

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/090159

発行日 平成25年5月23日 (2013.5.23)

(43) 国際公開日 平成23年7月28日 (2011.7.28)

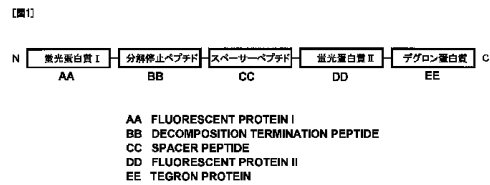
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	2 G O 5 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 24 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2011-550970 (P2011-550970)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/051089	(71) 出願人	503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22) 国際出願日	平成23年1月21日 (2011.1.21)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願2010-12084 (P2010-12084)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成22年1月22日 (2010.1.22)	(72) 発明者	官脇 敦史 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
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	平野 雅彦 埼玉県和光市本町29-39-102 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質の分解活性を測定するためのプローブ試薬

## (57) 【要約】

この発明は、N末側からC末端側に向かって順番に、蛍光蛋白質I、蛋白質の分解を停止させるペプチド（分解停止ペプチド）、スペーサーペプチド、蛍光蛋白質II、および分解を受ける蛋白質のそれぞれのアミノ酸配列を含んでなるプローブ試薬であって、ここで該分解を受ける蛋白質がユビキチン-プロテアソーム系で分解される蛋白質であり、および、該プローブ試薬のC末端側から分解を受けるがその分解は分解停止ペプチドで停止することを特徴とするプローブ試薬、該プローブ試薬をコードする核酸、あるいはプローブ試薬または核酸の使用に関する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

N末側からC末端側に向かって順番に、蛍光蛋白質I、蛋白質の分解を停止させるペプチド（分解停止ペプチド）、スペーサーペプチド、蛍光蛋白質II、および分解を受ける蛋白質のそれぞれのアミノ酸配列を含んでなるプローブ試薬であって、ここで該分解を受ける蛋白質がユビキチン-プロテアソーム系で分解される蛋白質であり、および、該プローブ試薬のC末端側から分解を受けるがその分解は分解停止ペプチドで停止することを特徴とするプローブ試薬。

**【請求項 2】**

蛍光蛋白質Iおよび蛍光蛋白質IIは、励起波長、蛍光波長、または、励起波長と蛍光波長の両方が異なるものである、請求項 1 に記載のプローブ試薬。

10

**【請求項 3】**

蛍光蛋白質Iおよび蛍光蛋白質IIはそれぞれ、蛍光エネルギー移動(FRET)でのドナーとアクセプタである、請求項 1 または 2 に記載のプローブ試薬。

**【請求項 4】**

核局在化シグナルまたは核外搬出シグナルをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のプローブ試薬。

**【請求項 5】**

分解停止ペプチドが、蛍光蛋白質Iとスペーサーの間に1個もしくは複数個存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載のプローブ試薬。

20

**【請求項 6】**

スペーサーペプチドは、分解停止ペプチドと蛍光蛋白質IIの間に距離をおくための1個以上のアミノ酸からなるペプチドである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のプローブ試薬。

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のプローブ試薬をコードする核酸。

**【請求項 8】**

請求項 7 に記載の核酸を発現可能に含むベクター。

**【請求項 9】**

請求項 8 に記載のベクターを含む形質転換細胞。

30

**【請求項 10】**

疾病細胞である、請求項 9 に記載の形質転換細胞。

**【請求項 11】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載のプローブ試薬、請求項 8 に記載のベクター、あるいは請求項 9 または 10 に記載の形質転換細胞を用いて、プロテアソーム活性を制御する候補物質の存在下で細胞におけるユビキチン-プロテアソーム系での該プローブ試薬蛋白質の分解活性を測定することを含む、ユビキチン-プロテアソーム系の異常に関連する疾病の治療剤をスクリーニングする方法。

**【請求項 12】**

プローブ試薬蛋白質の分解活性を、蛍光蛋白質IとIIの蛍光強度の比の変化として測定する、請求項 11 に記載の方法。

40

**【請求項 13】**

細胞がユビキチン-プロテアソーム系の異常に関連する疾病細胞である、請求項 11 または 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載のプローブ試薬または請求項 8 に記載のベクターと、疾病患者からの細胞または細胞抽出液とを接触させて該プローブ試薬蛋白質の分解活性を測定することを含む、ユビキチン-プロテアソーム系の異常と疾病との関連を調べる方法。

**【請求項 15】**

50

プローブ試薬内の分解を受ける蛋白質（デグロン蛋白質）が疾病に関連する蛋白質である、請求項11または14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生きている細胞内でユビキチン-プロテアソーム系に依存した特定の蛋白質分解活性を測定するための蛍光プローブ試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞がもつ蛋白質の分解経路の1つとして、ユビキチン-プロテアソーム系がよく知られている。この反応系では、変性した蛋白質や折りたたみが異常な蛋白質にユビキチンとよばれる小型の蛋白質が複数個、鎖状に付加される。このユビキチン鎖は分解されるべき蛋白質としての目印となり、蛋白質の分解装置であるプロテアソームによって認識され破壊される。この系により、細胞内の異常な蛋白質の除去が行われる。しかし、ユビキチン-プロテアソーム系は、必ずしも細胞内の蛋白質の品質管理を行うためだけの系ではない。構造的、機能的に正常な蛋白質であっても、そのときの細胞の状態に応じて分解し、その活性を抑えることで種々の細胞機能の制御を行っている。これまでに多くの蛋白質がユビキチン-プロテアソーム系によってその存在量が制御されることが知られている。これらの蛋白質の機能としては、細胞周期の制御、遺伝子発現の調節、ストレス応答、DNAの修復など多種多様である。このように、細胞が示す多くの生命現象がこの系によって制御されていることから、ユビキチン-プロテアソーム系は細胞の正常な活性の維持に欠かせないものとされている。そのため、この蛋白質分解系の機能低下は細胞に危機的な影響を与える。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、細胞内に異常な蛋白質の蓄積や凝集が観察されるが、これらの疾患の発症の原因としてユビキチン-プロテアソーム系の機能異常が示唆されている。またユビキチン-プロテアソーム系が、細胞周期やDNAの修復などにも関与することから、この系の破綻から細胞の癌化が誘導されることも知られている。このように、ユビキチン-プロテアソーム系が多くの重要な生命現象の制御を担っていることから、この反応系を精確かつ簡便に測定する手法を開発することは、細胞が示す生命現象のメカニズムの解明だけでなく、その異常によって誘発される疾患に対する治療法や薬剤の開発にも大きく貢献するものと思われる。

【0003】

細胞内で行われるユビキチン-プロテアソーム系での蛋白質の分解の測定には、従来、ウェスタンブロッティングなどの生化学的手法が用いられてきた。この手法では多数の細胞をまとめて破壊し、その成分を回収する。その中に含まれる測定対象とする蛋白質を、電気泳動で分子量に応じて分離、さらに特異的な抗体を利用した染色により検出する。これによりその蛋白質の存在量や分解活性が測定される。しかし、この手法では操作が煩雑で時間を要するうえ、生きている個々の細胞での測定が行えない。

【0004】

近年、ホタルなどが示す生物発光反応に関わるルシフェリン、ルシフェラーゼや、オワンクラゲなどから得られた蛍光蛋白質を、細胞内の分子の動態をモニタするためのプローブ試薬として応用する技術が大いに発展した。これが顕微鏡イメージングの技術の進歩とあいまって、細胞内の特定の生理的活性を時空間的に可視化し、計測するための手法が一般化されてきた。プロテアソームでの蛋白質の分解活性についても、この手法により生きた細胞内で計測されるようになってきている。この手法では、測定対象とされる蛋白質をルシフェラーゼや蛍光蛋白質と融合させたものをプローブ試薬としている（特許文献1）。この蛋白質が細胞に存在するときには、標識とされた発光あるいは蛍光が観察されるが、プロテアソームで分解されるときには融合されたルシフェラーゼや蛍光蛋白質も道連れとなっていっしょに分解されるため、発光や蛍光が観察されなくなる。したがって、これらの光強度の変動をモニタすることでこの蛋白質の分解活性を測定することができる。これまでにこの手法により、I B , p27 , p53 , HIF-1 などといった蛋白質の分解の測定が行

われている(特許文献2、非特許文献1~3)。しかし、これらのプローブ試薬では標識として使用されるルシフェラーゼや蛍光蛋白質が1種類であることから、発光または蛍光を1波長のみで測定している。このため、光の強度が、プローブ試薬の分布や発現量の不均一、細胞や組織の形態、退色などによる消光、励起光のむらなどといった蛋白質の分解活性に依存しない要因により影響を受けることで、定量的な測定が困難となっている。また分解活性が高まることで光量が減少した場合に、検出器の感度の不足やS/Nの低下が生じ、正確な測定が困難になるという問題もある。

#### 【0005】

1波長のみでの測光法で問題となる蛋白質の分解に依存しない要因の影響は、発光や蛍光を2波長で測定し、その強度の比をもとめることでキャンセルすることができる。Davisらの手法では、測定対象とする蛋白質、I B をコメツキムシ由来の緑色の発光を示すルシフェラーゼ(CBG68)と融合させて細胞に発現させた。またこれと同時にコメツキムシ由来の赤色の発光を示すルシフェラーゼ(CBR)を同じ細胞に発現させた。CBG68の発光量は、I B のプロテアソームでの分解活性に応じて増減を示す。一方、CBRの発光はその影響を受けないため対照として使用された。彼らはマルチウェルのプレートで培養された細胞群で発光測定を行っており、ウェル間の細胞数の違いなどに由来する発光量の差異を補正するために、I B の分解活性を緑/赤の発光強度の比として計測した(非特許文献4)。この手法では、1波長測光法と比べれば定量性を向上させてはいるが、2つのプローブ分子を個別に発現させるために、細胞間でこれらの発現量の比、すなわち発光強度の比を揃えることが困難であるという問題がある。また標識として使用されるルシフェラーゼや蛍光蛋白質の性質によっては、これらが細胞内に均一に分布せずその局在に違いが出てしまうというおそれもある。これらのことは、特に単一細胞レベルでの蛋白質の分解活性を測定したい場合にその精度を落とす要因となる。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0006】

【特許文献1】特開2007-209227

【特許文献2】特表2004-533224

#### 【非特許文献】

#### 【0007】

【非特許文献1】Li,X. et al., J. Biol. Chem., Vol.274, p.21244-21250, 1999

【非特許文献2】Zhang,G.-J. et al., Nat. Med., Vol.10, p.643-648, 2004

【非特許文献3】Rehemtulla,A. et al., Mol. Imaging, Vol.3, p63-68, 2004

【非特許文献4】Davis,R.E. et al., Assay and Drug Development. Technologies, Vol.5, p.85-103, 2007

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本発明の目的は、生きている細胞内でユビキチン-プロテアソーム系に依存した特定の蛋白質分解活性を測定するための蛍光プローブ試薬を提供することである。

#### 【0009】

このようなプローブ試薬は、背景技術に記載したような従来法の問題点を克服するものである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は、要約すると、以下の特徴を含む。

#### 【0011】

(1) N末側からC末側に向かって順番に、蛍光蛋白質I、蛋白質の分解を停止させるペプチド(分解停止ペプチド)、スパーサーペプチド、蛍光蛋白質II、および分解を受ける蛋白質のそれぞれのアミノ酸配列を含んでなるプローブ試薬であって、ここで該分解を受

ける蛋白質がユビキチン - プロテアソーム系で分解される蛋白質であり、および、該プローブ試薬のC末端側から分解を受けるがその分解は分解停止ペプチドで停止することを特徴とするプローブ試薬。

【0012】

(2) 蛍光蛋白質Iおよび蛍光蛋白質IIは、励起波長、蛍光波長、または、励起波長と蛍光波長の両方が異なるものである、前記(1)に記載のプローブ試薬。

【0013】

(3) 蛍光蛋白質Iおよび蛍光蛋白質IIはそれぞれ、蛍光エネルギー移動(FRET)でのドナーとアクセプタである、前記(1)または(2)に記載のプローブ試薬。

【0014】

(4) 核局在化シグナルまたは核外搬出シグナルをさらに含む、前記(1)~(3)のいずれかに記載のプローブ試薬。

【0015】

(5) 分解停止ペプチドが、蛍光蛋白質Iとスペーサーの間に1個もしくは複数個存在する、前記(1)~(4)のいずれかに記載のプローブ試薬。

【0016】

(6) スペーサーペプチドは、分解停止ペプチドと蛍光蛋白質IIの間に距離をおくための1個以上のアミノ酸からなるペプチドである、前記(1)~(5)のいずれかに記載のプローブ試薬。

【0017】

(7) 前記(1)~(6)のいずれかに記載のプローブ試薬をコードする核酸。

【0018】

(8) 前記(7)に記載の核酸を発現可能に含むベクター。

【0019】

(9) 前記(8)に記載のベクターを含む形質転換細胞。

【0020】

(10) 疾病細胞である、前記(9)に記載の形質転換細胞。

【0021】

(11) 前記(1)~(6)のいずれかに記載のプローブ試薬、前記(8)に記載のベクター、あるいは前記(9)または(10)に記載の形質転換細胞を用いて、プロテアソーム活性を制御する候補物質の存在下で細胞におけるユビキチン-プロテアソーム系での該プローブ試薬蛋白質の分解活性を測定することを含む、ユビキチン - プロテアソーム系の異常に関連する疾病の治療剤をスクリーニングする方法。

【0022】

(12) プローブ試薬蛋白質の分解活性を、蛍光蛋白質IとIIの蛍光強度の比の変化として測定する、前記(11)に記載の方法。

【0023】

(13) 細胞がユビキチン - プロテアソーム系の異常に関連する疾病細胞である、前記(11)または(12)に記載の方法。

【0024】

(14) 前記(1)~(6)のいずれかに記載のプローブ試薬または前記(8)に記載のベクターと、疾病患者からの細胞または細胞抽出液とを接触させて該プローブ試薬蛋白質の分解活性を測定することを含む、ユビキチン - プロテアソーム系の異常と疾病との関連を調べる方法。

【0025】

(15) プローブ試薬内の分解を受ける蛋白質(デグロン蛋白質)が疾病に関連する蛋白質である、前記(11)または(14)に記載の方法。

【0026】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-012084号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

10

20

30

40

50

## 【発明の効果】

## 【0027】

本発明により、生きている細胞（「生細胞」ともいう）内でユビキチン-プロテアソーム系での蛋白質の分解活性をリアルタイムで測定できるプローブ試薬が提供される。このプローブ試薬は、背景技術で挙げたプローブ試薬で生じる問題点を克服している。2つの蛍光蛋白質の間に分解停止ペプチドを配したことで、蛋白質の分解活性の高まりにより試薬が分解されるときにも1つの蛍光蛋白質からのシグナルが得られるようになった。これにより、分解活性が高まったときも精度の高い測定が行えるようになった。2つの蛍光蛋白質は1つの分子内に存在するため、これらはどの細胞でも1:1の量比で発現される。このため、これらの蛍光強度の変化をレシオ(ratiometric)法で測定することで細胞間の蛋白質の分解活性の比較が容易かつ定量的に行えるようになった。また2つの蛍光蛋白質の局在も常に一致するため、細胞内の蛋白質の分解活性の分布を精度よく測定することができる。以上のような特性により、時空間的な蛋白質の分解活性の測定の精度、定量性、簡便性を向上させることができた。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0028】

【図1】本発明のプローブ試薬の構造を示す。

【図2】分解停止ペプチド探索用プローブ試薬の構造を示す。

【図3】分解停止ペプチドおよびスペーサーペプチドとして使用されたp105の部位を示す。

20

【図4】分解停止ペプチド探索用プローブ試薬の蛍光観察例を示す。

【図5】分解停止ペプチド探索用プローブ試薬のFRET測定の結果を示す。図中、\*は、核のみならず細胞質にも蛍光が観察されたことを示す。

【図6】細胞の核と細胞質での、Gemininデグロンプローブ試薬の蛍光強度比の時間変化を示す。

【図7】Gemininデグロンプローブ試薬のタイムラプスイメージングを示す。

【図8】I B デグロンプローブ試薬の構造を示す。

【図9】I B デグロンプローブ試薬のタイムラプスイメージングを示す。

【図10】細胞No.1~No.4での、I B デグロンプローブ試薬の蛍光強度比の時間変化を示す。

30

## 【発明を実施するための形態】

## 【0029】

本発明のプローブ試薬は蛋白質で作られており、構造として、N末側から蛍光蛋白質I、蛋白質の分解を停止させるペプチド、この分解停止ペプチドと次の蛍光蛋白質IIの間に距離を設けるスペーサーペプチド、蛍光蛋白質II、分解を受ける蛋白質の5つの要素が連結された形態をとる。蛋白質の分解活性が高まったとき、このプローブ試薬はC末側から分解を受けるが、その分解は分解停止ペプチドで停止する。この結果、蛍光蛋白質Iは残り、蛍光蛋白質IIは分解されて消失するため、これらの蛍光強度の変化をモニタすることで蛋白質の分解活性を測定することができる。

## 【0030】

本発明のプローブ試薬は、ユビキチン-プロテアソーム系による蛋白質分解活性を生きている細胞内で測定するために使用できるという特徴をもつ。

40

## 【0031】

プロテアソームは、細胞がもつ蛋白質分解装置である。樽型の構造をしており、その内腔部にプロテアーゼの活性部位をもつ。プロテアソームで分解を受ける蛋白質はユビキチンリガーゼなどの働きによりポリユビキチン化の修飾を受ける。プロテアソームはこの目印が付加された蛋白質を認識し、その立体構造をほどこきながら内腔部に取り込み、数アミノ酸のペプチドにまでに破壊する。

## 【0032】

しかし、プロテアソームに認識されたすべての蛋白質がこのように完全に破壊されるわ

50

けではない。蛋白質の中には分解が限定された一部にとどまり、分子全体の分解からは免れるものがあることが知られている。例えば、転写因子、NF Bの構成要素の1つであるp105という蛋白質は、静止時には細胞質に分布し、転写因子としての活性が抑えられている。しかし、活性化のシグナルを受けたときにはユビキチン化を受け、プロテアソームでC末側からおよそ半分までの構造は破壊されるが、残りは分解されずにp50とよばれる蛋白質として放出される。そしてこのp50が核に移行して遺伝子の転写活性を促す。すなわち、NF Bはその転写活性のON/OFFの制御にプロテアソームの分解活性を利用しているといえる。

#### 【0033】

Tianら(Nat. Struct. Mol. Biol., Vol.12, p.1045-1053, 2005)は、このプロテアソームでの蛋白質の分解を途中で停止させるための構造として、同じアミノ酸が連続して並ぶ simple sequenceとよばれる配列と、その分解が進む方向の後方に、強固な立体構造である tightly folded domainが配置されることが必要であることを報告している。p105の場合、グリシンが高頻度に現れる Glycine-rich region(GRR)とよばれる部分が simple sequenceに、Rel homology domainが tightly folded domainに相当する(Tian,L. et al., 上掲)。

#### 【0034】

本発明のプロープ試薬は、このように蛋白質の分解を途中で停止させる、プロテアソームでの限定的な分解反応を利用している。 パレル構造をとる蛍光蛋白質を tightly folded domainと想定し、これに simple sequence配列をもつペプチドを組み合わせることで、プロテアソームでの分解を途中で停止させるプロープ試薬を作製した。このプロープ試薬は、励起または蛍光波長、あるいはその両方が異なる2種類の蛍光蛋白質、分解を停止させるペプチド、分解停止ペプチドと次に続く蛍光蛋白質との間に距離をおくスペーサーペプチド、プロテアソームで分解を受ける蛋白質(「デグロン蛋白質」と称する)の5つの領域から構成される。プロープ試薬は、これら5つの領域が1本のアミノ酸鎖として連結された構造となっている。各領域が、N末側から蛍光蛋白質I, 分解停止ペプチド, スペーサーペプチド, 蛍光蛋白質II, デグロン蛋白質の順序で配置されている(図1)。例えば、プロープ試薬の蛍光蛋白質I, IIとしてそれぞれ蛍光波長が異なるものを使用した場合、この試薬はデグロン蛋白質が分解を受けていないときには、その全長が維持されているため2波長の蛍光を発することができる。一方、デグロン蛋白質が分解を受けたときは、そのN末側に連結された蛍光蛋白質IIもつづけて分解されて消失する。しかし、この分解はさらにそのN末側にある分解停止ペプチドにより止められるため、蛍光蛋白質Iは分解を受けずに残り、この蛍光のみが観察されるようになる。したがって、この2波長の蛍光強度の変化を測定することでデグロン蛋白質の分解活性を測定することができる。

#### 【0035】

蛍光蛋白質としてはオワンクラゲから得られた Green fluorescent protein(GFP)やその変異体、その他サンゴなど種々の生物種から得られたものやその変異体、例えば、非限定的に GFP, EGFP, CFP, YFP, ECFP, YPet, CyPet, Venus, mCherry, Cerulean, mKeima, T-Sapphire, Midoriishi-Cyan, Kusabira-Orangeなどの公知の蛍光蛋白質、が使用できる(Current Protocols in Cell Biology, 2006; 21.5.1-21.5.33 (John Willy & Sons), J. Endocrinol. 2001; 170:297-306, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009; 19:3748-3751)。デグロン蛋白質の分解活性を2波長の蛍光強度の変化から測定できるように、蛍光蛋白質IとIIとしては、それぞれ励起または蛍光波長、あるいはその両方が大きく異なるものを使用する。

#### 【0036】

このプロープ試薬の構造の中で、蛍光蛋白質IとIIは蛍光エネルギー移動(FRET)が起こるほどに近接した位置に配置される。しかし、デグロン蛋白質の分解にともない蛍光蛋白質IIが消失するとFRETが解消されることから、蛍光蛋白質としてFRETでのドナーとアクセプタとなりうるペアを使用することでFRET量の変化からも蛋白質の分解活性を測定することができる。FRET量が増加するときにはドナーを励起したときのドナーとアクセプタそれ

10

20

30

40

50

それぞれの蛍光強度に変化を与える。そこで、例えば蛍光蛋白質Iをドナー、IIをアクセプタとすると、FRET量の変化は蛍光蛋白質Iを励起したときの蛍光蛋白質IとIIの蛍光強度の比の変化として測定することができる。またFRETが起きている場合には、起きていないときと比べてドナーの蛍光寿命が短くなることが知られている。そこで、蛍光蛋白質Iにドナーとなる蛍光蛋白質を使用することで、その蛍光寿命の変化からもデグロン蛋白質の分解活性を測定することができる。ドナーとアクセプタとなる蛍光蛋白質のペアの例としては、Cyan fluorescent protein (CFP)とYellow fluorescent protein (YFP)、Midoriishi-CyanとKusabira-Orangeなどがある。

#### 【0037】

プローブ試薬の分解を停止させるためのペプチドについては、プロテアソームで限定的な分解を受ける蛋白質、p105の分解を停止させるとされる領域からその配列を探索した(以下、human p105のアミノ酸の番号はAccession number NM\_003998, human NFkB1 transcript variant 1に準じて記載するが、この他にNM\_001165412 (human NFkB1 transcript variant 2), NM\_008689及びNM\_001159394 (いずれもmouse homologs)などが知られている。)。ヒトのp105蛋白質は969個のアミノ酸から構成される。前に述べたようにこの蛋白質は活性化を受けると、プロテアソームでC末側の約半分の領域は分解されるが、N末端から435個までのアミノ酸は分解を免れ、p50とよばれる蛋白質として放出される。この分解が停止するポイントはprocessing pointとよばれる。Simple sequenceに相当するGRR(Glycine Rich Region)はN末側から376-404番目のアミノ酸の領域であり、この中に19個のグリシンが集中して存在する(Orian, A. et al., Mol. Cell. Biol., Vol.19, p.3664-3673, 1999)。そこでこのGRRおよびその周辺の配列が蛍光蛋白質の手前でも分解停止ペプチドとして機能するか調べたところ、GRRのみでは分解が停止せずに、分解の停止にはさらにそのC末側の配列を含むことが必要であることがわかった。またGRRのC末側に続くアミノ酸配列は必ずしもp105由来のものでなくてもよいことがわかった。この結果からこのプローブ試薬がプロテアソームでの分解から免れるためには、GRRのC末側、蛍光蛋白質IIまでの間に距離をおくためのペプチド配列が必要であることが示された。ここでは、GRRの部分を分解停止ペプチド、そのC末側に続く配列をスペーサーペプチドと呼ぶことにした。またGRRのN末側、蛍光蛋白質Iとの間は10個又はそれ以上のアミノ酸が挿入されると、分解が停止されることがわかった。

#### 【0038】

このような分解停止能をもつペプチドは、p105のようにプロテアソームでの限定的な分解を受ける他の蛋白質であってもよい。このような蛋白質としては、以下に限定されないが、例えばp100(転写因子、NF- $\kappa$ Bの構成要素)、Cubitus interruptus(シヨウジョウバエの転写因子; 例えばNM\_079878, NM\_001081125(mouse homolog), NM\_005270(human homolog)), EBNA-1(Epstein-Barrウイルスの蛋白質)、Spt23(酵母の転写因子; 例えばNC\_001143, NM\_001179586, NC\_006029, EU861367)、Mga2(酵母の転写因子; 例えばNM\_001179555, NC\_001141, NC\_006029, CP000499)などが挙げられる(Rape, M. and Jentsch, S., Nat. Cell Biol., Vol.4, E113-E116, 2002)((注)明細書中に記載のaccession numberはいずれもGenBank accession numberである。)。さらに、これらに由来するGRR様ペプチドも分解停止ペプチドとして使用できる。このような分解停止ペプチドは、次の特徴(a)~(d)を有することができる。

#### 【0039】

(a) 分解停止ペプチドは、グリシン, アラニン, セリン, アスパラギン酸, アスパラギンなど側鎖に0~3個の炭素原子をもつアミノ酸を、70%以上の構成比率で含むペプチドからなる。

#### 【0040】

(b) 分解停止ペプチドは、蛍光蛋白質Iとスペーサーの間に複数個配列させてもよい。

#### 【0041】

(c) スペーサーペプチドは、分解停止ペプチドと蛍光蛋白質IIの間に距離をおくためのペプチドで1個以上のアミノ酸を含み、例えば、1~200アミノ酸、好ましくは、2~100アミ

10

20

30

40

50



ノ酸、より好ましくは5~50アミノ酸よりなる。

【0042】

(d) 蛍光蛋白質Iと分解停止ペプチドの間のアミノ酸は10個未満であり、0個でもよい。

【0043】

デグロン蛋白質は、測定の対象となる、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される蛋白質である。プロテアソームで分解される蛋白質は数多く知られており、本発明のプローブ試薬はこの領域を置き換えることで、これらの蛋白質の分解活性の測定に汎用的に使用できる。ユビキチン-プロテアソーム系で分解される蛋白質としては、以下に限定されないが、例えばCyclin (A, B, D, E), p53, A, p27, p21, p16, p15, p18, p19, p62, I B, NF-, c-fos/c-jun, c-myc, catenin, E2F-1, p130, cdc25, Tyrosine amino tra nsferase, Polo-like kinase, Topoisomerase 1, Smad, Notch, Nrf2, HIF-1, Geminin などの公知の蛋白質が挙げられる (Adams, J. et al., Invest. New Drugs, 18, 109-121, 2000; Nakano, T et al., Acta Neuropathol. (Berl), 107:359-364, 2004)。デグロン蛋白質として、その全長の構造を使用してもいいが、その分子の中でユビキチン化を受ける部分や、そのユビキチン化の誘導に必要なリン酸化などの修飾を受ける部分など、その蛋白質の分解に必須とされる部分のみを用いてもよい。細胞にとってプローブ試薬は外来の分子となる。そのため、細胞内へのプローブ試薬の導入により細胞の活性に不要な攪乱が生じるのを避けるため、デグロン蛋白質としては分解に必要な構造のみを含み、その他の活性領域は省かれているほうがよい。

【0044】

前述のとおりユビキチン-プロテアソーム系の異常は種々の疾病と関連している。そのような疾病には、例えば神経変性疾患、癌(もしくは、腫瘍)、虚血性疾患(例えば梗塞)、炎症性疾患、アレルギー性疾患などが知られている。そのような異常に関連する疾病のうち、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患は、デグロン蛋白質がプロテアソームにより分解されにくいために起こる(特開2009-149524、特開2008-222603など)ので、プロテアソームを活性化する薬剤が治療剤となりうるし、一方、癌は、デグロン蛋白質がプロテアソームによって分解されて起こる(特開2007-254320など)ので、プロテアソーム阻害剤が治療剤となりうる。

【0045】

本発明のプローブ試薬は、細胞がもつユビキチン-プロテアソーム系による蛋白質の分解反応を測定するために使用することができるが、この分解系は真核細胞に普遍的に存在するものであるため、あらゆる種類の細胞を測定対象とすることができる。このような細胞には、ユビキチン-プロテアソーム系の異常に関連する細胞、例えば神経細胞、腫瘍細胞、リンパ球、皮膚細胞、関節滑膜細胞なども含まれる。

【0046】

また、本発明のプローブ試薬は蛋白質のみで構成されるため、そのアミノ酸配列をコードする核酸(例えば遺伝子、DNAまたはメッセンジャーRNA)を細胞に導入することで、プローブ試薬を細胞に発現させて測定に用いることができる。プロテアソームは核と細胞質に分布することが知られているが、核のみに局在させて発現させるシグナル配列(核局在化シグナル)、あるいは細胞質のみに局在させて発現させるシグナル配列(核外搬出シグナル)をプローブ試薬に付加して発現させることで、これらの部位でのデグロン蛋白質の分解活性を選択的に測定することができる。核局在化シグナルおよび核外搬出シグナルは文献等で公知のものを使用できる。細胞へのDNAやRNAの導入は、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法など一般的に行われる手法が利用可能である。

【0047】

本発明のプローブ試薬をコードする核酸は、例えば、プローブ試薬を構成する蛋白質やペプチドの各々をコードするDNAを公知のクローニング法、PCR法などで取得し、順番に連結したのちPCR法で増幅することによって作製することができる。クローニングに際しては、該核酸を適当なベクターに発現可能に挿入し、大腸菌、菌類、植物細胞、動物細胞な

どの細胞にクローニングすることができる。ベクターは、例えばプラスミド、ファージ、コスミド、ウイルスなどである。目的に応じた種々のベクターやクローニングシステムが、タカラバイオ、インビトロジェン、アプライド・バイオシステムズなどから市販されているので、それらを使用すると便利である。核酸の発現のために、プロモーター、エンハンサー、複製開始点、リボソーム結合サイト、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの調節配列を連結した発現カセットを形成しベクターのマルチクローニングサイトに挿入することができる。遺伝子組換え技術、形質転換法、トランスフェクション法、PCR法などの技術は、例えばSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second ed. (1989)、Ausubelら, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2002)などに記載されており、本発明のために使用することができる。

10

#### 【0048】

また上記のようにプローブ試薬を一過性に細胞に発現させる手法に加え、その核酸を保持し、プローブ試薬を安定して発現させる細胞(すなわち、形質転換細胞)を作製して測定に用いてもよい。さらに、この核酸を導入したトランスジェニック非ヒト生物(例えば非ヒト動物)を作製することで、個体レベルでの蛋白質の分解活性の測定を行うことができる。その際に、核酸を適当なプロモーターの下流に連結することで、非ヒト動物の目的とする臓器や組織に選択的に発現させて測定に用いることも可能である。

#### 【0049】

非ヒト動物の作製は、公知の手法に従って、例えば、動物由来の胚性幹(ES)細胞または人工多能性幹(iPS)細胞のゲノムに前記核酸を発現可能に導入したのち、該ESまたはiPS細胞を胚盤胞に導入した胚を仮親の子宮に移植し出産させてキメラ非ヒト動物さらに子孫動物を得ることによって行われる。

20

#### 【0050】

このプローブ試薬の蛍光の測定法としては、蛍光蛋白質IとIIで互いの励起波長が大きく異なり、蛍光波長がほぼ等しい場合は、励起波長を切り替えて測定する2波長励起-1波長蛍光測光を行う。このような蛍光蛋白質の例としてはT-Sapphire(励起ピーク399nm, 蛍光ピーク511nm)とEGFP(励起ピーク488nm, 蛍光ピーク507nm)がある。また励起波長がほぼ等しく、蛍光波長が大きく異なる場合には、蛍光波長を切り替えて測定する1波長励起-2波長蛍光測光を行う。このような蛍光蛋白質の例としてはCerulean(励起ピーク433nm, 蛍光ピーク475nm)とmKeima(励起ピーク440nm, 蛍光ピーク620nm)がある。FRETを利用した測定の場合もこの1波長励起-2波長蛍光測光法となる。また、励起、蛍光波長とも大きく異なる場合には、これらをととも切り替えて測定を行う2波長励起-2波長蛍光測光を行う。このような蛍光蛋白質の例としては、Venus(励起ピーク515nm, 蛍光ピーク528nm)とmCherry(励起ピーク587nm, 蛍光ピーク610nm)がある。

30

#### 【0051】

このようにいずれも2つの波長での蛍光測定が行えるため、これらの蛍光強度の比をもとめるレシオ法による測定が可能となる。レシオ法を行うことで、細胞内でのプローブ試薬の分布の違い、励起光の照明のむら、蛍光の退色などといった蛋白質の分解に依存しない蛍光強度の変化をキャンセルさせることができるため、より定量的な計測が可能となる。

40

#### 【0052】

本発明のプローブ試薬を用いて単一細胞レベルでの測定を行うためには、蛍光顕微鏡に冷却CCDカメラなどの検出器を接続した顕微鏡用イメージングシステムが使用できる。測定方式に応じて、励起波長を切り替えるときには、光源の後にフィルタ切替装置やモノクロメータなどを接続する。2波長の蛍光をモニタするためには、検出器の前にフィルタ切替装置やイメージング用の2波長分光装置を接続する。また2波長の蛍光のモニタには、蛍光顕微鏡のフィルタとダイクロイックミラーに、使用する2つの蛍光蛋白質の波長特性に合ったデュアルバンドのものを使用し、これにカラーカメラを組み合わせて使用してもよい。この場合、デグロン蛋白質の分解活性が色の変化として画像化されるためその検出が

50

容易になる。その他、顕微鏡用のイメージング装置としては、レーザー走査型共焦点顕微鏡や多光子励起顕微鏡なども使用できる。単一細胞レベルの解像度は必要とせず、多くの細胞からのデータを得たい場合は、蛍光分光光度計やプレートリーダー、フローサイトメトリなどでも測定が可能である。個体レベルでの測定を行うためには、暗箱を用いたマクロ用のイメージング装置が使用できる。

【0053】

本発明のプローブ試薬の応用面について、該試薬は、例えば次のように医療分野で使用できる。

【0054】

ユビキチン-プロテアソーム系で分解される蛋白質は数多く、それだけ多様な生命活動に関わっているといえる。この系の異常は多くの疾病の原因となる。ユビキチン-プロテアソーム系の異常が関与するとされる疾病としては、成人T細胞白血病、クローン病、各臓器の癌、関節リウマチ、色素性乾皮症、ファンコニ貧血、コケイン症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞踏病などが知られている。本発明のプローブ試薬では、デグロン蛋白質の部分を置き換えることで、これらの蛋白質に対して汎用的に使用できる。また、本発明のプローブ試薬は、疾病の原因あるいは疾病に関連する蛋白質をデグロン蛋白質とし、その分解活性を細胞や動物個体で測定することで、これらの疾病に対する治療法や治療薬剤の開発に貢献するものと期待される。

10

【0055】

したがって、本発明はさらに、前記のプローブ試薬、前記のベクター、あるいは前記の形質転換細胞を用いて、プロテアソーム活性を制御する候補物質の存在下で細胞におけるユビキチン-プロテアソーム系での該プローブ試薬蛋白質の分解活性を測定することを含む、ユビキチン-プロテアソーム系の異常に関連する疾病の治療剤をスクリーニングする方法を提供する。

20

【0056】

ユビキチン-プロテアソーム系の異常に関連する疾病は、前記例示のような神経変性疾患、癌（もしくは、腫瘍）、虚血性疾患（例えば梗塞）、炎症性疾患、アレルギー性疾患などであり、このような異常は、プロテアソーム活性の制御異常に伴うものであり、例えば神経変性疾患ではプロテアソームの活性化剤が治療剤となりうるし、一方、癌や虚血性疾患（梗塞など）ではプロテアソームの阻害剤が治療剤となりうる（特表2002-541206、特表2001-511814、特表2008-525427など）。

30

【0057】

試験系において、本発明のプローブ試薬またはベクターと、細胞または形質転換細胞、特にユビキチン-プロテアソーム系の異常に関連する細胞と、候補物質とを接触させることによって、該細胞に含まれるユビキチン-プロテアソーム系によるプローブ蛋白質の分解活性を制御（すなわち、亢進または抑制（阻害））する物質を選択する。

【0058】

この系では、プローブ試薬蛋白質の分解活性は、例えば、蛍光蛋白質Iと蛍光蛋白質IIの蛍光強度の比の変化として測定することができる。

【0059】

本発明はさらに、前記のプローブ試薬またはベクターと、疾病患者からの細胞または細胞抽出液とを接触させて該プローブ試薬蛋白質の分解活性を測定することを含む、ユビキチン-プロテアソーム系の異常と疾病との関連を調べる方法を提供する。

40

【0060】

このとき、対照として正常細胞または該細胞の細胞抽出液を使用する。本発明のプローブ試薬またはベクターを使用し対照の結果と対比することによって、ユビキチン-プロテアソーム系の異常と疾病とを関連づけることができる。このような疾病は、前記例示の疾病から選択することができる。

【0061】

前記方法では、プローブ試薬のデグロン蛋白質が疾病に関連する蛋白質、例えばCyclin

50

(A, B, D, E), p53, A, p27, p21, p16, p15, p18, p19, p62, I B, NF-, c-fos/c-jun, c-myc, catenin, E2F-1, p130, cdc25, Tyrosine amino transferase, Polo-like kinase, Topoisomerase 1, Smad, Notch, Nrf2, HIF-1, Gemininなどの公知の蛋白質である。

【実施例】

【0062】

以下の実施例によって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されないものとする。

【0063】

[実施例1]

<分解停止させるペプチドの探索>

目的のプローブ試薬の開発のために、p105から分解停止させる能力をもつペプチド配列を探索した。実験用のプローブ試薬として、蛍光蛋白質IにCyPet, 蛍光蛋白質IIにYPet, デグロン蛋白質としてGemininを使用したプローブ試薬を作製した(図2)。CyPetはCFPから派生した蛍光蛋白質で、励起波長ピークは435nm、蛍光波長ピークは477nmである。YPetはYFPから派生した蛍光蛋白質で、励起波長ピークは517nm、蛍光波長ピークは530nmである。このペアはCyPetをドナー、YPetをアクセプタとして効率よくFRETを起こすことが知られている。Gemininは細胞周期の進行を制御する因子の1つで、DNA複製のライセンス化を阻害する機能をもつ蛋白質である(Cell 1998; 93(11):1043-1053, Am. J. Pathol. 2002; 161(1):267-273)。その存在量は細胞周期の間で厳密に制御されており、S/G<sub>2</sub>/M期に発現量が増加し、G<sub>1</sub>期にはユビキチン-プロテアソーム系による分解が促進されることで消失する。この実験ではGemininの構造(例えばNM\_015895 (human, 配列番号18及び19), NM\_020567 (mouse))のうち、この分子の分解に必要な部分が含まれるN末端側の1-110番目のアミノ酸からなる部分を使用した(Geminin (1/110))。

【0064】

上記分子のcDNAをそれぞれPCRで増幅し、クローニングベクター、pBluescript II SK(+) (Stratagene)のマルチクローニングサイトの各制限酵素サイトに挿入することで連結し、プローブ試薬の遺伝子DNAを作製した。分解を停止させるためのペプチドの配列は、ヒト由来のp105(配列番号16及び17)の366-440番目のアミノ酸の領域から探索した。この領域にはGRRおよびprocessing pointが含まれる。

【0065】

図3にその模式図を示す(p105(m/n))とは、p105のN末端からmからn番目までのアミノ酸からなるペプチドであることを示す)。さらに、作製したプローブ試薬の遺伝子DNAをpBlueScriptベクターから制限酵素を使って切り出し、これを発現ベクター、CSII-EF-MCSのマルチクローニングサイトに挿入することで培養細胞に発現させるためのベクターを作製した。

【0066】

HeLa細胞を、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地で35mm ガラスボトムディッシュに培養した。作製したベクタープラスミドをトランスフェクション試薬、FuGENE(ロシュ・アプライド・サイエンス)と混合して培地に添加した。HeLa細胞をそのまま2日間CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養し、プローブ試薬を発現させるとともに、細胞周期を経験させた。

【0067】

蛍光顕微鏡で細胞を観察したところ、多くの細胞で核に明るい蛍光が観察された。これはGemininが核内で機能する蛋白質であり、分子内に核局在化シグナルを持つためプローブ試薬が核に選択的に取り込まれたことによる。Gemininは細胞周期に合わせ、ユビキチン-プロテアソーム系による分解の促進、抑制によりその量を周期的に変化させる。仮にGemininの分解にともなうプローブ試薬の分解が、分解停止ペプチドによって止められるとすると、CyPetは分解から免れるため、細胞周期を経るたびに細胞内にCyPetが蓄積し、FRETの指標となる値であるCyPetを励起したときのYPet/CyPetの蛍光強度比が低下する。

10

20

30

40

50

またGemininが分解されたプローブ試薬は核局在化シグナルを失うため、残ったCyPetは細胞質にも分布するようになる。これらの点に注目して細胞の蛍光イメージングを行い、分解停止能をもつペプチドをスクリーニングした。

【0068】

細胞の観察には倒立型顕微鏡(1X70, オリンパス)を使用し、3板式の冷却CCDカラーカメラ(ORCA3CCD, 浜松ホトニクス)で蛍光画像を取得した。このカメラでは赤, 緑, 青の3つの波長領域の画像を同時に取得し、これらを合わせて表示することでカラーの像を観察することができる。また、各波長領域の画像の輝度を個別に計測することができる。440nmのバンドパスフィルタで励起し、460nmのロングパスフィルタで細胞の蛍光像を取得した。この設定ではCyPetを励起したときのCyPetとYPetの蛍光像を同時に観察できる。CyPetの蛍光はそのスペクトルの特性からおもに青と、一部が緑の領域に入る。またYPetの蛍光はそのほとんどが緑の領域に入るため、青の波長領域の画像の輝度をCyPet、緑の波長領域の画像の輝度をYPetの蛍光強度として両者の比をもとめることでFRETの測定を行った。また490 nmのバンドパスフィルタで励起し、510-560nmのバンドパスフィルタで蛍光を取得した。この設定ではYPetを直接励起したときの蛍光が緑の波長領域で観察できることから、YPetの存在および局在の確認を行った。画像の輝度の解析は画像解析装置AQUACOSMOS(浜松ホトニクス)で行った。

10

【0069】

図4に分解を停止させるためのペプチドとしてp105 (376/440)とp105 (405/440)を使用したプローブ試薬を発現させた細胞の観察例を示す。p105 (405/440)のプローブ試薬では観察されたすべての細胞で蛍光が核のみに分布していた。またCyPetを励起したときに青波長領域で微弱な蛍光のみが観察されたのに対し、緑波長領域では強い蛍光が観察されCyPetからYPetへの強いFRETが起きていることが示された。CyPetを励起したときのYPet/CyPetの蛍光強度の比は $7.64 \pm 1.03$ (平均 $\pm$ 標準偏差)であった。一方、p105 (376/440)のプローブ試薬では、CyPetを励起したときに青波長領域でも比較的強い蛍光が観察される細胞がみられた。このような細胞の蛍光強度比は $1.87 \pm 0.17$ で、p105 (405/440)のプローブ試薬のものとは有意に低い値であり、FRETの解消が起きていることが示唆された(図5)。またp105 (376/440)のプローブ試薬では、CyPetによる励起での蛍光が細胞質でも観察された。YPetの直接励起では核のみに蛍光が観察されたことから、細胞質でみられる蛍光はCyPetに由来するものと思われた。これらの結果から、p105 (376/440)の配列はデグロン

20

30

【0070】

p105 (376/440)と同様の結果は、分解を停止させるためのペプチドとしてp105 (382/440), p105 (392/440), p105 (376/434), p105 (376/420), p105 (376/409)を使用したプローブ試薬でも確認されたことから、GRRの全体またはその一部の配列とそのC末側の配列を含むペプチドに、蛍光蛋白質の手前で蛋白質の分解を効率よく停止させる能力をもつものがあることがわかった。またGRRのC末側のアミノ酸をCyPetのC末端付近の30個のアミノ酸の配列に置き換えたペプチド、p105 (376/404) + 30 a.a.でも同様の結果が得られたことから、GRRに付加されるアミノ酸鎖はp105由来のものでなくてもよいことがわかった。なお、30 a.a.は配列番号15に示した。これらの結果から、プローブ試薬の分解停止には、GRRとそのC末側、蛍光蛋白質IIとの間を隔てるスペーサーとしてのペプチド配列が必要であることがわかった。またGRRのN末側、蛍光蛋白質Iとの間は、p105 (366/440)の結果から、10個のアミノ酸が挿入されると分解が停止されることがわかった。

40

【0071】

以下に、この実験で抽出されたプローブ試薬の分解を停止させる能力をもつ分解停止ペプチド+スペーサーペプチドのアミノ酸配列、およびDNAの塩基配列を示す。

【0072】

p105 (376/440)

ヒトp105の376-440番目のアミノ酸配列(配列番号1)

分解停止ペプチド: 376-404番目(下線部), スペーサーペプチド: 405-440番目

50

GGGSGAGAGGGGMFGSGGGGGGTGSTGPGYSFPHYGFPTYGGITFHPGTTKSNAGMKHGTMDTES

塩基配列 (配列番号2)

GGCGGTGGTAGTGGTGCCGGAGCTGGAGGCGGAGGCATGTTTGGTAGTGCCGGTGGAGGAGGGGGCACTGGAAGTACAGG  
TCCAGGGTATAGCTTCCCACACTATGGATTTCTACTTATGGTGGGATTACTTTCCATCCTGGAACTACTAAATCTAATG  
CTGGGATGAAGCATGGAACCATGGACACTGAATCT

p105 (382/440)

ヒトp105の382-440番目のアミノ酸配列 (配列番号3)

分解停止ペプチド : 382-404番目(下線部), スペーサーペプチド : 405-440番目

GAGGGGMFGSGGGGGGTGSTGPGYSFPHYGFPTYGGITFHPGTTKSNAGMKHGTMDTES

塩基配列 (配列番号4)

GGAGCTGGAGGCGGAGGCATGTTTGGTAGTGCCGGTGGAGGAGGGGGCACTGGAAGTACAGGTCCAGGGTATAGCTTCCC  
ACACTATGGATTTCTACTTATGGTGGGATTACTTTCCATCCTGGAACTACTAAATCTAATGCTGGGATGAAGCATGGAA  
CCATGGACACTGAATCT

p105 (392/440)

ヒトp105の392-440番目のアミノ酸配列 (配列番号5)

分解停止ペプチド : 392-404番目(下線部), スペーサーペプチド : 405-440番目

GGGGGTGSTGPGYSFPHYGFPTYGGITFHPGTTKSNAGMKHGTMDTES

塩基配列 (配列番号6)

GGCGGTGGAGGAGGGGGCACTGGAAGTACAGGTCCAGGGTATAGCTTCCCACACTATGGATTTCTACTTATGGTGGGAT  
TACTTTCCATCCTGGAACTACTAAATCTAATGCTGGGATGAAGCATGGAACCATGGACACTGAATCT

p105 (376/434)

ヒトp105の376-434番目のアミノ酸配列 (配列番号7)

分解停止ペプチド : 376-404番目(下線部), スペーサーペプチド : 405-434番目

GGGSGAGAGGGGMFGSGGGGGGTGSTGPGYSFPHYGFPTYGGITFHPGTTKSNAGMKHG

塩基配列 (配列番号8)

GGCGGTGGTAGTGGTGCCGGAGCTGGAGGCGGAGGCATGTTTGGTAGTGCCGGTGGAGGAGGGGGCACTGGAAGTACAGG  
TCCAGGGTATAGCTTCCCACACTATGGATTTCTACTTATGGTGGGATTACTTTCCATCCTGGAACTACTAAATCTAATG  
CTGGGATGAAGCATGGA

p105 (376/420)

ヒトp105の376-420番目のアミノ酸配列 (配列番号9)

分解停止ペプチド : 376-404番目(下線部), スペーサーペプチド : 405-420番目

GGGSGAGAGGGGMFGSGGGGGGTGSTGPGYSFPHYGFPTYGGITF

塩基配列 (配列番号10)

GGCGGTGGTAGTGGTGCCGGAGCTGGAGGCGGAGGCATGTTTGGTAGTGCCGGTGGAGGAGGGGGCACTGGAAGTACAGG  
TCCAGGGTATAGCTTCCCACACTATGGATTTCTACTTATGGTGGGATTACTTTTC

p105 (376/409)

ヒトp105の376-409番目のアミノ酸配列 (配列番号11)

分解停止ペプチド : 376-404番目(下線部), スペーサーペプチド : 405-409番目

GGGSGAGAGGGGMFGSGGGGGGTGSTGPGYSFPH

塩基配列 (配列番号12)

GGCGGTGGTAGTGGTGCCGGAGCTGGAGGCGGAGGCATGTTTGGTAGTGCCGGTGGAGGAGGGGGCACTGGAAGTACAGG  
TCCAGGGTATAGCTTCCCACAC

p105 (376/404) + 30 a.a. (配列番号13)

ヒトp105の376 - 404番目のアミノ酸配列に、CyPetのC末端付近の30個のアミノ酸を加えた配列

分解停止ペプチド : p105の376-404番目(下線部), スペーサーペプチド : グルタミン酸 + フェニルアラニン + CyPetの211-238番目のアミノ酸

GGGSGAGAGGGGMFGSGGGGGGTGSTGPGYFDPNKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELY

塩基配列 (配列番号14)

GGCGGTGGTAGTGGTGCCGGAGCTGGAGGCGGAGGCATGTTTGGTAGTGCCGGTGGAGGAGGGGGCACTGGAAGTACAGG

10

20

30

40

50

TCCAGGGGAATTCGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCG  
GCATGGACGAGCTGTAC

Geminin (1/110)をデグロン蛋白質、分裂停止ペプチド+スペーサーペプチドをp105 (376/440)としたプローブ試薬で、細胞周期の進行にともなう蛍光蛋白質Iの細胞質への放出は、蛍光蛋白質Iと蛍光蛋白質IIにそれぞれVenusとmCherry, AmCyanとmCherry, TurboGFPとTurboRFP, mAzami-GreenとmKusabira-Orangeを使用したものでも観察された。この結果から、このプローブ試薬の構成要素として多くの種類の蛍光蛋白質が適用できると考えられる。

【 0 0 7 3 】

[ 実施例 2 ]

<Geminin (1/110)をデグロン蛋白質としたプローブ試薬でのタイムラプスイメージング>

分解停止能が示されたペプチドp105 (376/440) (分解停止ペプチドp105(376/404) + スペーサーペプチドp105(405/440))、および蛍光蛋白質I, IIとしてCyPet, YPetを、デグロン蛋白質としてGeminin (1/110)を使用したプローブ試薬を発現させたHeLa細胞でタイムラプスイメージングを行い、細胞周期にともなう蛍光の時間変化を測定した。

【 0 0 7 4 】

測定はインキュベータ蛍光顕微鏡(LCV110, オリンパス)で行った。455nmのLEDによる励起で、CyPetの蛍光画像を460-510nmのバンドパスフィルタを通して、またYPetの蛍光画像を515-560nmのバンドパスフィルタを通して冷却CCDカメラで取得した。またYPetの直接励起による画像を、505nmのLEDによる励起で、528-555nmのバンドパスフィルタにより取得した。各画像は30分ごとに48時間取得した。輝度の解析は核の領域とそれ以外の細胞質の領域に分けて行い、CyPetを励起したときのYPet/CyPetの蛍光強度の比を測定した。

【 0 0 7 5 】

図6に結果を示す。蛍光強度比の値は核、細胞質ともに細胞の分裂にともなって急速な低下がみられた。比の値は、核では徐々に回復したが、細胞質では低下した値が維持された。また、細胞分裂時のCyPetと直接励起でのYPetの蛍光画像を観察してみると、CyPetの蛍光は常に核、あるいは細胞質に観察されたが、YPetの蛍光は細胞分裂とともに急速に弱まり、その後核でゆるやかに回復してくる様子が観察された(図7)。これらの結果は、細胞周期の過程でのGemininの動態が、プローブ試薬の分解停止にともなう蛍光の変化としてとらえられたことを示している。すなわち、細胞分裂後のG<sub>1</sub>期にプローブ試薬のGeminin (1/110)はYPetをともなって分解されるが、分解停止ペプチドによりCyPetは分解されずに残るために蛍光強度比の値が低下する。その後、S/G<sub>2</sub>/M期にはGemininの分解が抑制され、核には新たに発現されたプローブ試薬が蓄積するため比の値が回復する。一方、細胞質にはプローブ試薬の限定的な分解によって生じたCyPetが放出されるため、細胞分裂に応じて蛍光強度比が低下するが、新たなプローブ試薬の蓄積は起きないために、比の値が低いまま維持されたと考えられる。

【 0 0 7 6 】

[ 実施例 3 ]

<I B をデグロン蛋白質としたプローブ試薬>

デグロン蛋白質をI B として、その分解活性から転写因子NF Bの活性をモニタするためのプローブ試薬を作製した。I B は細胞質でNF Bと結合し、その核移行および転写活性を阻害している蛋白質である。細胞がNF Bを活性化させるシグナルを受けると、I Bキナーゼが活性化され、これがI B をリン酸化する。リン酸化を受けたI B はユビキチンリガーゼによりユビキチン化を受け、プロテアソームで分解される。これによりNF Bに対する抑制が解除され、核への移行、遺伝子の転写が活性化される。これまでに悪性腫瘍細胞や自己免疫疾患において、恒常的なNF- Bの活性化が報告されている。したがって、このような測定系はこれらの疾患の診断や治療薬の開発に応用できると考えられる。

【 0 0 7 7 】

10

20

30

40

50

プローブ試薬の構成要素として、蛍光蛋白質IにCyPet，蛍光蛋白質IIにYPet，デグロン蛋白質として全長のI B，分解停止ペプチドとしてp105(376/404)，スパーサーペプチドとしてp105 (405/440)を使用した。上で述べた分解停止ペプチドを探索するためのプローブ試薬のデグロン蛋白質であるGeminin(1/110)をヒト又はマウス由来のI B (human: NM\_020529, NM\_003340又はNM\_003339, mouse: AF112979)に置き換えることでプローブ試薬を作製した(図8)。

【0078】

Cos7細胞を、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地で35mm ガラスボトムディッシュに培養した。分解停止ペプチドを探索した実験と同様に、プローブ試薬の遺伝子DNAをトランスフェクションし、インキュベータ顕微鏡でイメージングを行った。画像は10分ごとに2時間取得した。イメージングを開始してから10分後に培地にNF Bを活性化させる薬剤であるTNF- を20ng/mlの濃度となるように添加した。

10

【0079】

取得した画像のうち、CyPet励起でのCyPetの蛍光画像およびYPet励起でのYPetの蛍光画像の時間変化を図9に示す。視野に入った4個の細胞のうち1つの細胞(No.1)が応答を示し、YPetのみで蛍光強度の低下が見られた。またこれに伴いCyPetを励起したときのYPet/CyPetの蛍光強度比の低下も観察された(図10)。この結果は、TNF- 刺激によるI B の分解過程をこのプローブ試薬で蛍光の変化として可視化できたことを示している。

【産業上の利用可能性】

【0080】

20

本発明のプローブ試薬は、ユビキチン-プロテアソーム系の異常が原因の疾患に関連する蛋白質の分解活性を細胞や動物個体で測定することで、これらの疾患に対する治療法や薬剤の開発に寄与することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0081】

配列番号13：合成ペプチド

配列番号14：合成ペプチドをコードするDNA

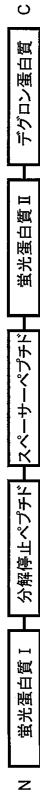
配列番号15：CyPet由来のペプチド

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

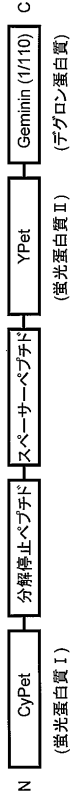
30



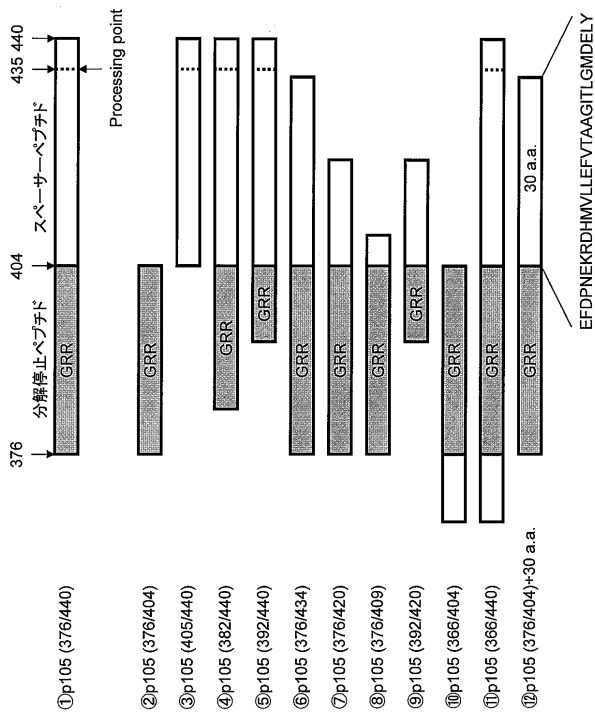
【 図 1 】



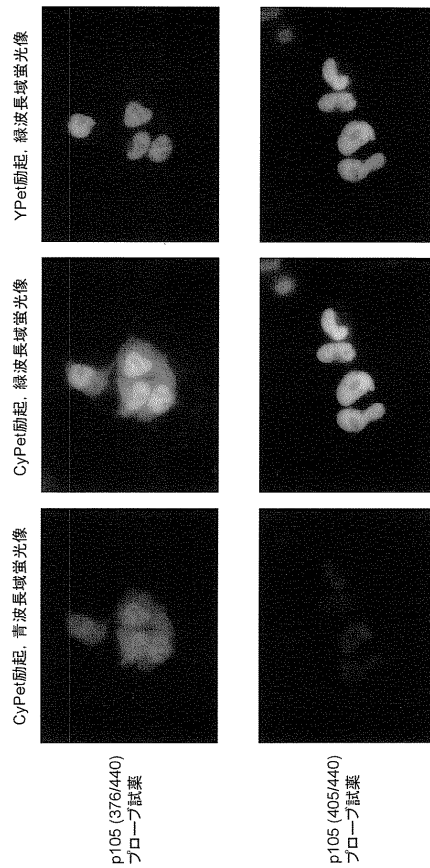
【 図 2 】



【 図 3 】



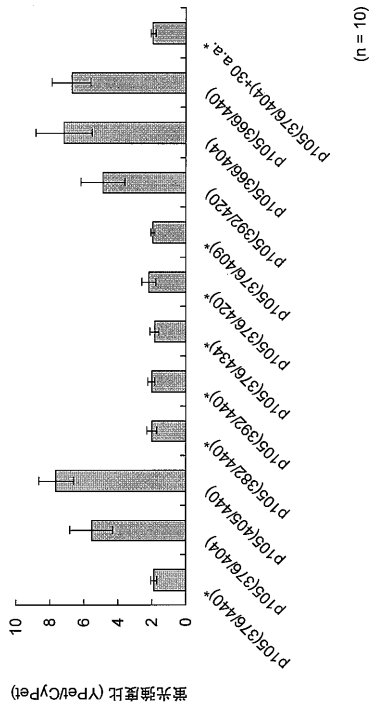
【 図 4 】



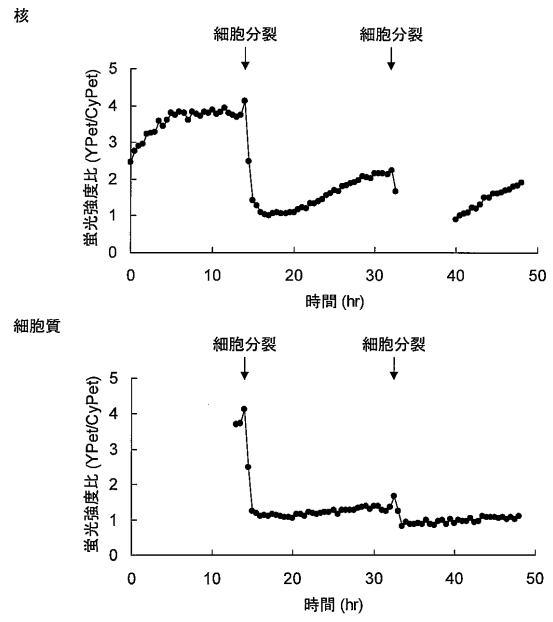
p105 (376/440) フローブ試薬

p105 (405/440) フローブ試薬

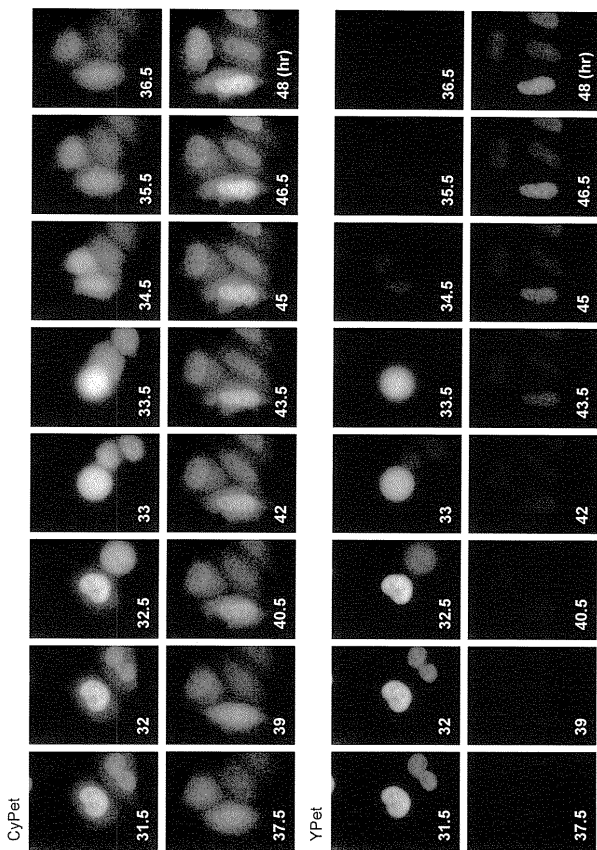
【 図 5 】



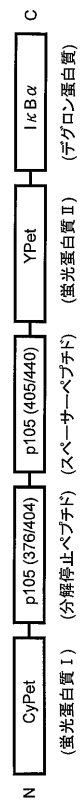
【 図 6 】



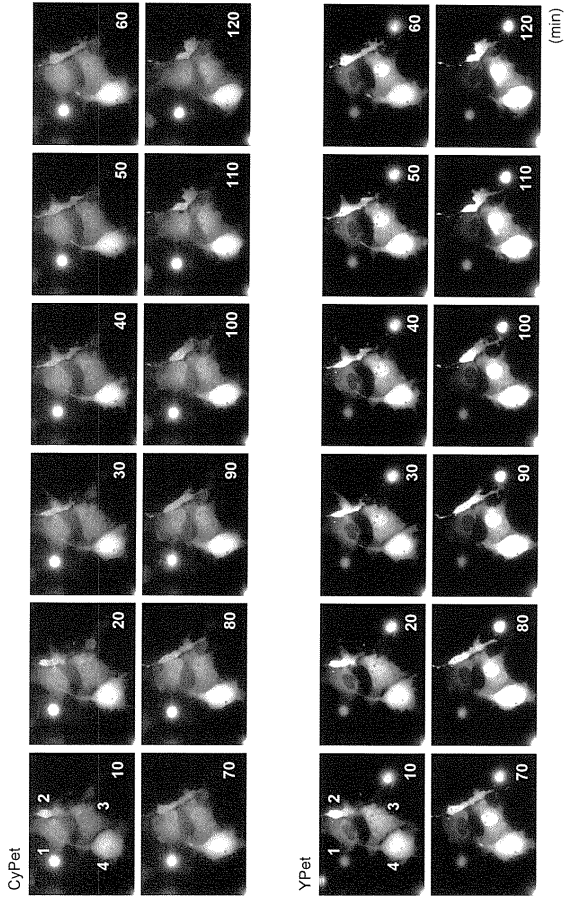
【 図 7 】



【 図 8 】



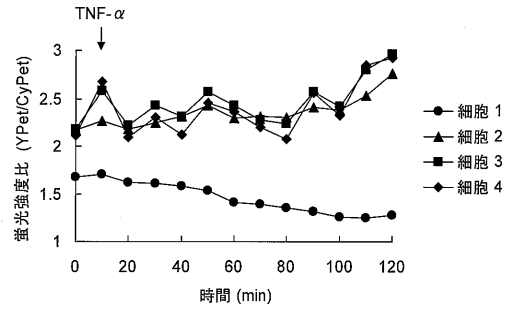
【 図 9 】



【 配列表 】

201109015900001.app

【 図 10 】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/051089

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(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) C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/15, 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 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
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)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TIAN, L. et al., "A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-kappaB", Nat. Struct. Mol. Biol., 2005, Vol. 12, No. 12, pp.1045-1053	1-15
A	ORIAN, A. et al., "Structural Motifs Involved in Ubiquitin-Mediated Processing of the NF-kB Precursor p105: Roles of the Glycine-Rich Region and a Downstream Ubiquitination Domain", Mol. Cell. Biol., 1999, Vol. 19, No. 5, pp. 3664-3673	1-15
A	Asako SAKAUE-SAWANO et al., "Atarashii Imaging Gijutsu 1. Saibo Shuki o Realtime ni Kashika suru Gijutsu", Experimental Medicine, 2008, vol.26, no.17, pages 2822 to 2829	1-15
<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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 28 February, 2011 (28.02.11)	Date of mailing of the international search report 08 March, 2011 (08.03.11)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/051089

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-209227 A (Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research), 23 August 2007 (23.08.2007), paragraph [0006] (Family: none)	1-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 5 1 0 8 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(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. C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/15, 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 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011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)			
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	
A	TIAN, L. et al., "A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-kappaB", Nat. Struct. Mol. Biol., 2005, Vol. 12, No. 12, pp.1045-1053	1-15	
<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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 28.02.2011		国際調査報告の発送日 08.03.2011	
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) 高山 敏充	4 B 4 1 5 3
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/051089
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
A	ORIAN, A. et al., "Structural Motifs Involved in Ubiquitin-Mediated Processing of the NF- $\kappa$ B Precursor p105: Roles of the Glycine-Rich Region and a Downstream Ubiquitination Domain", Mol. Cell. Biol., 1999, Vol. 19, No. 5, pp.3664-3673	1-15
A	阪上-沢野朝子 他, 「新しいイメージング技術 1.細胞周期をリアルタイムに可視化する技術」, 実験医学, 2008, Vol. 26, No. 17, pp.2822-2829	1-15
A	JP 2007-209227 A (財団法人 東京都医学研究機構) 2007.08.23, 段落【0006】 (ファミリーなし)	1-15

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>			C 1 2 Q 1/02			
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>			G 0 1 N 33/15		Z	
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>			G 0 1 N 33/50		Z	
<b>G 0 1 N 21/78 (2006.01)</b>			G 0 1 N 21/78		C	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, RO, RS, RU, 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

Fターム(参考) 2G045 AA28

2G054 AA08 BB13 CA23 CE02 EA03 FA19 FA32 FA36 GA03 GA04  
 GB10 JA01  
 4B024 AA11 BA80 CA04 CA07 DA03 EA04  
 4B063 QA18 QA19 QQ20 QR56 QR77 QR80 QS05 QS28 QX02  
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA46

(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。