透過性にして、細胞内液に模したインターナル溶液 (19 mM NaCl, 125 mM KCl, 10 mM Hepe

s-KOH pH 7.4) 内で還流した。なお、E1-2Ca²⁺に固定する場合には、100 μMのCaCl₂を含むインターナル溶液を用いた。また、E1-ATPに固定する場合には、1 mMのADP、0.33 mMのAlCl₃、5 mMのNaF、1 mMのMgCl₂、及び100 μMのCaCl₂を含むインターナル溶液を用いた。また、E2Pに固定する場合には、2 mMのBeCl₂、8 mMのNaF、1 mMのMgCl₂、及び5 mMのEGTAを含むインターナル溶液を用いた。また、E2に固定する場合には、30 μMのTg及び5 mMのEGTAを含むインターナル溶液を用いた。その後、IX71インバータ蛍光顕微鏡（オリンパス）下で蛍光強度を測定し、dR/Rbaseを算出した。

[0137] その結果を図4中の(a)～(c)に示す。図4中の(a)～(c)は、FRETプローブを各構造に固定したときのFRET効率を示すグラフである。

[0138] それぞれの形質転換体において測定されたdR/Rbaseは、E1-2Ca²⁺、E1-ATP、E2P、E2のそれぞれに固定した場合の順に、TdCV-sでは-1, -8, 6, -2% (図4中の(a))、V-L577では-6, 12, 15, 21% (図4中の(b))、F-L577では7, 12, 6, -2% (図4中の(c))であった。このように、各FRETプローブは、各構造において示すFRET効率がそれぞれ異なっており、それぞれ別の構造変化を反映してFRET効率が大きく変化することが示唆された。

[0139] すなわち、図4中の(a)～(c)より、TdCV-sのFRET効率は、E1-2Ca²⁺からE1-ATPに構造変化する際に大きく変化するものが示された。また、V-L577のFRET効率は、E2からE1-2Ca²⁺に構造変化する際に大きく変化するものが示された。また、F-L577のFRET効率は、E2PからE2に構造変化する際に大きく変化するものが示された。したがって、これらのプローブは、それぞれ異なる構造変化を検出するために有用であり、それぞれFRET効率が大きく変化する

る構造変化を検出するためのFRETプローブの提供に、利用することができる。

[0140] このように、本発明は、異なる構造変化を検出することができるFRETプローブの提供に利用することができることから、様々な構造を標的にした化合物のスクリーニングに有用である。また、SERCAの構造変化についての詳細な研究にも有用である。

[0141] [5. F-L577のFRET効率の変化と、Ca²⁺取り込み活性との関係]

F-L577について、FRET効率の変化と、Ca²⁺取り込み活性との関係を調べた。

[0142] まず、F-L577のFRET効率の変化と、ERにおけるCa²⁺の蓄積との関係を調べた。F-L577を発現する形質転換体にMgATPを添加してERへのCa²⁺蓄積を開始させ、FRET効率の変化と、ERにおけるMg-Indo-1の蛍光強度の変化とを検出した。

[0143] この結果を図5中の(a)～(b)に示す。図5中の(a)～(b)は、F-L577のFRET効率の変化と、ERにおけるCa²⁺の蓄積との関係を示すグラフである。MgATPの添加によって、ERにCa²⁺が蓄積される(図5中の(b))とともに、F-L577の $\Delta R/R_{base}$ が3～6%上昇した(図5中の(a))。

[0144] F-L577のFRET効率の変化とCa²⁺の取り込みとのタイミングが一致するかを調べた。図6中の(a)～(b)は、図5中の(a)～(b)に示したF-L577のFRET効率の一次導関数と、ERにおける、Ca²⁺の蓄積の一次導関数とを重ね合わせたグラフである。すなわち、 $\Delta R/R_{base}$ の一次導関数($d(\Delta R/R_{base})/dt$:実線)と、 $\Delta F/F_{base}$ の一次導関数($d(\Delta F/F_{base})/dt$:破線)とを重ね合わせたグラフである。図6中の(b)は、図6中の(a)を拡大して示したグラフである。これらのグラフは、 $\Delta R/R_{base}$ の一次導関数のピークと、 $\Delta F/F_{base}$ の一次導関数のピークとが一致することを示す。した

がって、F-L 577の構造変化が、ERへのCa²⁺の取り込みと同時に生じたことが示された。

[0145] また、SERCA2のCa²⁺の取り込み活性は、ATP濃度依存的であることが知られている。そこで、F-L 577のFRET効率の変化がATP依存的かを調べるために、ATP濃度を0.01mM、0.1mM、及び1mMとし、上述した実験を行なった。図7中の(a)は、ATP濃度と、F-L 577のFRET効率の変化との関係を示すグラフであり、図7中の(b)は、ATP濃度と、ERにおけるCa²⁺の蓄積との関係を示すグラフである。F-L 577のFRET効率の変化はATP濃度依存的であり(図7中の(a))、その依存性はCa²⁺の蓄積における依存性と類似することが示された。

[0146] 図8は、F-L 577のFRET効率と、ERにおけるCa²⁺の蓄積(ERにおけるMagg-Indo-1の蛍光の変化量)との相関関係を示す図である。図8は、異なるATP濃度での相関関係($r=0.767$, $N=61$)を示す。この結果は、F-L 577の応答と、Magg-Indo-1の応答とが、強く相関していることを示す。

[0147] 以上の結果から、F-L 577のFRET効率の正の変化は、SERCA2aの瞬間的なCa²⁺取り込み活性と、直接関連していることが示された。したがって、F-L 577は、小胞体カルシウムATPアーゼのCa²⁺取り込み活性を可視化するのに有用なFRETプローブであり、Ca²⁺取り込み活性を標的とした化合物のスクリーニングに利用可能であることが示された。

産業上の利用可能性

[0148] 本発明は、活性を保持した状態でのSERCAの動態を観察することができるので、小胞体カルシウムATPアーゼ動態指示薬として利用することができる。したがって、本発明は、SERCAの動態に関する研究、SERCAに関連する病気の治療、改善又は予防のための分子標的薬のスクリーニング、これらの病気の診断などに非常に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 小胞体カルシウムATPアーゼと、FRETの蛍光供与体と、FRETの蛍光受容体とを備え、
上記蛍光供与体と上記蛍光受容体とのうち、
一方は、上記小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結されており、
他方は、上記一方と上記小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、上記小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～6番目のアミノ酸、369～380番目のアミノ酸、もしくは572～583番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されていることを特徴とする融合タンパク質。
- [請求項2] 上記蛍光供与体及び上記蛍光受容体の少なくとも1つは、ドナーもしくはアクセプタとしての蛍光タンパク質、又はドナーもしくはアクセプタとしての蛍光物質であって特定のペプチド配列に特異的に結合しているものを利用するものであることを特徴とする請求項1に記載の融合タンパク質。
- [請求項3] 上記蛍光供与体が青色蛍光タンパク質であり、上記蛍光受容体が黄色蛍光タンパク質又はテトラシステインタグに特異的に結合するFlAsHもしくはその類縁体であることを特徴とする請求項1又は2に記載の融合タンパク質。
- [請求項4] 上記他方は、上記一方と上記小胞体カルシウムATPアーゼのN末端との間、又は、上記小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの374番目のアミノ酸と375番目のアミノ酸との間、もしくは577番目のアミノ酸と578番目のアミノ酸との間に対応する位置に挿入されていることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の融合タンパク質。
- [請求項5] 配列番号1～4のいずれか1つに示されるアミノ酸配列からなる融合タンパク質；あるいは

配列番号 1～4 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列の 1 又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る、融合タンパク質。

[請求項6] 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

[請求項7] 配列番号 6～9 のいずれかに示される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；

配列番号 6～9 のいずれかに示される塩基配列の 1 個又は数個の塩基配列が欠失、置換又は付加された塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；

配列番号 6～9 のいずれかに示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；あるいは

配列番号 6～9 のいずれかに示される塩基配列と少なくとも 66% 同一な塩基配列からなる、ポリヌクレオチド。

[請求項8] 請求項 6 又は 7 に記載のポリヌクレオチドを含んでいることを特徴とするベクター。

[請求項9] 請求項 6 又は 7 に記載のポリヌクレオチドを含んでいることを特徴とする形質転換体。

[請求項10] 請求項 8 に記載のベクターを含んでいることを特徴とする形質転換体。

[請求項11] 小胞体カルシウム ATP アーゼの挙動観察方法であって、
請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質を用いて、蛍光供与体からの蛍光強度と蛍光受容体からの蛍光強度とを検出することを特徴とする挙動観察方法。

[請求項12] 小胞体カルシウム ATP アーゼを標的分子とする化合物のスクリーニング方法であって、

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質を用いて、試

験化合物を処理した場合と処理しない場合とにおける、蛍光供与体からの蛍光強度と蛍光受容体からの蛍光強度との比を比較する工程を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

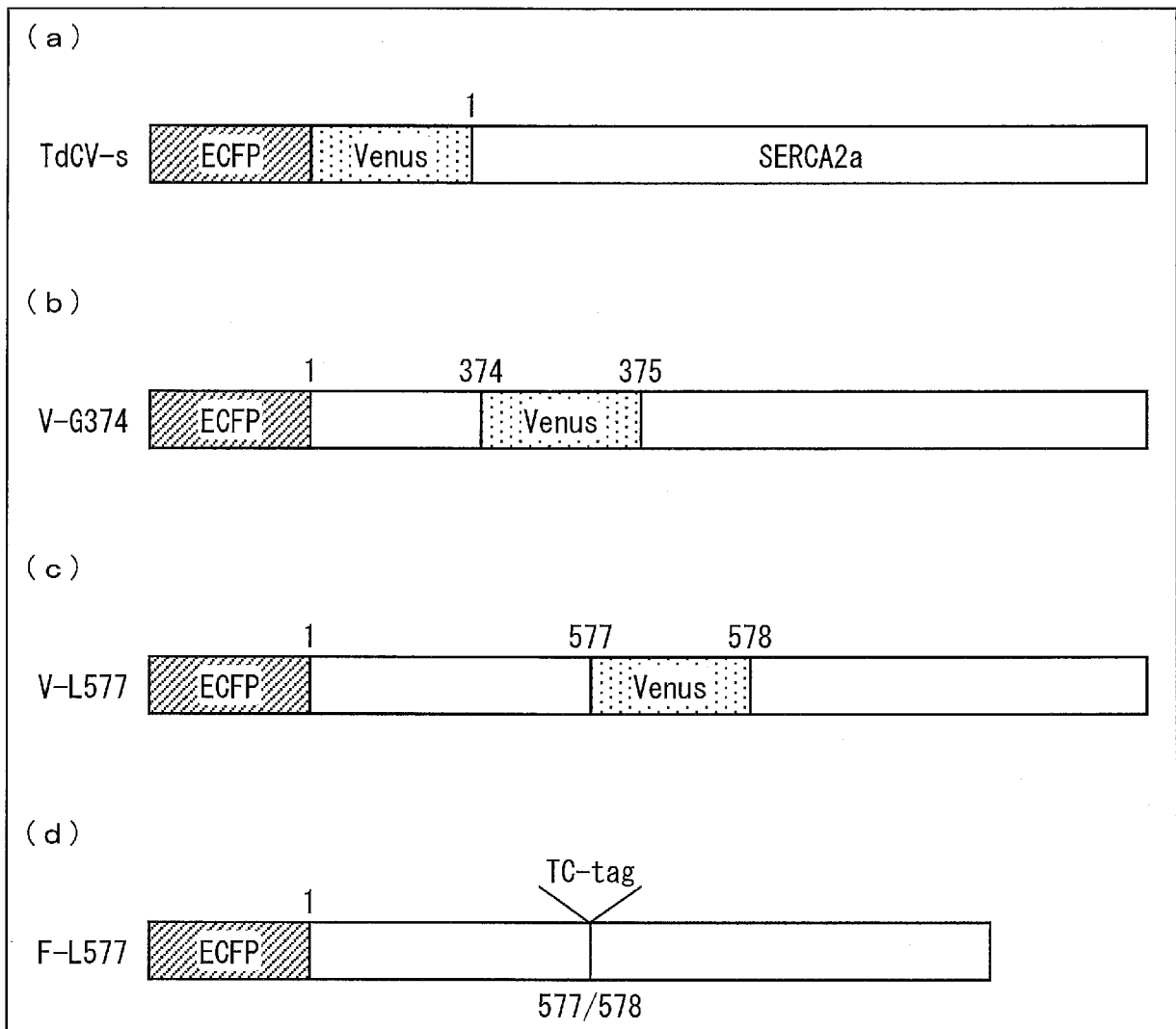
[請求項13] 請求項6又は7に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、小胞体カルシウムATPアーゼの挙動を観察するためのキット。

[請求項14] 小胞体カルシウムATPアーゼと、FRETの蛍光供与体と、FRETの蛍光受容体とを備えた融合タンパク質の設計方法であって、上記蛍光供与体と上記蛍光受容体とのうち、

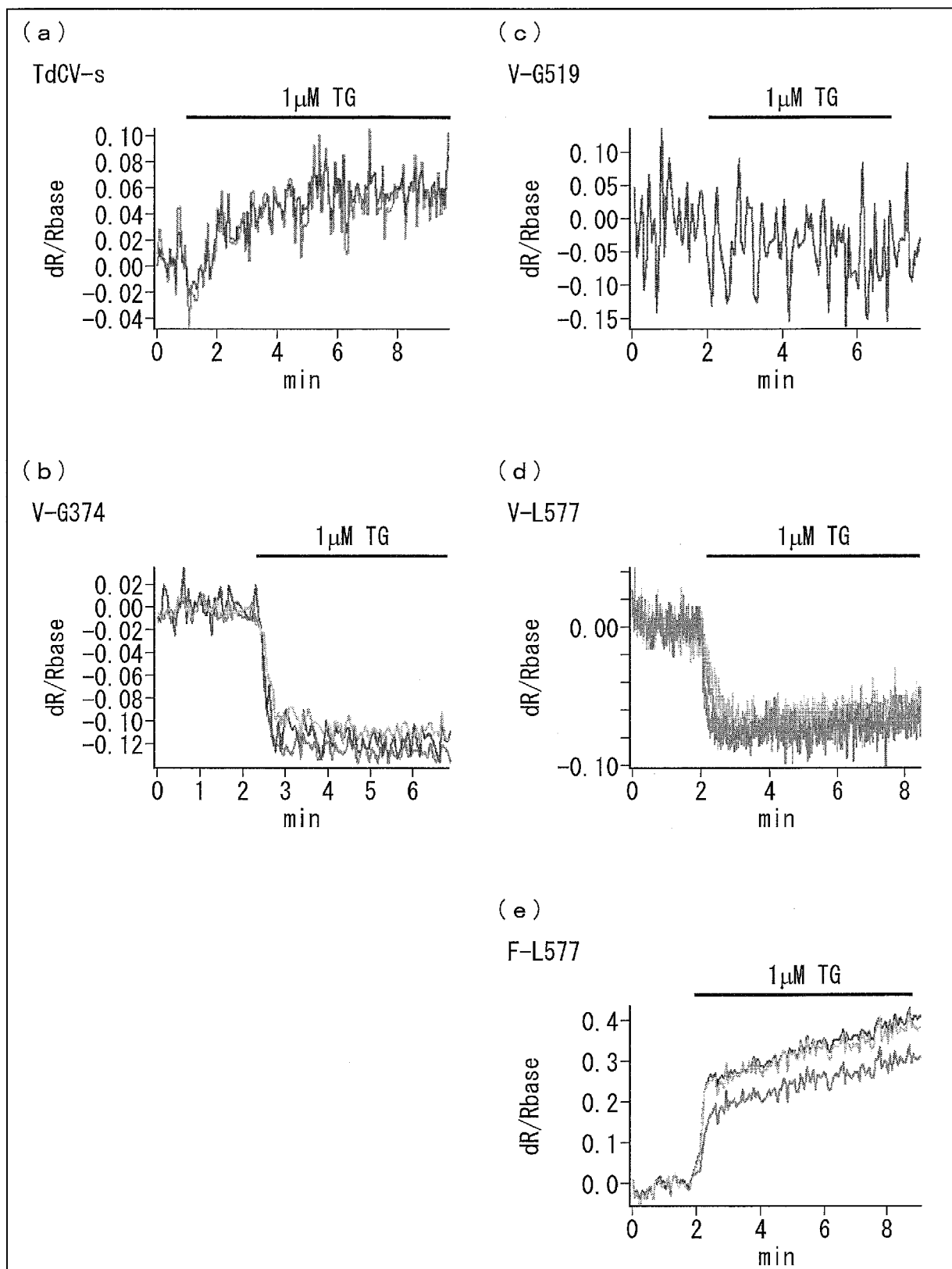
一方が、上記小胞体カルシウムATPアーゼのN末端側に連結され、

他方が、上記一方と上記小胞体カルシウムATPアーゼとの間、又は、上記小胞体カルシウムATPアーゼにおけるSERCA2aの1～5番目のアミノ酸、369～379番目のアミノ酸、もしくは572～582番目のアミノ酸に対応するアミノ酸配列内、に挿入されるように設計することを特徴とする融合タンパク質の設計方法。

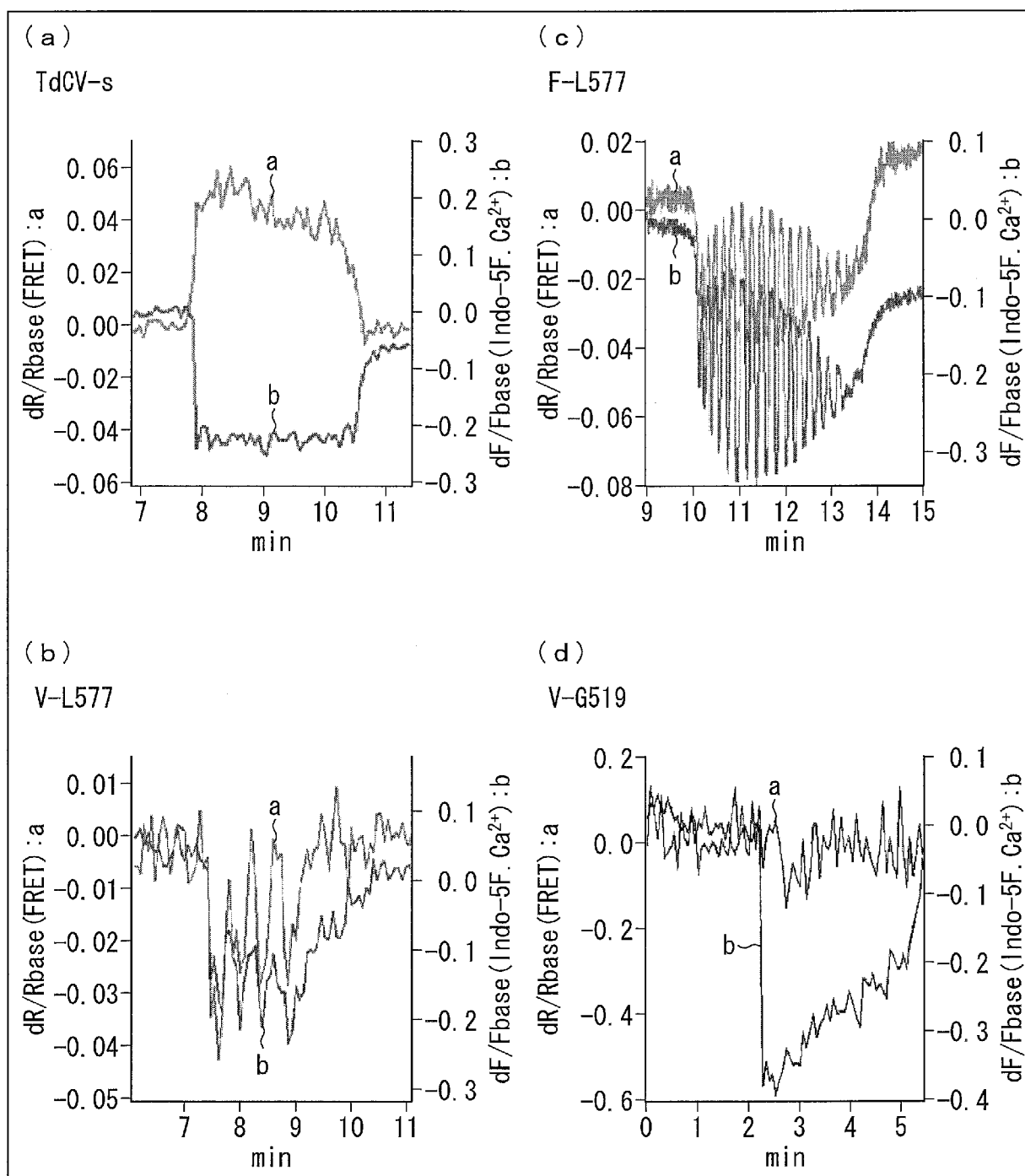
[図1]



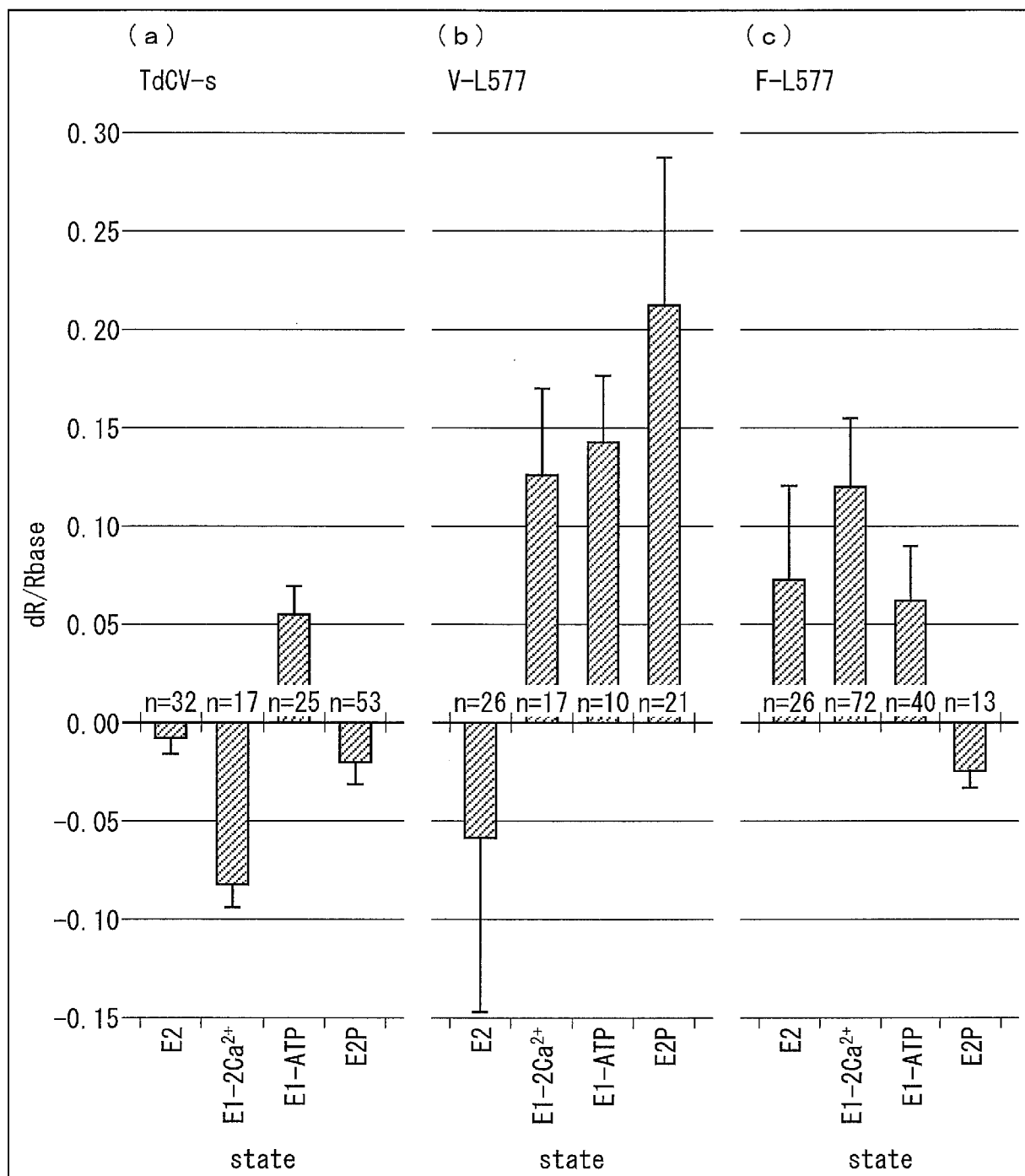
[圖2]



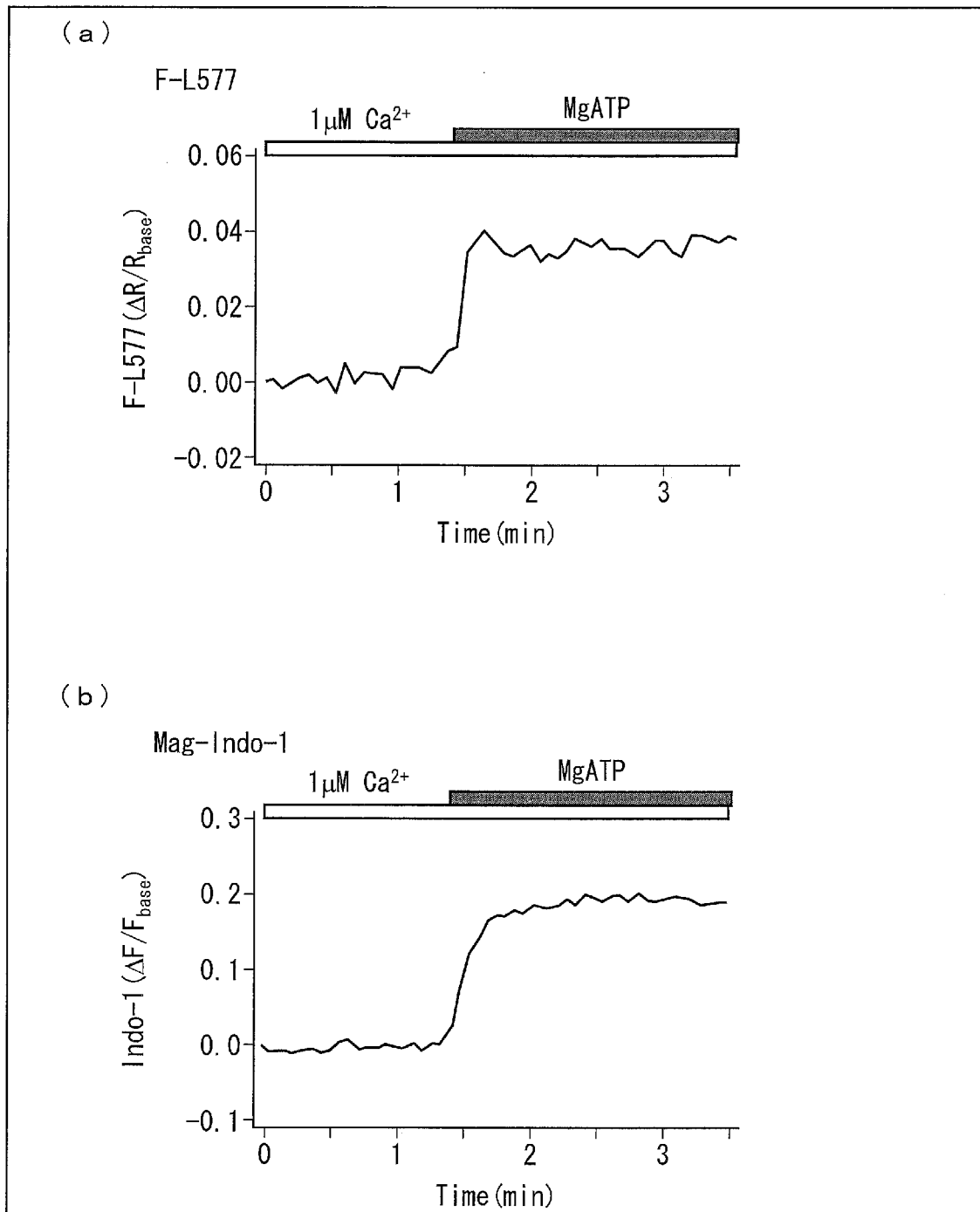
[圖3]



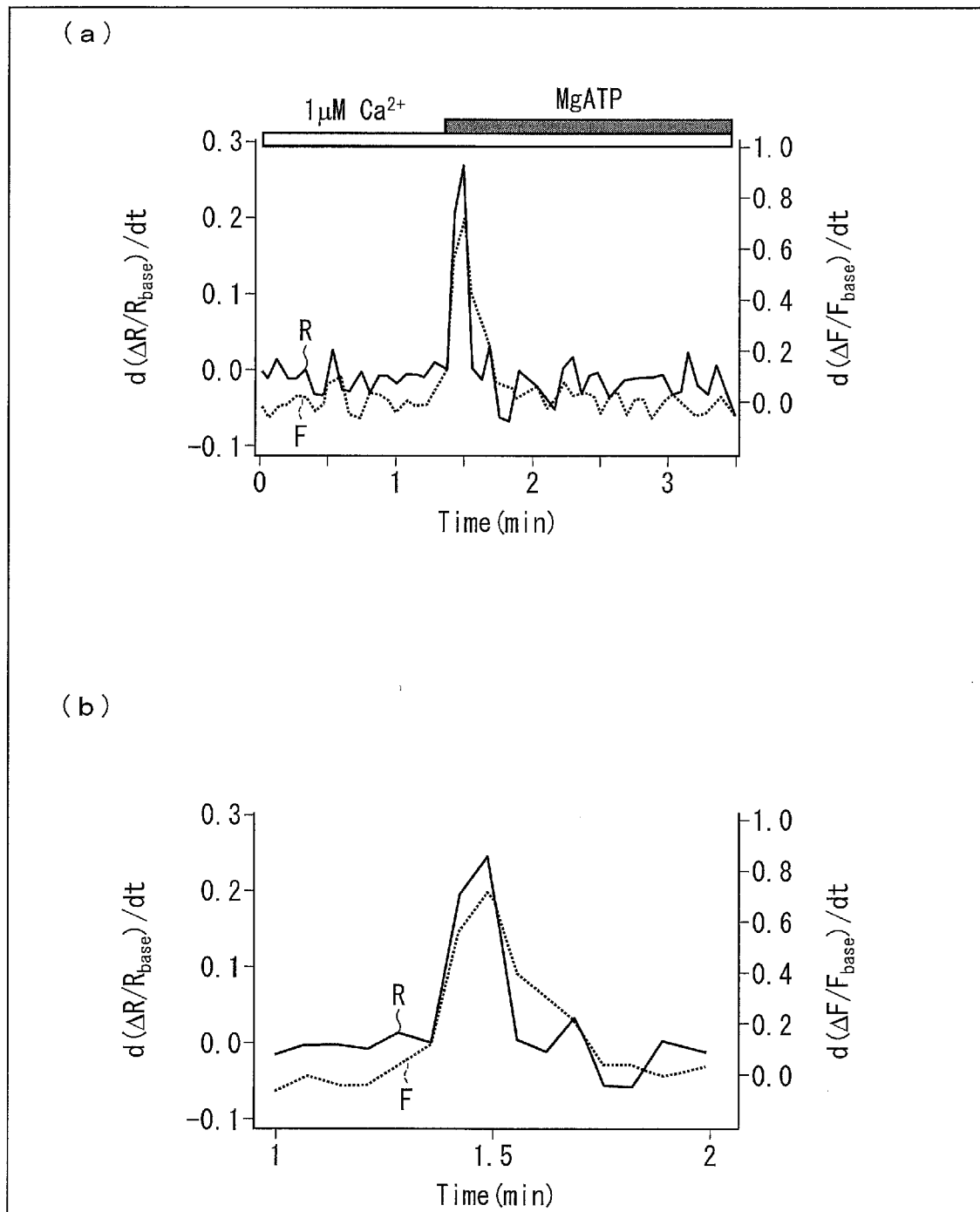
[圖4]



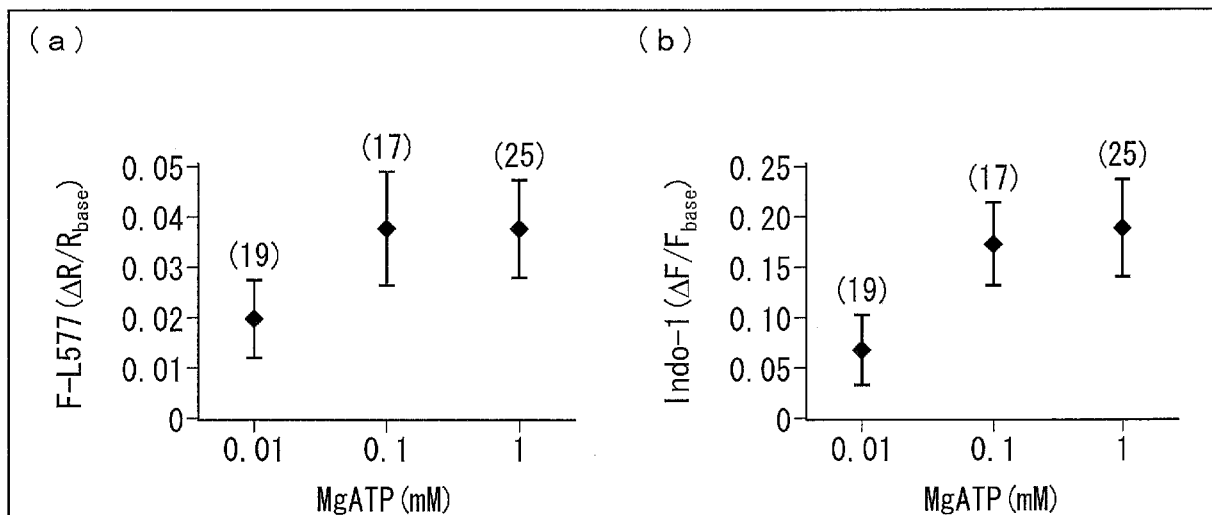
[圖5]



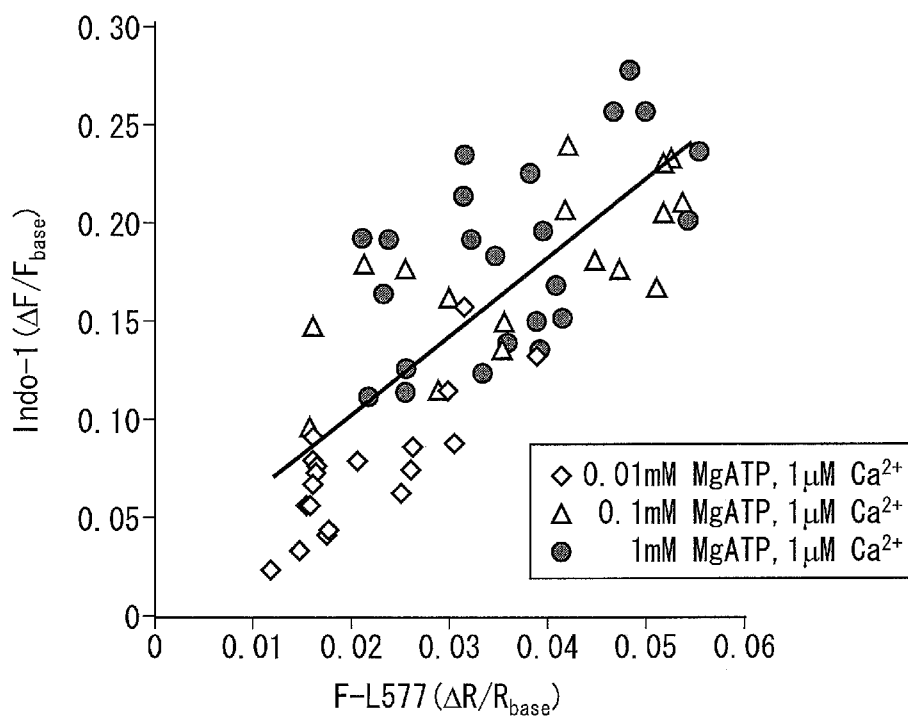
[圖6]



[圖7]



[圖8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/050628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12Q1/42(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C07K14/435, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, C12Q1/42

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WINTERS, D.L.et al., Fluorescence energy transfer within the Ca-ATPase using genetically encoded fluorescent probes. Biophysical Journal, 2004 Jan, 86(1), Supplement, p.243a	1-14
Y	SWEADNER, K.J. and DONNET, C., Structural similarities of Na, K-ATPase and SERCA, the Ca (2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Biochem J., 2001 Jun 15, 356(3), p.685-704	1-14
P,X	SATOH, K. et al., Highly cooperative dependence of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase SERCA2a pump activity on cytosolic calcium in living cells. J.Biol.Chem., 2011 Jun 10, 286(23), p.20591-9	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 January, 2012 (27.01.12)

Date of mailing of the international search report
07 February, 2012 (07.02.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/050628

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WINTERS, D.L.et al., Interdomain fluorescence resonance energy transfer in SERCA probed by cyan-fluorescent protein fused to the actuator domain. <i>Biochemistry</i> , 2008 Apr 8, 47(14), p.4246-56	1-14
A	VANGHELUWE, P.et al., Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. <i>Cell Calcium</i> , 2005 Sep-Oct, 38(3-4), p.291-302	1-14

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, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12Q1/42(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, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, C12Q1/42

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	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq

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
Y	WINTERS, D. L. et al., Fluorescence energy transfer within the Ca-ATPase using genetically encoded fluorescent probes. Biophysical Journal, 2004 Jan, 86(1), Supplement, p. 243a	1-14
Y	SWEADNER, K. J. and DONNET, C., Structural similarities of Na, K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Biochem J., 2001 Jun 15, 356(3), p. 685-704	1-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な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

27.01.2012

国際調査報告の発送日

07.02.2012

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)

渡邊 潤也

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3131

C (続き) . 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
PX	SATOH, K. et al., Highly cooperative dependence of sarco/ endoplasmic reticulum calcium ATPase SERCA2a pump activity on cytosolic calcium in living cells. J. Biol. Chem., 2011 Jun 10, 286 (23), p. 20591-9	1-14
A	WINTERS, D. L. et al., Interdomain fluorescence resonance energy transfer in SERCA probed by cyan-fluorescent protein fused to the actuator domain. Biochemistry, 2008 Apr 8, 47 (14), p. 4246-56	1-14
A	VANGHELUWE, P. et al., Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. Cell Calcium, 2005 Sep-Oct, 38 (3-4), p. 291-302	1-14