

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5565989号  
(P5565989)

(45) 発行日 平成26年8月6日(2014.8.6)

(24) 登録日 平成26年6月27日(2014.6.27)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A	
<b>C 1 2 P 21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02	C	

請求項の数 20 (全 94 頁)

(21) 出願番号	特願2001-518889 (P2001-518889)	(73) 特許権者	502067819
(86) (22) 出願日	平成12年8月23日 (2000.8.23)		アンバーゲン インコーポレイティッド
(65) 公表番号	特表2004-513604 (P2004-513604A)		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
(43) 公表日	平成16年5月13日 (2004.5.13)		2472 ウォータータウン, プレザント
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/023233		ストリート 313
(87) 国際公開番号	W02001/014578	(74) 代理人	100094145
(87) 国際公開日	平成13年3月1日 (2001.3.1)		弁理士 小野 由己男
審査請求日	平成19年8月21日 (2007.8.21)	(74) 復代理人	110000202
審査番号	不服2011-17398 (P2011-17398/J1)		新樹グローバル・アイピー特許業務法人
審査請求日	平成23年8月11日 (2011.8.11)	(72) 発明者	ロスチャイルド, ケニス, ジェイ.
(31) 優先権主張番号	09/382, 950		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
(32) 優先日	平成11年8月25日 (1999.8.25)		2139, ニュートン, 97 ドーカー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ロード
(31) 優先権主張番号	09/382, 736		
(32) 優先日	平成11年8月25日 (1999.8.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新生タンパク質の検出、分析、及び分離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a) 核酸鋳型、
- b) 5'側から
- i) プロモータに対応する配列、
- ii) リボソーム結合部位に対応する配列、
- iii) 開始コドン
- iv) 第1エピトープマーカをコードする配列、
- v) 前記第1エピトープマーカと異なる第2エピトープマーカをコードする配列、及び

v) 前記鋳型に相補的な領域を備える第1オリゴヌクレオチドプライマー、ならびに

- c) 5'側から
- i) 少なくとも1つの終止コドン、
- ii) 前記第1及び第2エピトープマーカと異なる第3エピトープマーカをコードする配列、及び

iii) 前記鋳型に同一な領域を備える第2オリゴヌクレオチドプライマーを含む反応混合物。

【請求項2】

前記第1プライマーの相補的な領域は、長さが15塩基よりも長い請求項1に記載の反

応混合物。

【請求項 3】

前記第 2 プライマーの同一な領域は、長さが 15 塩基よりも長い請求項 1 に記載の反応混合物。

【請求項 4】

前記第 1 及び第 3 エピトープマーカ―は、配列番号 5、6、7、8 及び 9 からなる群から選択される請求項 1 に記載の反応混合物。

【請求項 5】

前記鑄型は、遺伝子の領域を含み、該遺伝子は、A P C 遺伝子、N F 1 遺伝子、N F 2 遺伝子、B R C A 1 遺伝子及び B R C A 2 遺伝子からなる群から選択される請求項 1 に記載の反応混合物。

10

【請求項 6】

( a ) ( 1 ) 核酸鑄型、

( 2 ) 5 ' 側から

i ) プロモータに対応する配列、

i i ) リボソーム結合部位に対応する配列、

i i i ) 開始コドン

i v ) 第 1 エピトープマーカ―をコードする配列

v ) 前記第 1 エピトープマーカ―と異なる第 2 エピトープマーカ―をコー

ドする配列及び

20

v i ) 前記鑄型に相補的な領域

を備える第 1 オリゴヌクレオチドプライマー、

( 3 ) 5 ' 側から

i ) 少なくとも 1 つの終止コドン及び

i i ) 前記第 1 及び第 2 エピトープマーカ―と異なる第 3 エピトープマーカ―をコードする配列及び

i i i ) 前記鑄型に同一な領域

を備える第 2 オリゴヌクレオチドプライマーならびに

( 4 ) ポリメラーゼ

を準備し、

30

( b ) 前記テンプレートを、増幅鑄型を産生する条件下で、第 1 プライマー、第 2 プライマー及びポリメラーゼと混合することを含み、前記増幅鑄型は、第 1、第 2 及び第 3 エピトープマーカ―をコードする、  
エピトープマーカ―用コード配列の核酸への導入方法。

【請求項 7】

前記第 1 プライマーの相補的な領域は、長さが 15 塩基よりも長い請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 2 プライマーの同一な領域は、長さが 15 塩基よりも長い請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記第 3 エピトープマーカ―は、配列番号 5、6、7、8 及び 9 からなる群から選択される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記鑄型は、遺伝子領域からなり、該遺伝子は、A P C 遺伝子、N F 1 遺伝子、N F 2 遺伝子、B R C A 1 遺伝子及び B R C A 2 遺伝子からなる群から選択される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 2 エピトープマーカ―は、アフィニティーマーカ―である請求項 6 に記載の方法。

50

## 【請求項 1 2】

( a ) 請求項 6 の増幅鋳型及び翻訳系を準備し、  
 ( b ) 前記増幅鋳型を、新生タンパク質を生成する条件下で、前記翻訳系に導入し、それによって、新生タンパク質は、第 1 エピトープマーカ、第 2 エピトープマーカ及び第 3 エピトープマーカを備えることを含む方法。

## 【請求項 1 3】

さらに ( c ) トランケート型タンパク質の検出を可能にするゲルフリーの条件下で、新生タンパク質を試験することを含む請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記翻訳系が、無細胞翻訳系である請求項 1 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 1 5】

無細胞翻訳系が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ膵臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 1 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

( b ) の後、さらに ( c ) 第 3 エピトープマーカに反応性の抗体を添加する請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

抗体が、H I S - T a g、C - m y c - T a g、F L A G - T a g、S T R E P - T a g 及び H A - T a g からなる群から選択されるエピトープ配列に反応性がある請求項 1 6 に記載の方法。

20

## 【請求項 1 8】

( a ) 請求項 6 の増幅鋳型、  
 アフィニティーマーカを含むミスアミノアシル化 t R N A 及び  
 翻訳系を準備し、  
 ( b ) 増幅鋳型及びミスアミノアシル化 t R N A を、アフィニティーマーカが反応混合物中の新生タンパク質に導入される条件下で、前記翻訳系に導入し、それによって、新生タンパク質は、第 1 エピトープマーカ、第 2 エピトープマーカ及びアフィニティーマーカを備えることを含む方法。

30

## 【請求項 1 9】

前記アフィニティーマーカがビオチニル部分を含む請求項 1 8 の方法。

## 【請求項 2 0】

ミスアミノアシル化 t R N A は、B O D I P Y - F L - l y s y l - t R N A を含む請求項 1 8 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、細胞あるいは無細胞翻訳系内で翻訳された新生タンパク質の検出及び分析を容易にする非放射性マーカに関する。これらのマーカを含有する新生タンパク質は、放射性試薬に関連する取り扱い及び廃棄の問題なく、迅速かつ効率的に検出、分離、かつ分析し得る。

40

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

細胞は、オルガネラ (細胞小器官)、マクロ分子及び広く多様な小分子を含む。水分を除いては、ほとんど大多数の分子及びマクロ分子は、脂質、炭水化物、タンパク質または核酸に分類し得る。タンパク質は、最も豊富な細胞成分であり、多数の主要な細胞プロセスを促進する。これらは、酵素、抗体、ホルモン、輸送分子及び細胞の細胞骨格の成分を含む。

## 【0 0 0 3】

50

タンパク質は、線状ポリマーあるいはポリペプチド中に配列されたアミノ酸から構成される。生体系において、タンパク質は20種類以上の一般アミノ酸を含む。これらの20数種類のアミノ酸は、一般的には天然アミノ酸と称される。全てのアミノ酸の中心には、他分子と4つの結合または付着を形成する炭素原子(C)がある(図1)。1つの結合はアミノ基(NH<sub>2</sub>)との共有結合で、他方はカルボキシル基(COOH)との共有結合であり、どちらもポリペプチド形成に關与する。3番目の結合は、ほとんど常に水素原子と結合し、4番目の結合は、アミノ酸構造に可変性を分与する側鎖に結合する。例えば、側鎖がメチル基(-CH<sub>3</sub>)の場合はアラニン(Ala)が形成され、側鎖がイソプロピル基(-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)の場合はバリン(Val)が形成される。さらに異なる側鎖を含むアミノ酸を化学的に合成することが可能であるが、細胞タンパク質合成系は、まれに例外はあるが、天然アミノ酸を利用する。他のアミノ酸及び構造的類似化合物は、非天然性と称され、ほとんどの生物体においては一般的には発見されない。

10

## 【0004】

全ての生物系の主要な特徴は、アミノ酸からタンパク質を生成する能力である。根本的には、タンパク質は、図1Bに描写されるペプチド結合を介する、複数のアミノ酸の連結によって形成される。本工程に關与する主要な分子は、メッセンジャーRNA(伝令RNA)(mRNA)分子、トランスファーRNA(転写RNA)(tRNA)分子及びリボソーム(rRNAタンパク質複合体)である。タンパク質翻訳は通常では生細胞内で行われ、ある場合には、無細胞翻訳系と言及されるシステム内で細胞外で実施することも可能である。どちらのシステムにおいても、タンパク質合成の基本的工程は同一である。細胞外あるいは無細胞翻訳系は、細胞の細胞内内容物から調製された抽出物を含む。これらの調製物は、タンパク質翻訳をサポートするそれらの分子、また調製方法に応じて、グリコシル化及び切断(cleavage)のような翻訳後イベントを含む。無細胞抽出物またはインビトロ抽出物が作製される典型的な細胞は、Escherichia coli(大腸菌)細胞、コムギ胚芽細胞、ウサギ網状赤血球、昆虫細胞及びカエル卵母細胞である。

20

## 【0005】

インビボ及びインビトロ合成のどちらも、mRNA分子上にある塩基配列の読み取りを含む。mRNAは、トリプレットコドンの形状で翻訳指令を含んでいる。遺伝暗号は、どのアミノ酸が各トリプレットコドンによってコードされるかを特定する。アミノ酸を特定する各コドンには、通常は正確なアミノ酸を新生ポリペプチド鎖上に転移するために機能する同族tRNA分子が存在する。アミノ酸チロシン(Tyr)は、塩基配列UAU及びUACによってコードされるが、システイン(Cys)はUGU及びUGCによってコードされる。コドンの第3塩基に關連する変異はよくあることで、ゆらぎと称されている。

30

## 【0006】

翻訳は、リボソームがmRNAに結合することにより開始する(図2)。開始因子、延長因子及び終了因子を含む多数のタンパク質因子が、翻訳の異なるフェーズ中にリボソームと連合(linkage)する。開始複合体の形成が翻訳の第1ステップである。開始因子は、塩基配列UAGを認識するmRNAと開始tRNA(fmet及びmet)と共に開始複合体に寄与する。延長は、電荷tRNAのリボソームへの結合、翻訳及びペプチド鎖中へのアミノ酸積荷の輸送と放出と共に進行する。延長因子は、tRNAの結合を補助し、ペプチジルトランスフェラーゼ(転移酵素)のような酵素によってポリペプチド鎖の延長を補助する。終了因子は、ポリペプチド合成を終了しさらにポリペプチド鎖とmRNAをリボソームから遊離するメッセージにおいて、塩基配列UGAのような終止シグナルを認識する。

40

## 【0007】

tRNAの構造は、しばしばクローバー葉モデルとして示される(図3A)。典型的tRNAの構造エレメントは、受容ステム、Dループ、アンチコドンループ、可変ループ及びT<sub>4</sub>Cループを含む。アミノアシル化あるいはtRNAの電荷は、その結果として、エステル結合を介する、アミノ酸のカルボキシル末端にある末端アデノシン塩基の2'-(または3'-)ヒドロキシル基への結合を生起する。このプロセスは、酵素的あるいは化学的方法のいずれかを使用することにより達成し得る。通常では、特定のtRNAは、1つの特定の天然アミノ酸に

50

よってのみ電荷される。ここでは酵素的アミノアシル化と称する、この選択的電荷は、アミノアシル・tRNAシンテターゼ（合成酵素）によって達成される。チロシンUACコドン認識することにより、チロシン残基を新生ポリペプチド鎖中に選択的に取り込むtRNAは、チロシン アミノアシル・tRNAシンテターゼを有するチロシンによって電荷され、UGUコドンを読み取るようにデザインされたtRNAは、システイン アミノアシル・tRNAシンテターゼによって電荷される。これらのシンテターゼは、tRNAを正しいアミノ酸で電荷し、翻訳プロセスの適合度を維持することにおいて極めて正確であるように進化してきた。非天然アミノ酸がアミノ酸に構造的に極めて類似する特定の場を除いては、tRNAを電荷するために酵素的アミノアシル化以外の手段を使用することが必要である。

#### 【0008】

分子生物学者は、遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を、日常の仕事として研究している。研究における重要なステップは、これら遺伝子産物を、無傷細胞または無細胞抽出物のいずれかにおいて発現することである。伝統的には、分子生物学者は、新合成タンパク質または所謂新生タンパク質検出の手段として<sup>35</sup>S-メチオニンのような放射性標識アミノ酸残基を使用する。これらの新生タンパク質は、通常では、まず標準技術であるゲル電気泳動によりタンパク質を分離し、さらにゲルに含まれるタンパク質が特定の放射性標識アミノ酸を含有するかどうかを測定することにより、細胞または無細胞抽出中に存在する多数の他のタンパク質から識別され得る。この方法は単純で、ゲル電気泳動に基づき、広く利用可能かつ実用化されている方法である。本方法は、発現タンパク質に関して予め知識を必要とせず、さらに一般的にはタンパク質が特定の特性を有する必要がない。さらには、タンパク質が変性あるいはほぐれた形状（unfold）であってもゲル電気泳動により検出し得る。その上、膜へのブロッティング及び共役酵素検定法のようなさらに特殊化したテクニックは必要とされない。放射性アッセイは、新生タンパク質の構造が変更されず、あるいは保存し得るという利点をさらに有するため、従ってタンパク質は次の生化学的及び生物物理学的試験のために機能性のある形状で分離し得る。

#### 【0009】

放射性方法には、放射性標識アミノ酸の利用に関する多数の欠点がある。実験室における放射性化合物の取り扱いには、常に健康へのリスクを含み、さらに実験室職員の特別な訓練と同様に、特別な実験室安全手順、施設、詳細な記録管理を必要とする。放射性廃棄物の処分はさらに、公共へのリスクの可能性及び放射性廃棄物処分場所の不足のために、懸念を増している。さらに、放射性標識の使用は時間を要し、ある場合では放射性標識検出に数日も必要とすることがある。そのような実験に長時間を要することは、主要な考慮点であり、さらに研究生産性の深刻な妨げとなり得る。放射能検出の迅速な方法は利用可能ではあるが、高価であり、しばしば複雑な画像エンハンスメント用装置を必要とする。

#### 【0010】

放射性標識アミノ酸の使用はまた、既存タンパク質から新生タンパク質を予め分離することなしには、無細胞抽出物中にある新生タンパク質の生産をモニタする単純かつ迅速な手段を可能としない。しかし、分離ステップは無細胞活性の最適化が可能ではない。イオン及び代謝物濃度、及びタンパク質合成の温度と時間を含む変数は調整できない。

#### 【0011】

放射性標識法はまた、新生タンパク質を将来利用可能である形状で分離する手段を供給しない。放射能の存在は、実験室及び動物におけるそれ以後の生化学的または生物物理学的手順のためのこの利用性を損なう。タンパク質が細胞に毒性である特性を有するために、インビボでタンパク質を容易に生産できない場合のインビトロ発現の場合において明らかである。機能性形状にある新生タンパク質の検出及び分離のための単純かつ便利な方法は、そのようなタンパク質が診断用あるいは治療用特性を有する場合に、生物医学分野において重要である。近年の研究はいくらかの成功を示すが、これらの方法は数々の欠点を有する。

#### 【0012】

放射性標識法はまた、これらのタンパク質またはこれらのタンパク質のフラグメントを

10

20

30

40

50

コードするDNAにおける突然変異を起因する可能性のある疾患の存在を指摘し得る新生タンパク質の配列における変化を検出する単純かつ迅速な手段を提供しない。タンパク質レベルにおける現在の分析方法は、ゲル電気泳動の使用、及び速度が遅く、ハイスループット分析や自動化に順応しない放射能検出に依存している。そのような突然変異はまた、特定のタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードする遺伝子のDNA配列分析を実施することにより検出し得る。しかし、これにはDNAの広い領域を配列することが必要であり、従って、時間を要しかつ高価である。突然変異を新生タンパク質レベルで検出することを可能とする一般的方法の開発は、生物医学分野において極めて重要である。

#### 【0013】

放射性標識法はまた、新生タンパク質と、薬物候補としての重要性を有する化合物を含む他の分子との相互作用を研究するための単純かつ迅速な手段を供給しない。そのようなアプローチが利用可能であれば、遺伝子やタンパク質の特性が解明されていない場合でも、特定の遺伝子によってコードされている新生タンパク質に対して多数の化合物をスクリーンするために極めて有用であり得る。可能性を有する薬物候補をスクリーンするためのアフィニティー電気泳動に基づく、現在のテクノロジーでは、天然試料及び合成ライブラリーのどちらも、第一に、タンパク質を特定のマーカーで均一に標識しなければならず、これは、タンパク質の分離、さらに特定のリガンドマーカーのデザインまたはタンパク質工学を含む特殊な技術をしばしば必要とする。

#### 【0014】

サプレッサー特性を有するtRNAのような特定のtRNA、サプレッサーtRNAは、部位特異的非天然アミノ酸置換(SNAAR)プロセスに使用されてきた(C. Noren et al., Science 244:182~188, 1989)。SNAARにおいては、mRNA及びサプレッサーtRNA上にユニーク・コドンが必要であり、これはタンパク質合成期間にユニーク部位に非天然アミノ酸をターゲットするために作用する(PCT WO90/05785)。しかし、サプレッサーtRNAは、タンパク質翻訳系中に存在するアミノアシルtRNAシンターゼによって認識されてはならない(Bain et al., Biochemistry 30:5411~21, 1991)。さらには、ナンセンスコドンを鋳型DNAまたはmRNAをコード領域への取り込むことが必要であるため、非天然アミノ酸の部位特異的取り込みは、一般的には細胞あるいは無細胞タンパク質合成系における新生タンパク質の検出には適切ではない。

#### 【0015】

タンパク質合成産物はまた、抗体ベースアッセイによっても検出し得る。この方法は、天然形状にフォールド(折り畳み)されたタンパク質、及び新生タンパク質または未知の新生タンパク質に融合されている既知タンパク質に対して予め産生された抗体が必要であるために、その用途に限定がある。そのような手順は、時間を要し、さらにその上タンパク質の同定とキャラクタリゼーションを必要とする。さらに、抗体の産生及びアミノ酸配列はどちらも純度の高いタンパク質を必要とする。

#### 【0016】

ある事例では、非天然アミノ酸は、天然アミノ酸を特異的に修飾するが、アミノアシル・tRNAの機能的活性を実質的に変化しない化学反応を使用して、tRNA分子をアミノアシル化後、形成され得る(Promega Technical Bulletin No. 182; tRNA<sup>ns<sup>ce</sup>nd</sup>(商標):非放射性翻訳検出システム、1993年9月)。これらの反応は、アミノアシル化後修飾として言及されている。例えば、同族tRNA(tRNA<sup>LYS</sup>)に結合されたリジンのアミノ基は、アミン特異性光親和性標識で修飾され得た(U.C. Krieg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8604~08, 1986)。アミノアシル化後修飾のこれらのタイプは、有用ではあるが、非天然アミノ酸を新生タンパク質中に取り込むための一般的手段を供給しない。不利な点は、正常アミノ酸の誘導体である非天然アミノ酸のみが取り込まれ、ほんの少数のアミノ酸残基のみが化学的修飾を受け得る側鎖を有することである。さらに頻繁に、アミノアシル化後修飾は、その結果としてtRNAに変質を生じ、さらにtRNAに結合するアミノ酸のアミノ基の非特異性修飾(例えば、アミノ基の他に)を生じることがある。この因子は、tRNAに結合する非天然アミノ酸の取り込みの効率を低下し得る。非特異的な、

10

20

30

40

50

tRNA構造のアミノアシル化後修飾は、さらにタンパク質合成におけるその参与を損なう危険性を有する。アミノ酸の アミノ基が修飾されると、さらに不完全鎖形成が生じることがある。

#### 【0017】

他のある事例では、新生タンパク質は、特異的酵素活性、吸光あるいは蛍光のような特異的かつユニークな特性に基づいて検出し得る。このアプローチは、ほとんどのタンパク質が容易に検出し得る特別の特性を有していないために、用途に限界がある。しかし、多くの事例においては、発現タンパク質は以前にキャラクタライズ、あるいは同定さえ行われていないことがあるため、従ってその特徴的性状は未知である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0018】

##### [発明の概要]

本発明は、現在のストラテジー及びデザインに関する問題や不利点を克服し、放射性アミノ酸や他の放射性標識を使用することなく、無細胞あるいは細胞翻訳系において生成される新生タンパク質の標識、検出、定量、分析及び分離の方法を供給する。本発明による1つの実施態様は、翻訳系において翻訳される新生タンパク質検出用方法を指示する。tRNA分子は、蛍光マーカでアミノアシル化され、ミスアミノアシル・tRNAを創造する。このミスアミノアシル化、あるいは電荷tRNAは、化学的、酵素的、あるいは一部化学的かつ一部酵素的技術によって形成することが可能であり、該技術は蛍光マーカをtRNA分子上の位置に配置して、そこから蛍光マーカを増殖ペプチド鎖中に転移し得る。マーカは、蛍光部位を有する天然または非天然アミノ酸、蛍光部位を有するアミノ酸類似体または誘導体、検出性標識、共役因子、あるいは蛍光部位を有するこれら成分の組み合わせを含み得る。ミスアミノアシル・tRNAは、無細胞抽出物のような翻訳系中に導入され、該システムはインキュベートされて、蛍光マーカが新生タンパク質中に取り込まれる。

#### 【0019】

本発明を特定の蛍光部分の性質に限定することは意図されていない。(例えば、NHSで)誘導体化されて可溶性となる蛍光化合物(例えば、クマリンのNHS誘導体)を含む様々な蛍光化合物が考案されている。それでもなお、高量子効率を有する多数の他のフルオロフォアと比較して、BODIPY化合物と試薬のいくつかは、UV及び可視励起蛍光検出のために高い効率で新生タンパク質中に取り込まれ得るといふ、さらに重要かつまれな特性を有することが実験に基づいて発見されている。蛍光部分を利用するこれらの方法は、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、ヒト遺伝子における突然変異に起因するトランケート型タンパク質、酵素、サイトカイン、ホルモン、免疫原性タンパク質、ヒトタンパク質、炭水化物と脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせのような新生タンパク質を、検出、分離及び定量するために使用し得る。

#### 【0020】

本発明による他の実施態様は、アミノ末端において新生タンパク質を標識するための方法を指示する。メチオニン開始tRNAまたはホルミルメチオニン開始tRNAのような、開始tRNA分子は蛍光部分(例えば、BODIPY部分)によりミスアミノアシル化されて、翻訳系に導入される。この系はインキュベートされ、マーカが新生タンパク質のアミノ末端に取り込まれる。マーカを含む新生タンパク質を検出、分離、かつ定量することができる。マーカあるいはマーカの一部は、実質的に未変性立体配置のままに機能的活性である新生タンパク質から切断され得る。

#### 【0021】

従って、本発明は組成物、方法及びシステム(系)を考案する。組成物については、本発明はBODIPYマーカでミスアミノアシル化されたtRNA分子を特別に考案する。

一つの実施態様では、本発明は以下を含む方法を考案する：a) tRNA分子とBODIPYマーカを供給し；さらに、b) 該tRNA分子を該BODIPYマーカでアミノアシル化して、ミスアミノアシル・tRNAを創出する。ある実施態様による方法は、さらに、c) 該ミスアミノ

10

20

30

40

50

アシル・tRNAを該マーカ―が新生タンパク質中に取り込まれるような条件下で、翻訳系に導入することを含む。さらに他の実施態様による方法は、さらに、d) 該マーカ―を含む該新生タンパク質を検出することを含む。また他の実施態様による方法は、さらに、e) 該検出された新生タンパク質を分離することを含む。

【0022】

本発明は、化学的あるいは酵素的ミスアミノアシル化によるtRNA分子のアミノアシル化を考案する。本発明はさらに、2またはそれ以上の異なるミスアシル化tRNAが翻訳系に導入される実施態様を考案する。好ましい実施態様においては、(取り込まれたマーカ―によって)検出された新生タンパク質は機能的に活性である。

【0023】

本発明が新生タンパク質の特定の性質に限定されることは意図されていない。一つの実施態様においては、本発明は、新生タンパク質の全体あるいは一部をコードするmRNAメッセージに抱合する新生タンパク質の検出用方法を考案する。一般的には、翻訳後修飾、タンパク質分解、ピューロマイシンリンカーを介するオリゴヌクレオチドのタンパク質C末端への付着、及び新生タンパク質と外因的に添加されたものを含む翻訳系の他の成分との相互作用を含む、新生タンパク質の様々な修飾が創案される。

【0024】

本発明がtRNA分子の特定の性質に限定されることは意図していない。一つの実施態様では、tRNA分子は開始tRNA分子である。他の実施態様では、tRNA分子はサブレッサーtRNA分子である。

本発明はさらにキットも考案する。一つの実施態様では、キットは、a) タンパク質合成系の少なくとも1成分を含む第一容器手段(例:試験管、小瓶等);さらに、b) ミスアミノアシル・tRNAを含む第二容器手段、該tRNAがBODOPYマーカ―によりミスアミノアシル化されている、を含む。そのようなキットは、開始tRNA及び/またはサブレッサーtRNAを含み得る。重要なことには、このキットは、該タンパク質合成系の特定の成分に限定はされず、様々な成分(例:リボソーム)が考案されている。

【0025】

本発明の他の実施態様は、翻訳系において翻訳される新生タンパク質検出用方法を指示する。tRNA分子は二元マーカ―システムの1成分によりアミノアシル化されている。このミスアミノアシル化、あるいは電荷tRNAは、化学的、酵素的、あるいは一部化学的かつ一部酵素的技術によって形成することが可能であり、該技術は二元マーカ―システムの成分をtRNA分子上の位置に配置して、そこからマーカ―成分を増殖ペプチド鎖中に転移し得る。二元マーカ―システムの成分は、天然または非天然アミノ酸、アミノ酸類似体または誘導体、検出性標識、共役因子あるいはこれら成分の組み合わせを含み得る。ミスアミノアシル・tRNAは、無細胞抽出物のような翻訳系に導入され、この系はインキュベートされて、マーカ―が新生タンパク質中に取り込まれる。二元マーカ―システムの第二成分が次に導入され、新生タンパク質中に取り込まれた第一成分を特異的に検出可能にする。これらの方法は、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、酵素、サイトカイン、ホルモン、免疫原性タンパク質、ヒトタンパク質、炭水化物と脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせのような新生タンパク質を、検出、分離及び定量するために使用し得る。

【0026】

本発明を特定の翻訳系に限定することは意図していない。一つの実施態様において、無細胞翻訳系は、Escherichia coli溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ膵臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。また、本発明が使用する特定の反応条件に限定されることも意図されていない。しかし、典型的には無細胞翻訳系は、約25 ~ 約45 の温度でインキュベートされる。本発明は、連続フローシステムあるいは透析システムのどちらも考案する。

【0027】

本発明による他の実施態様は、検出可能な電磁スペクトル特性を有する非放射性マーカーを使用する、細胞または無細胞翻訳系において翻訳された新生タンパク質検出用の方法を指示する。前述のように、非放射性マーカーはtRNA分子にミスアミノアシル化され、このミスアミノアシル・tRNAが翻訳系に添加される。マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系はインキュベートされる。マーカーを含む新生タンパク質は、マーカーの特異的電磁スペクトル特性により検出され得る。新生タンパク質はさらに、これらのマーカーのユニークな特性を利用したり、電気泳動法、ゲル濾過法、高圧あるいは高速高圧液体クロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ（親和カクロマトグラフィ）、イオン交換クロマトグラフィ、化学的抽出法、磁性ビーズ分離法、沈降法あるいはこれら技術の組み合わせにより分離され得る。

10

## 【0028】

本発明による他の実施態様は、レポーター特性を有するマーカーを含み、レポーターが第二因子と接触される際に、新生タンパク質の合成を指示する。レポーターマーカーは、ペプチドに取り込まれると検出可能な電磁スペクトル特性を有し、さらにそのスペクトル特性は取り込まれなかったマーカーやtRNA分子に付着されたマーカーと識別可能である化学部分である。前述のように、tRNA分子は、今回はレポーターマーカーを使用して、ミスアミノアシル化される。ミスアミノアシル・tRNAを翻訳系に添加して、さらにペプチド中にマーカーを取り込むためにインキュベートする。レポーターマーカーは、タンパク質翻訳プロセスを調査し、タンパク質合成系の他の成分から予め分離することなしに、新生タンパク質を検出及び定量するために使用し得る。

20

## 【0029】

本発明による他の実施態様は、細胞あるいは無細胞翻訳系において、マーカーの存在下で翻訳、分離さらに必要に応じて精製された新生タンパク質から成る組成物を指示する。組成物はさらに、薬学的受容性のあるキャリア（担体）を含み、ワクチンのような免疫学的活性組成物、あるいはヒト及び他の哺乳類に使用するための薬物のような薬学的活性組成物として利用され得る。

## 【0030】

本発明による他の実施態様は、質量分析の使用による、翻訳系で翻訳される新生タンパク質検出用方法を指示する。質量が既知である非放射性マーカーが、tRNA分子にミスアミノアシル化され、このミスアミノアシル・tRNAが翻訳系に添加される。質量マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系をインキュベートする。翻訳系の質量スペクトルを次に測定する。新生タンパク質の存在は、未修飾タンパク質の質量と、新生タンパク質に加えてマーカーの質量を含む修飾アミノ酸の質量に対応する高質量位置にある第二バンドに対応する、タンパク質合成系の質量スペクトルのピークを識別することにより直接検出し得る。質量マーカーが光開裂性である場合は、質量マーカーを含む新生タンパク質に対する第二バンドの割り当ては、光線によりマーカーを除去することにより確認し得る。

30

## 【0031】

本発明による他の実施態様は、翻訳系において翻訳される突然変異を有する新生タンパク質を検出する方法を指示する。起こり得る突然変異を含む可能性のあるタンパク質をコードするRNAまたはDNAを、翻訳系に添加する。新生タンパク質を合成するために系をインキュベートする。タンパク質のN末端またはその近隣に位置するアフィニティー（親和性）マーカーを使用して、新生タンパク質を次に翻訳系から分離する。タンパク質を次に、タンパク質のN末端またはその近隣に位置する検出マーカー（N末端マーカー）の存在下で分析する。タンパク質のC末端またはその近隣に位置する配列依存性検出マーカー（C末端マーカー）上で、別の測定を行う。次に、新生タンパク質におけるN末端とC末端マーカーの取り込み度の比較を行う。本発明をN及びC末端マーカーの性質、あるいは使用するアフィニティーマーカーのタイプによって限定することは意図していない。様々なマーカーが考案されている。一つの実施態様では、アフィニティーマーカーは、抗体または他の結合性分子により認識されるエピトープを含む。一つの実施態様では、N末端マーカーは蛍光マーカー（例：BODIPYマーカー）を含み、C末端マーカーは金属結合領域（例：

40

50

Hisタグ)を含む。

【0032】

本発明は、3つのマーカー(例：N末端マーカー、C末端マーカー、アフィニティーマーカー)を新生タンパク質中に導入する様々な方法を考案する。一つの実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働く第一AUGコドンのみを認識し、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びi i) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が該第一マーカー、該C末端マーカー及び(ある実施態様では)該アフィニティーマーカーを含むような条件下で、該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む。一つの実施態様による方法は、ステップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

10

【0033】

他の実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働く第一AUGコドンのみを認識し、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びi i) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が該タンパク質のN末端にある該第一マーカー、該C末端マーカー及び(ある実施態様では)該第一マーカーに隣接する該アフィニティーマーカーを含むような条件下で該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む。一つの実施態様による方法は、ステップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

20

【0034】

さらに他の実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働くようにデザインされた第一コドンのみを認識、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びi i) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が、該第一マーカー、該C末端マーカー及び(ある実施態様では)該アフィニティーマーカーを含むような条件下で該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む。一つの実施態様による方法は、ステップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

【0035】

さらに他の実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働くようにデザインされた第一コドンのみを認識、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びi i) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が、該タンパク質のN末端にある該第一マーカー、C末端マーカー及び(ある実施態様では)該第一マーカーに隣接する該アフィニティーマーカーを含むような条件下で該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む。一つの実施態様による方法は、ステップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

30

【0036】

本発明はさらに、2つのマーカーのみが使用される(例えば、N末端マーカーとC末端マーカー)実施態様をも考案する。一つの実施態様では、新生タンパク質が、アフィニティーマーカーによる特異的相互作用によるよりは、固体支持体(例：ビーズ、マイクロウェル、ストリップ等)に非特異的に結合されている。この文脈において、「非特異性」結合とは、結合が新生タンパク質配列の独自性によって行われなことを示すこと意味する。そのかわり、結合は電荷相互作用による。一つの実施態様では、本発明は、固体支持体の表面上に新生タンパク質を捕獲するために、固体支持体が修飾されること(例えば、表面の電荷を変化させるために機能化する)を考案する。一つの実施態様では、固体支持体はポリ L リジンコートである。さらに他の実施態様では、固体支持体は、ニトロセルローズ(例：ストリップ、マイクロウェルを含むニトロセルローズ等)である。固体支持体の特定の性質に関わらず、本発明は、2つのマーカーを含む新生タンパク質が、マーカー

40

50

の即時検出を許すような条件下で、捕獲されることを考案する。

【0037】

前記に説明する2マーカー及び3マーカー実施態様のどちらにおいても、本発明は、1またはそれ以上のマーカーを、プライマー延長あるいはPCRにより核酸鋳型中に導入することを考案する。一つの実施態様では、本発明は、(5'端上またはその付近に)プロモーターを含むプライマー、リボソーム結合部位(「RBS」)、及び開始コドン(例:ATG)を、鋳型に対する相補性領域と共に考案する。他の実施態様では、本発明は、(5'端上またはその付近に)プロモーター、リボソーム結合部位(「RBS」)、開始コドン(例:ATG)、アフィニティマーカーコード領域、及び鋳型に対する相補性領域を考案する。本発明を相補性領域の長さによって限定することは意図していない;好ましくは、該領域は長さが8塩基以上であり、より好ましくは長さが15塩基以上であり、長さが20塩基以上であることがさらに好ましい。

10

【0038】

本発明がリボソーム結合部位によってに限定されることは意図していない。一つの実施態様では、本発明は、翻訳前に存在し、真核細胞において転写かつ翻訳される大多数のmRNAで最初のATGを開始する、非ランダムヌクレオチドのストリングであるKozak配列(共通配列:5'-GCCA/GCCATGG-3')(配列番号1)を含むプライマーを考案する。M. Kozak、Cell 44:283~292(1986)を参照のこと。他の実施態様では、本発明は通常は、通常は、翻訳開始コドン:mRNA5'-UAAGGAGGU - N<sub>5-10</sub> - AUG.(配列番号3)のすぐ5'に発見され、Shine-Dalgarno(SD)配列として知られているポリプリンドメインUAAGGAGGU(配列番号2)の一部または全てを含む、原核細胞mRNAリボソーム結合部位を含むプライマーを考案する。

20

【0039】

PCRには、2プライマーが使用される。一つの実施態様では、本発明は、フォワードプライマーとして、(5'端上またはその付近に)プロモーターを含むプライマー、リボソーム結合部位(「RBS」)、及び開始コドン(例:ATG)を、鋳型に対する相補性領域と共に考案する。他の実施態様では、本発明は、フォワードプライマーとして、(5'端上またはその付近に)プロモーターを含むプライマー、リボソーム結合部位(「RBS」)、開始コドン(例:ATG)、アフィニティマーカーコード領域、及び鋳型に対する相補性領域を考案する。本発明は、一つの実施態様では、(5'端上またはその付近に)1またはそれ以上の終止コドンと(HISタグのような)C末端マーカーをコードする領域含むリバースプライマーを考案する。

30

【0040】

本発明による他の実施態様は、電気泳動(例:毛管電気泳動)によって翻訳系において翻訳される新生タンパク質と分子の相互作用を検出するための方法を指示する。検出マーカーでミスアミノアシル化されたtRNAがタンパク質合成系に添加される。検出マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系をインキュベートする。1またはそれ以上の特定分子を、次に新生タンパク質に(分離前あるいは分離後に)併合して、新生タンパク質/分子抱合体を含む混合物を形成する。この混合物のアリコートに次に毛管電気泳動にかける。新生タンパク質/分子抱合体は、取り込まれたマーカーを有する新生タンパク質の電気泳動の易動度の変化を検出することにより同定される。

40

【0041】

本発明はさらに、前記に説明する方法と組成物を、薬物/プロテオームのスクリーニング用方法において使用することを考案する。例えば、本発明は、(薬物のような)リガンドと相互作用するタンパク質またはタンパク質の一部を同定する方法を考案し、該方法は、該所望するタンパク質を発現する細胞からcDNAライブラリーを調製するステップを含み;該cDNAライブラリーを、発現ベクター中に挿入し、これによって、発現cDNAライブラリーを形成し;該発現ライブラリーを細菌細胞中に形質転換して、さらに該細菌細胞を培養して個別の細菌コロニーを生産し;各コロニーが該発現ライブラリーの1メンバーを含み;既定数の該個別細菌コロニーから成るプールを収集し;細菌コロニーの該プールからcDNAを分離し;該cDNAによりコードされるタンパク質(あるいはタンパク質の一部)を発現

50

して；さらに所望するタンパク質（あるいはその一部）と所望する該タンパク質（またはその一部）をコードするcDNAを同定し；約50個の個別細菌コロニーのプールを収集し（より好ましくは50個以下、さらにより好ましくは40個以下、さらには30個以下、さらに最も好ましくは25個以下であるが10個以上）、各コロニーが発現cDNAライブラリーの1メンバーを含み、これによりcDNAプールを形成し；さらに該cDNAプールのcDNAでコードされるタンパク質（あるいはその一部）を、普通の反応混合物中にあるインビトロ転写／翻訳系において発現し、従って、該反応混合物から所望するタンパク質（またはその一部）を同定する。

#### 【0042】

本発明による他の実施態様及び利点は、一部は以下の説明において提示され、さらに一部は、本説明により明らかであるか、あるいは本発明の実施から習練され得る。

#### 〔定義〕

本発明の理解を容易とするために、多数の術語を以下に定義する。

#### 【0043】

術語「遺伝子」は、ポリペプチドまたは前駆物質の生産のために必要な制御及びコード配列を含むDNA配列を言及する。ポリペプチドは、全長コード配列、あるいは所望する酵素活性が保有されている限り、コード配列の一部によってコードされ得る。

術語「野生型」は、天然発生原料から分離された際にその遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する遺伝子または遺伝子産物を言及する。野生型遺伝子は、集団内で最も頻りに観察される遺伝子であり、従って、遺伝子の「正常」あるいは「野生型」形状が随意にデザインされている。対照的に、術語「修飾」または「突然変異体」とは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較すると、配列及び／または機能特性における修飾（すなわち、変更特徴）を呈示する遺伝子または遺伝子産物を言及する。天然発生突然変異体を分離することが可能であることが注目されており、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較する際に変更された特性を有する事実によりこれらは同定される。

#### 【0044】

術語「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用されるように、2またはそれ以上、好ましくは3以上、さらに通常では10以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む分子として定義される。正確なサイズは、多数の因子に依存し、またこれはオリゴヌクレオチドの究極の機能または用途に基づく。オリゴヌクレオチドは、化学合成、DNA複製、逆転写、あるいはそれらの組み合わせを含む、いずれの方法でも生成することが可能である。

#### 【0045】

モノヌクレオチドが反応して、一つのモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸が、一方向にリン酸ジエステル結合を介してそれに隣接する3'酸素に付着するような方式でオリゴヌクレオチドを作製し、5'リン酸がモノヌクレオチドペントース環の3'酸素に結合していない場合は、オリゴヌクレオチドの一端は「5'端」として言及され、さらにその3'酸素が次のモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸と結合していない場合は、「3'端」と言及される。本明細書に使用されるように、核酸配列は、それが分子内から大型オリゴヌクレオチドであっても、5'及び3'端を有し得る。

#### 【0046】

術語「プライマー」は、プライマー延長が開始されるような条件下に置かれる際に、合成開始のポイントとして作用することが可能であるオリゴヌクレオチドを言及する。オリゴヌクレオチド「プライマー」は、天然に、精製された制限消化として生じ、あるいは人工的に生産され得る。

プライマーは、3'端上に、鋳型の特定配列のストランド（鎖）と「実質的」に相補性である領域を有するように選択される。プライマー延長を生じるためには、プライマーは、鋳型ストランドとハイブリダイズするに十分なだけ相補性でなければならない。プライマー配列は、鋳型と全く同一配列である必要はない。例えば、プライマー配列の残り部分が実質的にストランドと相補性であれば、非相補性ヌクレオチドフラグメントが、プライ

10

20

30

40

50

マーの5'端に付着し得る。プライマー配列が、鋳型配列とハイブリダイズするために十分な相補性を有し、それによってプライマーの延長生成物の合成のための鋳型プライマー複合体を形成するならば、非相補性塩基あるいはより長い配列がプライマー中に散在してもよい。

【0047】

本明細書中に使用されるように、術語「ハイブリダイズ」及び「ハイブリダイゼーション」は、ターゲット核酸に対して相補性配列をアニーリングすることを言及する。相補性配列を含む核酸の2ポリマーがお互いを見つけだして、塩基対合相互作用を通してアニールする能力は、既に認識されている現象である。Marmur 及び Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:453 (1960) 及び Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:461 (1960)。

10

【0048】

術語「アニールされた」及び「ハイブリダイズされた」の使用は互換性があり、部分的相補性のみを有する領域の結合を含む、オリゴヌクレオチドとターゲット核酸間の特定かつ再現可能な相互作用を含むことが意図されている。

本明細書で使用される核酸配列の補体は、一つの配列の5'端が他の配列の3'端と対合されるように核酸配列と整列される際に、「アンチパラレル(逆平行)会合」状態にあるオリゴヌクレオチドを言及する。天然核酸には通常発見されない一定の塩基が、本発明による核酸に含まれることがあり、例えば、イノシン及び7-デアザグアニンを含む。相補性は、完全である必要はなく、安定二重鎖がミスマッチ塩基対やマッチしない塩基を含んでもよい。核酸テクノロジー分野の当業者は、二重鎖の安定性を、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、塩基組成及びオリゴヌクレオチドの配列、イオン強度及びミスマッチ塩基対のインシデンス(頻度)を含む、多数の変数を考慮して経験的に決定することができる。

20

【0049】

核酸二重鎖の安定性は、融解温度、あるいは「 $T_m$ 」により測定される。特定された条件下でのその核酸二重鎖の $T_m$ は、塩基対の平均半分が解離する温度である。

本明細書で使用される術語「プローブ」は、プローブ中の少なくとも一つの配列と他方の核酸中の配列との相補性または再現性のある誘引相互作用による他の手段のために、他の核酸配列中の配列との二重鎖構造または他の複合体を形成するオリゴヌクレオチドを言及する。

30

【0050】

「遺伝子配列とマッチするまたは相補性のあるオリゴヌクレオチドプライマー」は、単鎖または二重鎖核酸の鋳型依存性合成を促進することが可能であるオリゴヌクレオチドプライマーを言及する。遺伝子配列にマッチするまたは相補性のあるオリゴヌクレオチドプライマーは、PCR、RT-PCRなどにおいて使用し得る。前記に記載のように、オリゴヌクレオチドプライマーは、ターゲットまたは鋳型配列と完全に相補性である必要はない。鋳型依存性合成による伸長が可能なように、プライマーは鋳型と十分な相互作用を有することのみを必要とする。

【0051】

40

本明細書で使用されるように、術語「ポリヒスチジントラクト」または(HISタグ)は、新生タンパク質のアミノまたはカルボキシル末端のいずれかに、2~10ヒスチジン残基が存在することを言及する。6~10残基から成るポリヒスチジントラクトが好ましい。ポリヒスチジントラクトは、所望するタンパク質に加えられ、結果生じるタンパク質のニッケル・キレートカラム上でのアフィニティー精製、または他の分子(例えば、HISタグと反応性のある抗体)との相互作用を通してタンパク質末端の同定を可能とする、連続ヒスチジン残基数として機能的定義もされる。

【0052】

[発明の説明]

本明細書に具体化及び説明するように、本発明は、新規または新生タンパク質合成によ

50

る産物の非放射性標識及び検出方法、かつ細胞または無細胞翻訳系において既存するタンパク質からそれらの新生タンパク質の分離方法を含む。放射性標識が使用されないため、廃棄物処理のため遵守されるべき特定の規定はない。放射性標識を使用する際に生じる、翻訳産物のそれ以上の利用を阻止するような放射能の危険性やリスクがなく、従って結果生じるタンパク質産物を直接的あるいはさらに精製して使用し得る。さらに、例えば、ユニークなサプレッサー-tRNAを含む、タンパク質配列または構造に関する既存の知識は必要ない。さらに、遺伝子またはmRNAの配列は決定される必要がない。その結果、mRNAのコード領域におけるナンセンスコドンや特定コドンのいずれの存在も必要ではない。指定の標識についての特定のtRNAを含む、いずれのtRNAも使用することが可能であるが、そのような特異性は必要ではない。翻訳後標識とは異なり、新生タンパク質は、特異性により標識され、タンパク質構造や機能を影響する可能性がある翻訳後修飾を受けることがない。

10

## 【0053】

本発明による1つの実施態様は、翻訳系において合成される新生タンパク質を標識するための方法を指示する。これらのタンパク質は、ペプチド鎖中に取り込まれる検出マーカーを伴って合成されることにより標識される。tRNA分子にアミノアシル化されるマーカーは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸類似体または誘導体、または化学的部分を含み得る。これらのマーカーは、翻訳プロセス中に、その結果生じるミスアミノアシル-tRNAから新生タンパク質中に導入される。アミノアシル化は、それによってtRNAが電荷されるプロセスである。本プロセスがインビボで起こる際は、天然アミノアシル化と言及され、その結果生じる産物は、天然アミノ酸で電荷されたアミノアシル-tRNAである。本プロセスが人工的手段を介して生じる際は、ミスアミノアシル化と称され、天然アミノ酸以外で電荷されるtRNAはミスアミノアシル-tRNAと言及される。

20

## 【0054】

本方法に従って、ミスアミノアシル-tRNAは、細胞または無細胞タンパク質合成系、その翻訳系中に導入され、そこで、タンパク質合成の間に増殖ペプチド鎖中で天然アミノ酸の代わりに検出マーカーを取り込むように機能する。この翻訳系は、RNA及び酵素、翻訳、開始及び延長因子、さらに化学的試薬を含むマクロ分子を含む。該系のRNAは、リボソームRNA (rRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA) 及びトランスファーRNA (tRNA) の3つの分子形であることを必要とする。mRNAは、そのコドン配列内にコードされるペプチドを構築するための遺伝情報を担う。tRNAは、mRNAを解読する特定のアンチコドンを含み、増殖ペプチド鎖に沿う位置中に個別にアミノ酸を運ぶ。rRNAとタンパク質の複合体である、リボソームは、トランスロケーションを含む、翻訳プロセスが進行する動的構造フレームワークを供給する。細胞内では、個別化されたアミノアシル-tRNAシンテターゼが、特定のアミノ酸をマッチするアンチコドンを担うtRNA分子に結合して、アミノアシル化プロセスにより、アミノアシル化あるいは電荷tRNAを創出する。アミノアシル化または電荷tRNA分子を含む翻訳プロセスは、Molecular Cell Biology (分子細胞生物学) (J. Darnell et al. 編集、Scientific American Books、N.Y.、 N.Y. 1991)に説明されており、本明細書に参考文献として特に編入されている。アミノアシル化は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸類似体または誘導体、あるいは検出性化学物質または共役因子のような他の分子を利用する、天然または人工的手段であり得る。結果生じるミスアミノアシル-tRNAは、化学的部分、非天然アミノ酸、アミノ酸誘導体または類似体、あるいは他の検出性化学物質と結合する天然アミノ酸を含む。これらのミスアミノアシル-tRNAは、そのマーカーを翻訳中に増殖ペプチド鎖の中に取り込み、マーカーの存否によって検出及び分離し得る標識新生タンパク質を形成する。

30

40

## 【0055】

細胞または無細胞翻訳系中での翻訳により発現され得るいずれのタンパク質も、新生タンパク質であり、従って、本発明による方法により標識、検出かつ分離され得る。そのようなタンパク質の実例は、タンパク質分解性タンパク質のような酵素、サイトカイン、ホルモン、免疫原性タンパク質、炭水化物または脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ヒトタンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びフラグ

50

メントかつその組み合わせを含む。そのような遺伝子を担う組み換えベクターは一般的に、かなり高レベルでmRNAを転写する強力なプロモーターを担っているために、これらの方法は、組み換え型遺伝子産物及び遺伝子融合産物の検出によく応用される。これらのmRNAは、翻訳系において容易に翻訳される。

#### 【0056】

翻訳系は、細胞または無細胞であってもよく、まさに原核性または真核性であってもよい。細胞翻訳系は、透過化細胞または細胞培養のような全細胞調製物を含み、そこで所望する核酸配列はmRNAに転写され、mRNAが翻訳され得る。

無細胞翻訳系は、市販されており、様々な異なるタイプ及びシステムがよく知られている。無細胞システムの実例は、*Escherichia coli* (大腸菌)溶解物のような原核性溶解物、さらにコムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球、カエル卵母細胞溶解物及びヒト細胞溶解物のような真核性溶解物を含む。結果生じるタンパク質がグリコシル化、リン酸化または別な方法で修飾されている場合は、多数のそのような修飾は真核系でのみ可能であるために、真核性抽出物または溶解物が好ましいであろう。これらの抽出物及び溶解物のいくつかは、市販されており入手可能である (Promega; Madison, WI; Stratagene; La Jolla, CA; Amersham; Arlington Heights, IL; GIBCO/BRL; Grand Island, NY)。ミクロソーム膜を含むイヌ臍臓溶解物のような、膜性抽出物もまた入手が可能であり、分泌型タンパク質の翻訳に有用である。精製翻訳因子の混合物もまた、溶解物、または開始因子-1 (IF-1)、IF-2、IF-3 (または )、延長因子T (EF-Tu)、あるいは終止因子のような精製翻訳因子を補充した溶解物の組み合わせと同様に、タンパク質中にmRNAを翻訳する目的に使用され成功を収めている。

#### 【0057】

無細胞システムはまた転写/翻訳系と共役させることができ、そこでDNAが系に導入され、mRNA中に転写され、さらにmRNAが、本明細書に特に参考文献として編入している、*Current Protocols in Molecular Biology* (分子生物学における現代のプロトコル) (F.M. Ausubel et al. 編集、Wiley Interscience、1993) に説明されているように、翻訳される。真核性転写系に転写されたRNAは、ヘテロ核RNA (hnRNA) または5'端キャップ (7メチルグアノシン) 及び3'端ポリAテール成熟mRNAの形状のことがあり、これはある翻訳系では利点となり得る。例えば、mRNAキャップは、網状赤血球溶解物系では高い効率で翻訳される。

#### 【0058】

マーカーによるミスアミノアシル化のために選択されるtRNA分子は、タンパク質合成系中で機能する能力以外は特別の特性を有する必要はない。生体系におけるタンパク質翻訳系の普遍性のために、大量数のtRNAが、細胞及び無細胞反応混合物のどちらにも使用され得る。ナンセンスまたはアンバーコドン (UAG) のようなユニークなコドンを認識する特定のtRNA分子は、必要とされない。

#### 【0059】

非天然性類似体のタンパク質への翻訳中の部位特異性取り込みもまた必要ではない。マーカーの取り込みはポリペプチドのどこで生起されてもよく、また複数の位置で生起してもよい。これは翻訳されたmRNAの遺伝的配列に関する情報を予め得る必要性、またはこの遺伝的配列を修飾する必要性を排除する。

ある場合は、新生タンパク質の機能的特性を保存することが望ましいことがある。タンパク質機能または構造を妨害しない部位にマーカーを取り込むtRNAのサブセットを選択することが可能である。ポリペプチドのアミノまたはカルボキシル末端のアミノ酸は、機能や構造を実質的に変更しない。マーカーでミスアミノアシル化された際に、タンパク質翻訳開始のための万能コドン (AUG) を認識するtRNA分子は、アミノ末端にマーカーを配置する。原核性タンパク質合成系は、開始tRNA<sup>fMet</sup>分子を利用し、真核性系は、開始tRNA<sup>Met</sup>分子を利用する。いずれの系においても、開始tRNA分子は、マーカー、レポーターまたはアフィニティー特性を有する非天然アミノ酸またはアミノ酸類似体または誘導体であり得るマーカーでアミノアシル化される。結果生じる新生タンパク質は、アミノ末端での

み標識されるが、内部に配置されたマーカーはタンパク質の構造的または機能的状況を必ずしも破壊しない。例えば、tRNA<sup>LYS</sup>は、タンパク質の機能や構造を妨害しないアミノ酸誘導体である、ダンシルリジンでミスアミノアシル化され得る。さらに、ミスアミノアシル・tRNAを限定量使用することにより、極めて僅かな量のみがマーカーで標識された新生タンパク質を検出及び分離することが可能であり、これは大量のマーカーの影響が有害であったり、未知な場合のタンパク質分離に極めて有効である。

【0060】

アミノアシル化に使用するtRNA分子は、多数の製造元から市販されており、*Escherichia coli* (大腸菌)、イースト、仔ウシ肝臓及びコムギ胚芽細胞を含む原料から既知の方法により調製され得る (Sigma Chemical; St. Louis, MO; Promega; Madison, WI; Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianapolis, IN)。その分離と精製は、主として細胞分解、フェノール溶出、さらにDEAEセルロース上のクロマトグラフィーを含む。アミノ酸特異的tRNA、例えば、tRNA<sup>Met</sup>は、クローンされた遺伝子からの発現により分離され、宿主細胞中で過剰発現され、さらに分離用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、次にバンド切除及び高収率かつ純度溶出のような技術により全tRNAから分離される (Seong 及び RajBhandary, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 334~338, 1987)。ランオフ転写は、いずれのtRNAも高純度で生産することを可能とするが、翻訳後修飾を欠如するために、その適用には限りがある (Bruce 及び Uhlenbeck, Biochemistry 21: 3921, 1982)。

【0061】

ミスアミノアシル・tRNAは、細胞あるいは無細胞タンパク質合成系中に導入される。無細胞タンパク質合成系においては、反応混合物は、リボソーム、tRNA、rRNA、スパーミン及び適切な濃度と適切なpHであるマグネシウム及びカリウムのような生理学的イオンを含む、タンパク質合成をサポートするために必要な全ての細胞成分を含む。反応混合物は、一般的には、コムギ胚芽、*E. coli* (S-30)、赤血球 (網状赤血球溶解物) 及び卵母細胞を含む多数の様々な原料に由来し、いったん作製したものは、アリコートとして、約 +40 ~ -70 の温度で保存し得る。そのような反応混合物調製の方法は、J.M. Pratt (Transcription and Translation (転写と翻訳)、B.D. Hames 及び S.J. Higgins、編集、p. 209、IRL Press、Oxford、1984) によって説明されており、参考文献として本明細書に編入されている。多数の異なる翻訳系が、多数の製造元から市販されている。

【0062】

ミスアミノアシル・tRNAは、容量と濃度を既定した溶液として、反応混合物中に直接に添加される。これは、反応混合物を -70 で保存する直前に行うことができ、その場合は、タンパク質合成開始前に総混合物が解凍される。あるいは、これはタンパク質合成開始前に行うことができる。新生タンパク質中へのマーカーの効率的な取り込みは、最終pH及びマグネシウムイオン濃度に感受性がある。反応混合物は、通常では約pH 6.8で、約3mMのマグネシウムイオン濃度を含む。これらの条件は、ミスアミノアシル・tRNAの塩基不安定性であるアミノアシル結合に安定性を分与する。アミノアシル・tRNAは、翻訳抽出物から十分な量で得ることが可能である。マーカーで電荷されたミスアミノアシル・tRNAは、約1.0 µg/ml ~ 約1.0 mg/ml、好ましくは約10 µg/ml ~ 約500 µg/ml、さらに好ましくは約150 µg/mlの濃度で添加される。

【0063】

タンパク質合成の開始は、一定量のmRNAまたはDNAのミスアミノアシル・tRNAを含む反応混合物中への添加時に起こる。mRNA分子は組み換え型原料から調製または獲得されるか、またはポリ dTクロマトグラフィーのような手順により他の細胞から精製され得る。反応混合物成分の正しい比率を確実にするための一つの方法は、バイアル (小瓶) や標準マイクロ遠心分離用試験管のような便利な容器内に保存された既定容量を使用することである。例えば、新生タンパク質をコードするDNA及び/またはmRNA及びミスアミノアシル・tRNA溶液を適切な量をプレミックスして、試験管内に分けて保存される。タンパク質合成を開始する必要のある際に、試験管 (内容物) を混合する。

【0064】

10

20

30

40

50

無細胞系における翻訳は、一般的には、成分をある一定の期間インキュベートする必要がある。インキュベーション時間は、約5分～数時間にわたり、しかし好ましくは、約30分～約5時間、さらに好ましくは、約1～3時間である。インキュベーションは、連続フローシステムを使用して、試薬が系中に流入し、さらに新生タンパク質が取り出されるかまたはそのまま蓄積するような連続的方法で実施され得る (A.S. Spirin et al., Sci. 242: 1162~64, 1988)。本プロセスは、新生タンパク質の大規模生産のために望ましいであろう。インキュベーションは、透析膜によって翻訳系の多量成分から分離されている外側リザーバー中にある翻訳系のために、消耗性試薬が利用できる透析系を使用して実施することもできる [Kim, D. 及び Choi, C. (1996) Biotechnol Prog 12, 645~649]。インキュベーション時間は、翻訳ミックスの量とインキュベーション時間に応じて大きく変化する。インキュベーション温度は、約4℃～約60℃、また好ましくは約15℃～約50℃、さらに好ましくは約25℃～約45℃、また約25℃～約37℃であることがさらに好ましい。あるマーカーは、温度変化に感受性があり、そのような場合は、そのようなインキュベーションは非感受性温度領域で行うことが好ましい。翻訳ミックスは、典型的には、溶液のpHを約6～8に、好ましくは約7に維持するために、トリス・塩酸、Hepesのような緩衝液、あるいは他の適切な緩衝剤を含む。さらに、あるマーカーは、pH感受性があり、そのような場合は、マーカーの感受性領域以外のpHでインキュベーションを行うことが好ましい。翻訳の効率は最適ではないかもしれないが、マーカーの利用度は向上されるだろう。翻訳系に含み得る他の試薬は、還元剤としてジチオトレイトール(DTT)または2-メルカプトエタノール、RNA破壊を抑制するためにRNasin、さらに翻訳プロセスへの化学エネルギー供給のためのヌクレオシド三リン酸塩またはクレアチンリン酸塩及びクレアチンキナーゼを含む。

#### 【0065】

細胞タンパク質合成において、ミスアミノアシル・tRNAまたはマーカーを、無傷細胞、細胞オルガネラ、細胞エンベロープ及び無傷の生体膜によって結合されており、タンパク質合成システムを含んでいるその他の散在する容積中に導入する必要がある。これは、tRNA溶液をリポソームあるいは細胞との融合を誘導し得る特徴を有するベシクル内に封入するような既に確立されている様々な方法を介して達成し得る。融合はtRNAを含むリポソームやベシクル内部の溶液を細胞中に導入する。他方、ある細胞は、ファゴサイトーシス(食作用)によって、リポソームを内部細胞質中に能動的に取り込む。tRNA溶液はさらに、リポフェクションを仲介する陽イオン性洗浄剤によるプロセス (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413~17, 1987) によって導入、または卵母細胞のような大型細胞中に注入され得る。注入は、マイクロピペットによる直接灌流、あるいは電気穿孔法による。

#### 【0066】

他方、低張媒体中にある低濃度の洗浄剤を含む溶液中で短時間インキュベートすることにより細胞を透過化し得る。有用な洗浄剤は、Nonidet-P 40 (NP40)、Triton X-100 (TX-100) またはデオキシコール酸塩を、約0.01nM～1.0mM、好ましくは約0.1μM～約0.01mM、さらにより好ましくは約1μMの濃度で含む。透過化細胞は、マーカーを変質することなく細胞膜を通過させ、ホスト細胞酵素によって新生タンパク質中に取り込まれることを可能にする。そのような系は、細菌細胞、初代細胞、不死細胞株、ヒト細胞または混合細胞集団のような培養中の無傷細胞から形成され得る。これらの細胞は、例えば、強力があつある場合は調節プロモーターの制御下で、所望の遺伝子を含む適切なベクターによって形質移入され得る。メッセージはこれらのベクターから発現され、引き続いて細胞内で翻訳される。既に非放射性マーカーで電荷された無傷ミスアミノアシル・tRNA分子は、細胞中に導入され、また翻訳産物中に取り込まれ得る。

#### 【0067】

新生タンパク質検出のためのミスアミノアシル化用途の一つの実例の概略を、図4に提示する。tRNA分子は、UV(紫外線)照射によって励起されると強い蛍光性となるマーカーでミスアミノアシル化される。このミスアミノアシル・tRNAは、次に無細胞タンパク質

10

20

30

40

50

合成抽出物中に導入され、マーカー類似体を含む新生タンパク質が生産される。無細胞抽出物中のタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって分離される。結果生じるゲルは、無細胞抽出物中に存在する全てのタンパク質に対応するバンドを含む。新生タンパク質は、ゲルのUV照射時に、マーカーを含むタンパク質に対応するバンドからの蛍光の検出により同定される。検出は、目視観察、あるいは蛍光検出の他の従来の手段によって行うことができる。

#### 【0068】

ミスアミノアシル・tRNAは、細胞酵素を使用する天然アミノアシル化、または化学的ミスアミノアシル化のようなミスアミノアシル化によって形成され得る。化学的ミスアミノアシル化の一つのタイプは、マーカーまたはマーカー前駆物質の付着を可能にするためのtRNAのトランケーションを含む。例えば、過ヨウ素塩 + リジン(pH8.0)、及びアルカリホスファターゼによる継続処理は、tRNA分子の3'末端残基を除去して、3'末端からのモノヌクレオチドまたはジヌクレオチドの欠落を有するtRNA-OH-3'を生じる(Neu 及び Heppel、J. Biol. Chem. 239:2927~34、1964)。他方、tRNA分子を遺伝的に操作して、tRNA遺伝子の特定部分を欠落させることもできる。結果生じる遺伝子は、転写されて、トランケート型tRNA分子を生産する(Sampson 及び Uhlenbeck、Proc. Natl. Acad. Sci. US A 85:1033~37、1988)。次に、ジヌクレオチドは、例えば、アシル化によって、修飾アミノ酸または他のマーカーに化学的に結合される。この手順を使用して、マーカーを合成し、高収率でジヌクレオチドにアシル化することができる(Hudson、J. Org. Chem. 53:617~624、1988; Happ et al.、J. Org. Chem. 52:5387~91、1987)。これらの修飾基は、共に結合され、ジヌクレオチドを介して、リガーゼ結合と言及されるプロセスにおいて、トランケート型tRNA分子に結合される(図3B)。

#### 【0069】

アミノアシルtRNAシンターゼによるtRNAの活性化に含まれる結合(図3B、結合A)以外の異なる結合がミスアミノアシル化には含まれている(図3B、結合B)。T4 TNAリガーゼはアシル置換基を認識しないために、tRNA分子は、化学的複雑化や副反応なく、容易にミスアミノアシル化され得る(結合B、図3B)(T.G. Heckler et al.、Biochemistry 23:1468~73、1984; 及び T.G. Heckler et al.、Tetrahedron 40:87~94、1984)。本プロセスは、付着アミノ酸の性質に非感受性であり、従って、様々な非天然アミノ酸を使用するミスアミノアシル化を可能とする。対照的に、完全な酵素的アミノアシル化(結合A)は、基質tRNAかつアミノ酸の構造に極めて感受性で、かつ特異的である。

#### 【0070】

マーカーは基本的には、翻訳プロセスの酵素により認識され、電荷tRNAから増殖ペプチド鎖中に運搬される分子である。有効であるためには、マーカーは一定の物理的及び生理化学的特性を持たなければならない。従って、有用なマーカーを同定するために使用される複数の基準がある。第一に、マーカーは増殖ペプチド鎖中への取り込みに適切でなければならない。これは、ペプチド結合形成に参与する化学基の存在により決定され得る。第二に、マーカーはtRNA分子に付着可能でなければならない。付着は、tRNA分子の3'末端とマーカーのカルボキシル基、またはマーカー付着する結合基及びトランケート型tRNA分子間の共有結合相互作用である。結合基は、ヌクレオチド、短オリゴヌクレオチドまたはその他の類似分子であってもよく、好ましくはジヌクレオチド、さらに好ましくはジヌクレオチドCAである。第三に、マーカーは、検出さらに望ましくは新生タンパク質の分離を容易にする1またはそれ以上の物理的特性を持たなければならない。有用な物理的特性は、発光または吸光、磁性、電子スピン共鳴、電気キャパシタンス(容量)、誘電率、あるいは導電率のような特徴的電磁スペクトル特性を含む。

#### 【0071】

有用なマーカーは、検出用標識、検出用非天然アミノ酸、検出用アミノ酸類似体、及び検出用アミノ酸誘導体と結合された天然アミノ酸である。標識及び他の検出性部分は、強磁性、常磁性、反磁性、ルミネッセント(発光性)、電気化学ルミネッセント、蛍光性、燐光性、染色性であるかあるいは特有の質量を有し得る。マーカーとして有用である蛍光

10

20

30

40

50

部分は、デンシルフルオロフォア、クマリン、クマリン誘導体、蛍光性アクリジニウム部分及びベンゾピランベースのフルオロフォアを含む。好ましくは、蛍光マーカ―は、天然アミノ酸と異なる波長において量子効率の高い蛍光を有し、さらに好ましくは、スペクトルのUV及び可視部分で励起し得る量子効率の高い蛍光を有する。既定の波長で励起時に、このマーカ―は、可視的あるいは従来の蛍光検出法を使用して、低濃度で検出が可能である。ルテニウムキレート化合物及びその誘導体、またはニトロオキシル酸化アミノ酸およびその誘導体のような電気化学ルミネッセントマーカ―は、極めて高い感度を望む際には好ましい (J. DiCesare et al., *BioTechniques* 15: 152~59, 1993)。これらのマーカ―は、フェムトメートル (fermi) 範囲及びそれ以下で検出可能である。

#### 【0072】

蛍光マーカ―の他に、他の特異的物理特性を有する様々なマーカ―を使用して、新生タンパク質生産を検出することができる。一般的に、これらの特性は、マーカ―の電磁場及び光線に対する相互作用及び反応に基づき、UV、電磁スペクトルの可視及び赤外領域、ラマン活性である発色団の存在を含み、さらに共鳴ラマン・スペクトロスコピー (分光法)、電子スピン共鳴活性及び核磁気共鳴、また特定の分子質量を有するマーカ―の存在検出のための質量スペクトロメーター (分光計) によって増強され得る。これらの電磁スペクトル特性は、天然アミノ酸が所有していないもの、あるいは天然アミノ酸特性から容易に識別可能であることが好ましい。例えば、アミノ酸トリプトファンは、290nm近辺に吸光性があり、290nm近辺の光線で励起されると340nm近辺に蛍光発光を有する。従って、トリプトファンと十分に異なる吸光及び/または蛍光特性を有するトリプトファン類似体は、タンパク質中でその検出を容易にするために使用され得る。

#### 【0073】

マーカ―として使用できる多数の異なる修飾アミノ酸が市販されている (Sigma Chemical; St. Louis, MO; Molecular Probes; Eugene, OR)。そのようなマーカ―の一つは、tRNA分子にデンシルフルオロフォアをミスアミノアシル化することによって創作されたN-デンシルリジンである (図5、機構1)。N-デンシルリジンのアミノ基がまずNVOC (オルソ-ニトロペラトリルオキシカルボニル塩化物) によってブロックされ、さらにカルボキシル基がシアノメチルエステルにより活性化される。説明されるようにミスアミノアシル化が行われる。ミスアミノアシル・tRNA分子は次に、タンパク質合成系に導入され、そこでデンシルリジンが新規合成タンパク質中に直接に取り込まれる。

#### 【0074】

他のそのようなマーカ―は、蛍光強度の高い分子クマリンに基づく、蛍光アミノ酸類似体である (図5; 機構2)。このフルオロフォアは、塩化ダンシルよりもさらに高い蛍光量子効率を有し、より低レベルの新生タンパク質の検出を容易にし得る。さらに、このクマリン誘導体は、天然アミノ酸トリプトファンと類似の構造を有する。これらの構造的類似性は、新生タンパク質の本来の構造あるいは機能が重要な場合、またはこれを所望する場合に有用である。クマリンは、図5 (機構2) に描写するように合成される。マロン酸アセトアミドは、ナトリウムエトキシドの存在において、僅かに過剰な4-プロモメチルクマリン (Aldrich Chemicals; Milwaukee, WI) でアルキル化され、その後酸加水分解される。塩酸塩としての対応するアミノ酸は、遊離アミノ酸類似体に転化され得る。

#### 【0075】

クマリン誘導体は、それが酵素的または化学的のいずれかの方法で、トリプトファン-tRNAをミスアミノアシル化する場合に、最も便利に使用できる。ミスアミノアシル化トリプトファン-tRNAの形状で導入される際、クマリンアミノ酸は、トリプトファン位置内のみ取り込まれる。無細胞合成系中のミスアミノアシル・tRNAまたは遊離クマリン誘導体の濃度を調節することにより、新生タンパク質中に取り込まれるクマリンアミノ酸の数をまた調節し得る。この手順は、新生タンパク質中にあるほとんど全てのマーカ―の量を調節するために利用し得る。

#### 【0076】

マーカ―は、天然アミノ酸及び通常ではアミノ酸として機能できないマーカ―特性を有

10

20

30

40

50

する分子から化学的に合成され得る。例えば、蛍光強度の高い分子を天然アミノ酸基に化学的に結合することができる。化学的修飾はアミノ酸側鎖上に生じ、カルボキシル及びアミノ官能性はそのまま残されており、ペプチド結合形成に参与し得る。蛍光強度の高い分子（例：塩化デンシル）は、リジン、アルギニン、チロシン、システイン、ヒスチジン等を含む様々なアミノ酸の親核性側鎖に結合され、主としてアミノ基のスルホンアミドまたは硫酸結合として、蛍光性誘導体を生じ得る。そのような誘導体形成は、ペプチド結合を無傷のまま形成する能力を残し、デンシルリジンのタンパク質中への正常な取り込みを可能とする。

#### 【 0 0 7 7 】

多数の因子が、ミスアミノアシル・tRNAを介して新生タンパク質中に取り込まれるマーカーの有効性を決定する。これらは、細胞または無細胞タンパク質合成系において、ミスアミノアシル・tRNAの使用を介して、タンパク質中にマーカー基を取り込む能力と、新生タンパク質中にいったん取り込まれた際のマーカー固有の検出性を含む。一般的には、優れた特性を有するマーカーは、短いインキュベーション時間、かつ少量の試料で新生タンパク質の正確な検出を可能とする。これらの因子は、説明される方法の有効性を直接的に影響する。新生タンパク質中への取り込みに使用される蛍光マーカーの場合、好ましい特性は、それに限定されるわけではないが、小型、量子効率の高い蛍光、及び長期にわたる露光に対する安定性（抗漂白性）であろう。

#### 【 0 0 7 8 】

上記因子に関する知識をしても、特定の無細胞または細胞翻訳系を使用して、タンパク質中に特定のマーカーを取り込むための最適条件を先験的に予測することは、それがtRNA、開始または延長因子及びリボソーム成分を含むタンパク質翻訳合成系の成分とマーカー基の詳細な相互作用に依存するために困難である。一般的には、小型のマーカーはリボソーム中により容易に収容されることが予測されているが、分子の正確な形状及びリボソーム結合部位におけるその特異的相互作用が最も重要な決定要素である。この理由で、いくつかの大型マーカーが、小型マーカーと比較して、より容易に新生タンパク質中に取り込まれることが可能である。例えば、そのような因子は、分子モデルに関する既知の方法を使用して予測することは極めて困難である。

#### 【 0 0 7 9 】

いくつかの望ましい特性（タンパク質翻訳合成系の成分との望ましい相互作用を含む）を有するメンバーを持つフルオロフォアの一つの群は、ジピロメテンニフッ化ホウ素誘導体（BODIPY）由来の群である（図19）。高量子効率のような好都合な特性を有する様々なその他の通常使用されるフルオロフォアと比較して、いくつかのBODIPY化合物は、タンパク質合成系と高い両立性のあるさらに他の並はずれた特性を有する。全てのBODIPYフルオロフォアのコア構造は、4,4 ジフルオロ -4-ボラ 3a,4a ジアザ s インダセン（4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene）である。米国特許第4,774,339号； 5,187,288号； 5,248,782号； 5,274,113号； 5,433,896号； 5,451,663号を参照のこと。この全てを本明細書に参考文献として編入している。中心的特徴は図19に示すようにジフルオロボロンである。全てのBODIPYフルオロフォアは、マーカーとしてのいくつかの望ましい特性を有し（Molecular Probes Catalog（分子プローブカタログ、p.13~18）、それらは高吸光係数、高蛍光量子効率、溶剤極性及びpHに非感受性であるスペクトル、フルオレセインのような他の色素と比較してより高いピーク強度を生じる狭い発光バンド幅、イオン電荷の不在、フルオレセインと比較して強化された光安定性を含む。基礎BODIPY構造に置換基を加えることは、さらに抱合の追加を起因し、励起または発光波長を、検出の手段と両立可能な都合のよい波長にシフトするために使用され得る。

#### 【 0 0 8 0 】

これらの色素は、Vos de Waal et al.（1977）によって最初に説明され、その蛍光特性はその後、Woriesにより説明された[Wories et al., "A novel water-soluble fluorescent probe Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3', 5'5-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-1,1'-BF.sub.2 complex,

10

20

30

40

50

" (新水溶性蛍光プローブ合成、ルミネッセンス及び4 スルフォナート 3,3',5,5' テトラメチル 2,2' ピロメタン 1,1' BF.sub.2複合体の生物学的特性) Recl. Trav. Chim. PAYSBAS 104, 288 (1985)を参照のこと]。ジピロメテンニフッ化ホウ素由来の色素は、新生タンパク質への取り込みに適切なそれ以上の特徴を有する。フルオロフォア 4,4 ジフルオロ 4 ボラ 3a,4a ジアザ s インダセンの単純アルキル誘導体は、Treibs 及び Kreuzer、[Difluorboryl-komplexe von di- und tripyrrylmethenen、LIEBIGS ANNALEN CHEM 718,208 (1968)] 及び Worries、Kopek、Lodder、及び Lugtenburg、[A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethene-1,1'-BF.sub.2 complex, (新水溶性蛍光プローブ：4 スルフォナート 3,3',5,5' テトラメチル 2,2' ピロメタン 1,1' BF.sub.2複合体のナトリウム塩の合成、ルミネッセンス及び生物学的特性)、RECL. TRAV. CHIM. PAYS-BAS 104, 288 (1985)]により、約490 ~ 510 nmに最大吸光、及び約500 ~ 530 nmに最大発光を有する、フルオレセインと類似のスペクトル特性を有する蛍光強度の極めて高いものとして説明されている。Haugland et al に対する(1988)米国特許第4,774,339号 ('339特許) (本明細書に参考文献として編入されている)は、水素、ハロゲン、アルキル、シクロアルキル、アリル、アリルアルキル、アシル、及びバイオ分子との抱合に適切な反応基を含むスルホ置換誘導体を含み、光安定性が良好で、フルオレセイン様スペクトルを有する、4,4 ジフルオロ 4 ボラ 3a,4a ジアザ s インダセン(ジピロメテンニフッ化ホウ素)色素を説明する。'339特許、及びPavlopoulos, et al., [Laser action from a tetramethylpyrromethene-BF.sub.2 complex (テトラメチルピロメタン BF.sub.2複合体によるレーザー作用) APP. OPTICS 27, 4998 (1988)]により説明されるように、4,4 ジフルオロ 4 ボラ 3a,4a ジアザ s インダセン蛍光色素のアルキル誘導体の発光は、明らかにフルオレセインのそれとオーバーラップする。このオーバーラップは、励起源や光学フィルタを変更することなく、ジピロメテンニフッ化ホウ素のアルキル誘導体に、フルオレセインベース色素に使用する装置と同じ光学装置を使用することを可能とする。同様に、ジピロメテンニフッ化ホウ素中のアリル/ヘテロアリル置換基は、吸光/発光の最大値を高波長へとシフトする(本明細書に参考文献として編入する米国特許第5,451,663号を参照のこと)。

#### 【0081】

様々なBODIPY分子が、アミノアシル・tRNAを誘導体化して、BODIPYマーカ一部分を有するミスアミノアシル・tRNAを生産するために使用し得るアミン反応体として市販されている。検出マーカの新生タンパク質中への取り込みに優れた特性を呈示するこの系統の化合物の一つの実例は、4,4 ジフルオロ 5,7 ジメチル 4 ボラ 3a,4a ジアザ s インダセン(BODIPY-FL)である。BODIPY-FLのスルホン酸化N ヒドロキシスクシンイミド(NHS)誘導体は、E. coli 開始tRNA<sup>fmet</sup>をミスアミノアシル化するために使用される場合、生産された新生タンパク質は、電気泳動後ポリアクリルアミドゲル上で、標準UVトランスイルミネーター及び写真またはCCDイメージングシステムを使用して、容易に検出され得る。これは、まずメチオニンでアミノアシル化して、次にN ヒドロキシスクシンイミドBODIPYを使用して、メチオニンの -アミノ基を特異的に修飾したtRNA<sup>fmet</sup> を使用して達成し得る。修飾反応前に、tRNA<sup>fmet</sup> を、最大電荷(>90%)して、さらに<sup>35</sup>S-メチオニン及び酸 尿素ゲルを使用して確認する[Varshney, U., Lee, C. P., 及び Rajbhandary, U. L. 1991. Direct analysis of aminoacylation levels of tRNA in vitro. (インビトロにおけるtRNAのアミノアシル化度の直接分析) J. Biol. Chem. 266: 24712~24718]。

#### 【0082】

10 nm以下の市販のE. coli 抽出物(E. coli T7翻訳システム、Promega, Madison, WI)が、1 ng以下の合成タンパク質に対応する分析に必要とされる。検出性タンパク質を生産するために必要とされるインキュベーション時間は、約1時間であるが、5分(またはそれ以下)のように短時間であってもよい。BODIPY-FLはさらに、488 nm励起及び520 nm以上の発光測定力を備える市販の蛍光スキャナーを使用することにより、高感度で検出し得る

。NBD (7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール) 及びピリン-PyMPOを含むその他の市販色素を使用する同様な試験は、およそ1次元の蛍光量低下を示し、UVトランスイルミネーターや蛍光スキャナーのような標準実験室用装置を使用して検出することをさらに困難とする。3-N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジオゾール-4-yl)-2,3,-ジアミノプロピオン酸 (NBD-DAP) のような蛍光マーカー及びクマリンを、ミスアミノアシル・tRNAを使用してタンパク質中に取り込むことが可能であることが既に示されている。しかし、これらのマーカーを含む新生タンパク質の検出は、蛍光スペクトロメーターまたはマイクロスペクトルフルオロメーター (蛍光スペクトロメーター) のような高感度を有する器械を使用し、時として蛍光共鳴エノネルギー移動 (FRET) の使用のような間接的方法を必要とする (Turcatti, G.、Nemeth, K.、Edgerton, M. D.、Meseth, U.、Talbot, F.、Peitsch, M.、Knowles, J.、Vogel, H.、及びChollet, A. (1996) J Biol Chem 271(33)、19991~8; Kudlicki, W.、Odom, O. W.、Kramer, G.、及びHardesty, B. (1994) J Mol Biol 244(3)、319~31)。そのような器械は、分子生物学実験室においては一般的に常備されておらず、ゲル上の蛍光バンドの測定用には特定の適応のみが装備され得る。

10

## 【0083】

BODIPY-FLのマーカーとしてのそれ以上の利点は、該マーカーを含む新生タンパク質をアフィニティー精製するために使用し得るモノクローナル抗体が利用可能なことである。そのようなモノクローナル抗体の一例は、抗BODIPY-FL抗体 (カタログ番号A-5770、Molecular Probes、Eugene, OR) である。ミスアミノアシル・tRNAを使用する他の市販マーカーと比較して、高い効率で新生タンパク質中にBODIPY-FLを取り込む能力と組み合わせられたこれ (抗体利用可能性) は、新生タンパク質のさらに効率的な分離を可能とする。BODIPY-FLに対するこれらの抗体は、新生タンパク質中へのBODIPYの取り込みの定量に使用され得る。

20

## 【0084】

アミノアシル・tRNAの機能的活性を実質的に変更することなく、マーカーを特異的に修飾する化学反応を使用することにより、tRNA分子をアミノアシル化またはミスアミノアシル化した後で、マーカーをさらに修飾することができる。アミノアシル化後修飾のこれらのタイプは、検出、分離または精製を容易とし、時には修飾によって新生タンパク質が未変性またはさらなる官能基配置を得ることが可能な場合に使用され得る。

30

## 【0085】

蛍光及び他のマーカーは、スペクトロメーターにより検出され、かつ天然アミノ酸の電磁スペクトル特性から識別し得る検出可能な電磁スペクトル特性を有する。最も有用なスペクトロメーターは、蛍光、ラマン、吸光、電子スピン共鳴、可視、赤外及び紫外スペクトロメーター (分光計) を含む。顕著な電気的特性を有するマーカーのような他のマーカーは、電流計、電圧計または他のスペクトロメーターで検出することができる。マーカーと電磁場の顕著な相互作用に関係するマーカーの物理的特性は、蛍光、ラマン、吸光、電子スピン共鳴スペクトロメーターのような器械を使用して容易に検出できる。マーカーはさらに、外部力または電磁場のような作因またはその検出を可能とする反応体分子に反応して発色の変化のような、化学的、生化学的、電気化学的または光化学的反応も受けることがある。

40

## 【0086】

本発明によって考案される蛍光マーカーの一つの部類は、結合時に検出可能である分子と特異的に結合できる小ペプチドから成る部類である。このアプローチの一例は、WEAAAR EACCRECCARA (配列番号4) から成る配列を有するペプチドである。この配列 (4個のシステイン残基を含む) は、ペプチドが、非蛍光色素分子4',5' ビス (1,3,2 ジチオアルソラン 2 yl) フルオレセイン [4', 5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)] (FLASH、フルオレセイン砒素ヘリックス結合剤を意味する) に特異的に結合することを可能とする。この色素は、結合時に蛍光性となる興味深い特性を有する。言い換えれば、新生タンパク質中にこの特定のペプチド配列が存在するときのみに蛍光が観測される。従って、このペプチ

50

ド配列をNまたはC末端に置くことにより、合成されたタンパク質の量を容易にモニタし得る。このペプチド配列は、このペプチド配列をコードする領域を担うように、核酸プライマーをデザインすることにより導入され得る。

【0087】

使用される蛍光化合物の部類に関わらず、検出は通常は、まず細胞または無細胞タンパク質合成系に存在するその他のバイオ分子から、新生タンパク質を物理的に分離することを含む。タンパク質分離は、例えば、ゲル電気泳動またはカラムクロマトグラフィーを使用して実施することができ、また受容体基に独自の結合するアフィニティーマーカーによりさらに容易とされ得る。ゲル電気泳動によるフルオロフォアを含むマーカの検出は、従来の蛍光検出法を使用して達成し得る。

10

【0088】

無細胞系におけるタンパク質合成後、タンパク質合成に必要とされるバイオ分子の全てと新生タンパク質を含む反応混合物を、ポリアクリルアミドまたはアガロースから成るゲル上に装填する(R.C. Allen et al., Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins (タンパク質のゲル電気泳動及び集中電気泳動法) Walter de Gruyter, New York 1984)。本混合物はさらに、非電荷tRNAとミスアミノアシル・tRNAも含む。反応混合物を装填した後、電圧をかけることによりゲル上のタンパク質を加えた電場方向に空間的に分離する。タンパク質は分離して、クーマシーブルー染色のようなゲル前後に染色法を使用して目視観察し得る分散、またはオーバーラップするバンドのセットとして出現する。ゲル上でのタンパク質バンドの移動は、タンパク質分子量と、減少分子量の関数である装填位置からの増加距離の関数である。新生タンパク質を含むゲル上のバンドは、適切な波長で励起されると、蛍光を呈する。これらのバンドは、可視、写真、または分光学的に検出が可能であり、さらに必要に応じて、新生タンパク質をゲル切片から精製し得る。

20

【0089】

例えば、BODIPY-FLをマーカーとして使用する場合は、新生タンパク質は、UV照射によって励起すると、510 nmで蛍光を発する。この蛍光は、単に標準把持式UVイルミネーターまたはトランスイルミネーターを使用することにより、可視的に検出され得る。約10ナノグラム (ng) のタンパク質ヘモリジンは、この方法を使用して検出できる。さらに、低温CCDイメージャーに基づく蛍光スキャナーのような、極めて低濃度のマーカーを迅速にスクリーンかつ同定し得る電子イメージング装置が有用である。この場合は、最低0.3 ngのタンパク質までが検出され得る。

30

【0090】

新生タンパク質の分子量及び量は、蛍光標識された既定分子量を有するタンパク質のバンドのセットと、ゲル上のバンド位置の比較により決定し得る。例えば、分子量25,000である新生タンパク質は、既定量かつ既知分子量(ウシ血清アルブミン、66 kD; ブタ心臓フマラーゼ、48.5 kD; カルボニックアンヒドラーゼ、29 kD;  $\alpha$ -ラクトグロブリン、18.4 kD;  $\beta$ -ラクトグロブリン、14.2 kD; Sigma Chemical; St. Louis, MO)の市販標準マーカータンパク質を含む較正ゲルに対するゲル上の相対的位置によって測定することができた。

【0091】

較正タンパク質はまた、新生タンパク質を担うゲルと同様な方法を使用する検出に便利な類似したマーカーを含み得る。これは、多くの場合、較正タンパク質をマーカーと類似な分子と直接反応させることにより達成し得る。例えば、蛍光誘導体を得るように、較正タンパク質を塩化ダンシルで修飾し得る(R.E. Stephens, Anal. Biochem. 65, 369~79, 1975)。他方、タンパク質をBODIPY-FLのNHS誘導体で標識することもできる。これらの蛍光タンパク質は、PAGEを使用して分析し得る。蛍光較正タンパク質の検出を蛍光マーカー類似体を含む新生タンパク質の検出と組み合わせることにより、合成された新生タンパク質の分子量及び量のどちらも正確に測定できる。必要に応じて、正確に定量するために、較正タンパク質及び新生タンパク質それぞれに含まれるマーカーの量を決定し得る。新生タンパク質を担うゲルの定量のためには、既定レベルの蛍光マーカーを有するタンパク

40

50

質の使用が好都合である。これは、較正タンパク質がシステインのような特定の反応残基を含み、従ってタンパク質当たり1つの蛍光色素のみが付着するように遺伝的操作を行うことにより達成され得た。

#### 【0092】

タンパク質分離のその他の方法はさらに、マーカを含む新生タンパク質の検出、かつその後の分離と精製に便利である。例えば、タンパク質は、毛管電気泳動、集中電気泳動法、低圧クロマトグラフィー及び高速または高圧液体クロマトグラフィー（HPLC またはFPLC）を使用して分離することができる。これらの場合は、個別のタンパク質は、マーカ-の発光波長で、蛍光検出器によって個別に分析され得る分画に分離される。他方、オンライン蛍光検出法が、新生タンパク質がカラム分別システムから出てくる際に検出するために使用され得る。保持時間の関数としての蛍光グラフは、生産された新生タンパク質の量及び純度に関する情報を提供する。

10

#### 【0093】

本発明による他の実施態様は、前記に説明するように、切断可能なマーカを含む新生タンパク質の標識、検出、さらに必要に応じて、分離と精製のための方法を指示する。切断可能なマーカは、物理あるいは酵素処理、化学または温度処理、ガンマ線、X線、紫外線、可視光線、赤外線、マイクロウェーブ、ラジオ波または電場のような電磁放射のような外部効果に感受性のある化学構造を含む。マーカは、前記のように従来の技術を使用して、tRNAにアミノアシル化、またはミスアミノアシル化されて、翻訳系に加えられる。インキュベーション及び新生タンパク質の生産後、マーカは特定の処理を加えることにより切断され、新生タンパク質が検出され得る。他方、新生タンパク質はまた、切断されたマーカあるいはマーカから取り除かれた化学的部分の存否によって、検出及び分離され得る。

20

#### 【0094】

切断可能なマーカ-の一例は、2-ニトロベンジル部分を含む化合物（図6A）のような光開裂型マーカ-である。照射時に、これらの芳香族ニトロ化合物は、内部酸化還元反応を受ける（Pillai, Synthesis 1~26、1980；Patchornik et al., J. Am. Chem. Soc. 92: 6333~35、1970）。その結果、ニトロ基はニトロソ基に還元され、酸素がオルソ位置にあるベンジルC-H結合中に挿入される。主要な光化学プロセスは、励起ニトロ基による分子内水素引抜反応である。これに、酸-ニトロ型（aci-nitro form）への電子リディストリビューションプロセスが引き続き、ニトロソ産物に再転位される。後続する温度反応は、ニトロベンジル結合（図6B）から基質の切断を誘導する。他の切断可能なマーカ-の実例を図7に示す。

30

#### 【0095】

時には、基質と切断可能部分の間に距離を置くことが望ましいことがある。これを達成するために、クロスリンカーアームによって、切断可能部分を基質から分離し得る。クロスリンカーは、基質アクセスを増加し、化学的構造を安定化し、また例えば、長いアルキル鎖、またはアミド結合を介して結合されているカプロイル部分から成る複数反復ユニットを使用して作製し得る。

#### 【0096】

40

切断可能なマーカ-合成には、異なるマーカ-の数と同じほど多数の方法がある。ニトロベンジルアルコール基材の光開裂型ビオチン合成の一例は、4つの主要なステップを含む。光反応部分の前駆物質である2-プロモ-2'-ニトロアセトフェノンは、まず-または-アミノ酸様-アミノカプリン酸に転化される。結果生じる酸と光反応基であるアミノ官能基は、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）を使用して結合される。結果生じるアミドのベンズイルカルボニル基は、水素化ホウ素ナトリウムを使用して還元される。その結果生じるニトロベンジルアルコール誘導体は、バイオ分子構造と反応できるような最終成分を得るために、例えば、塩化ギ酸官能基を誘導するために、ホスゲンガスによる反応により、誘導体化される。結果生じる化合物を、PCBのその他の誘導体と共に、図8Aに描写する。アミノ酸への可能な結合は図8Bに描写する。

50

## 【0097】

切断可能なマーカーは、新生タンパク質の分離を容易にする。例えば、切断可能なマーカーの一つのタイプは、アミノ酸と結合する光開裂型ビオチンである。このマーカーは、新生タンパク質中に取り込まれ、さらにこのタンパク質はビオチンとアビジンまたはストレプトアビジンとの特異的相互作用により精製され得る。分離とそれに引き続く精製に際して、ビオチンは、電磁放射を加えることにより除去され、付着するビオチン分子に起因する問題なく、新生タンパク質は有用な適用に利用された。切断可能なマーカーのその他の事例は、光開裂型クマリン、光開裂型ダンシル、光開裂型ジニトロフェニル及び光開裂型クマリン・ビオチンを含む。光開裂型マーカーは、UV光線のような電磁放射によって切断され、ペプチジルマーカーは酵素処理により切断され、さらにジスルフィド結合によ

10

## 【0098】

光開裂型マーカーによる切断は、光反応部分の構造及び照射に使用される電磁照射の波長に依存する。電磁放射の他の波長が、タンパク質や他の化学的部分を損傷してはならない。非置換2-ニトロベンジル誘導体の場合は、光分解による収量及び基質の回収は、内部光フィルタとして作用し、さらに基質のアミノ基と反応可能である副産物の形成により顕著に低下する。典型的な照射時間は、1～約24時間と変化し、収量は1～95%である。線源は、基質タンパク質の約10 cm以内に配置し、新生タンパク質中に出現する副反応があるとすれば、最少とするように低電力に設定する。置換2-ニトロベンジル誘導体(メチル、フェニルなど)の場合、光除去の比率と遊離基質の収量に相当な増加が観察される。光反応部分のフェニル環へのその他の電子ドナー基の導入は、基質収量を増加する。PCBの光分解の一般的反応を図9に描写する。

20

## 【0099】

酵素的切断では、導入されたマーカーは、化学的物質から成る特有の酵素に対して感受性のある特定の結合を含む。タンパク質混合物中への酵素または化学物質の導入は、新生タンパク質からマーカーを切断する。マーカーが修飾アミノ酸である場合、これは天然タンパク質形状の生産を起因することになる。例えば、熱感受性のある化学的部分の熱処理は、同様な方法で行われる。マイクロウェーブまたは放射熱のような温度エネルギーの穏やかな適用は、新生タンパク質に顕著な損傷を生じることなく、タンパク質から感受性マ

30

## 【発明を実施するための形態】

## 【0100】

## A. 突然変異の検出

突然変異の検出は、ガンの診断及び/またはガンの素因を有する個人を含む、しかしこれに限定はされない、臨床診断において益々重要な領域となっている。タンパク質トランケーション試験(PTT)は、トランケート型タンパク質産物の発生を誘導するナンセンス及びフレームシフト突然変異検出用手法である。デュシェンヌ筋ジストロフィ、腺腫性多発結腸ポリープ症、ヒトmutL同族体、ヒトnutS同族体(どちらも結腸ガンに関連する)、及びBRAC1(家族性乳ガン)に関連する遺伝子は、今では他の疾患と共に、この方法によ

40

## 【0101】

【表1】

ヒト分子遺伝学におけるPTTの適用

参照疾患	%トランケート型突然変異	遺伝子
家族性腺腫性ポリープ症	95%	APC
遺伝性靱帯様疾患 (hereditary desmold disease)	100%	APC
毛細管拡張性失調症	90%	ATM
遺伝性乳ガン及び 卵巣ガン	90% 90%	BRCA1 BRCA2
嚢胞性線維症	15%	CFTR
デュシェンヌ筋ジストロフィ	95%	DMD
エメリ・デュライファス筋ジストロ フィ	80%	EMD
ファンconi貧血症	80%	FAA
ハンター症候群	-50%	IDS
遺伝性非ポリープ性結腸・直 腸ガン	-80% -70%	hMSH2 hMLH1
神経線維腫症 1型	50%	NF1
神経線維腫症 2型	65%	NF2
多嚢胞性腎臓疾患	95%	PKD1
ルビンスタイン・ティビ症候群	10%	RTS
<i>PTTを使用して検出可能であるべき、報告済みトランケート型突然変異の比率</i>		

10

20

30

典型的に、PTT法は、調査する遺伝子の領域をカバーするPCR産物中への、T7プロモーター部位、リボソーム結合部位、及び人工的メチオニン開始部位の取り込みを含む。PCR産物は次に、インビトロウサギ網状赤血球溶解物またはコムギ胚芽溶解物系を使用して、転写かつ翻訳され、増幅された遺伝子領域に対応するタンパク質を発生する。ナンセンス突然変異またはフレームシフトにより生じた配列中の終止コドンの存在は、タンパク質翻訳の時期尚早な終了を起因し、放射性検出を組み合わせた標準ゲル電気泳動(例: SDS-PAGE)分析によって検出し得るトランケート型タンパク質を生産する。

## 【0102】

現在実用されている手法には欠点がある。最も重要な問題の一つは、所望する産物の同定を含む。非特異的に放射性標識された産物のために、これ(同定)は困難となる。これらの問題を提起する試みが行われてきた。一つのアプローチは、開始部位の後かつ所望の遺伝子をコードする領域の前にアフィニティタグを導入することである。Rowan及びBodmerによる "Introduction of a myc Reporter Tag to Improve the Quality of Mutation Detection Using the Protein Truncation Test (タンパク質トランケーション試験を使用する突然変異検出の質向上のためのmyc レポーターTagの導入)" Human Mutation 9: 172 (1997)を参照のこと。しかし、そのようなアプローチは、依然として電気泳動に依存するという不利な点を有する。

40

## 【0103】

本発明は、2または3マーカーを新生タンパク質中に導入する、ゲルフリートランケー

50

ション試験(GFTT)を考案する。本発明は、疾患の素因を決定するための出生前及び出生後試験を考案する。本発明による好ましい実施態様では、新組成物及び方法は、フレームシフトまたは鎖終止突然変異を指示する。そのような突然変異を検出するためには、新生タンパク質は、まず突然変異の可能性を含むタンパク質をコードするメッセンジャー-TNAまたはDNAから、無細胞または細胞翻訳系において合成される。新生タンパク質は、タンパク質のN末端またはその近隣に位置するアフィニティーマーカーを使用して、次に無細胞または細胞翻訳系から分離される。

#### 【0104】

タンパク質を次に、タンパク質のN末端またはその近隣に位置する検出マーカー（N末端マーカー）の存在について分析する。次に、タンパク質のC末端またはその近隣に位置する配列依存性検出マーカー（C末端マーカー）上で別の測定を行う。

C末端マーカーとN末端マーカーからの測定値の比較は、新生タンパク質をコードする遺伝子配列中にあるフレームシフトまたは鎖終止突然変異を含む新生タンパク質の分画についての情報を供給する。C末端部近隣に位置する配列依存性マーカーのレベルは、鎖終止またはフレーム外突然変異を含まないタンパク質分画を反映する。N末端マーカーの測定は、C末端マーカーが正規化された測定に対する内部対照を供給する。C末端マーカーレベルをN末端マーカーに対して正規化することは、実験の正確性を損ない得る、翻訳中のタンパク質発現レベルにおける変化のような本質的な変異を排除する。タンパク質のN末端部またはその近隣に位置するアフィニティーマーカーを使用して、翻訳混合物からタンパク質を分離することは、翻訳中にタンパク質が、メッセージのコード領域にある内部AUGから開始される場合に生じ得るフォールススタート（不正開始）の出現を排除する。フォールススタートは、鎖終止またはフレーム外突然変異後に起こり得るために、誤った結果の原因となり得る。これは、内部AUGがメッセージを有するフレーム内にある場合特に真実である。この場合、メッセージが突然変異を含んでいても、ペプチドC末端マーカーは依然として存在する。

#### 【0105】

一つの実例では、非天然アミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む検出マーカーが、タンパク質合成の開始をシグナルするAUG開始コドンのみを認識するミスアミノアシル・開始tRNAを使用して、翻訳中にアミノ末端（N末端部）において新生タンパク質中に取り込まれる。検出マーカーの一例は、蛍光度の強い蛍光化合物BODIPY FLである。マーカーはさらに、光開裂型クマリンまたは光開裂型ビオチンのような光開裂性であってもよい。新生タンパク質は、次にタンパク質のN末端に隣接して位置するアフィニティーマーカーに結合する共役因子を使用して、無細胞または細胞翻訳系から分離される。そのようなアフィニティーマーカーの一つは、エピトープとして知られている特定のタンパク質配列である。エピトープは、受容体基を含む分子及び/または物質と選択的に相互作用するという特性を有する。様々なエピトープ配列が文献に報告されており、それらは、ClonTechにより説明されるHisX6 (HHHHHH) (配列番号5)、及びRoche-BMにより説明されるC-myc (-EQKLISEEDL) (配列番号6)、Stratageneにより説明されるFlag (DYKDDDDK) (配列番号7)、Sigma-Genosysにより説明される SteptTag (WSHPQFEK) (配列番号8) 及びRoche-BMにより説明されるHA Tag (YPYDVPDYA) (配列番号9) を含む。

#### 【0106】

いったん新生タンパク質が翻訳系から分離されると、タンパク質のN末端部位に取り込まれた検出マーカーの存否について分析される。BODIPY FLの場合は、488nm 励起及び520nm 以上の光線を検出器に透過させるような発光フィルターを備えたMolecular Dynamics Model 595 蛍光スキャナーのような様々な市販器械を使用して蛍光レベルを測定することにより検出され得る。

#### 【0107】

タンパク質は次に、タンパク質のC末端部近隣に位置する配列特異性マーカーの存在について分析される。通常使用では、そのような配列特異性マーカーは、共役因子により認識されるタンパク質のC末端部近隣に位置するアミノ酸の特異的配列から成る。例えば、

新生タンパク質noC末端部またはその近隣に位置するアミノ酸に対する抗体を利用し得る。そのような抗体は、容易に検出し得る蛍光色素及び容易に検出可能である基質を導出する検出反応を触媒する酵素を含む、様々なマーカーによって標識され得る。選択されたマーカーは、N末端マーカーに使用されるそれとは異なる検出特性を有するべきである。アミノ酸配列はさらに、抗体の他に共役因子によって認識されるエピトープを含み得る。そのような配列の一つは、6つのヒスチジンであり、時にはコバルト複合体共役因子と結合するhisタグとして言及されている。

**【0108】**

本実施態様に使用できる様々なN末端マーカー、アフィニティマーカー、C末端マーカーが入手可能である。N末端マーカーはBODIPY、アフィニティマーカーはStrepTag、さらにC末端マーカーはHisX6 tagであり得る。この場合は、翻訳後に、反応混合物をストレプトアビジンをコートしたマイクロ滴定プレート内でインキュベートするか、またはストレプトアビジンをコートしたビーズを加えてインキュベートする。非結合物質を洗浄後、N末端マーカーは蛍光スキャナーを使用して直接に測定し、C末端マーカーは、BODIPYと異なる光学特性を有する蛍光色素（ローダミンまたはテキサスレッド）を抱合させた抗hisX6抗体を使用して定量することができ、従って両方の同時検出を容易にする。

10

**【0109】**

異なる実例では、N末端マーカーは、ミスアミノアシル・tRNAによって取り込まれたピオチンまたは光開裂型ピオチンであり、アフィニティマーカーはHisX6 tag、C末端マーカーはC-mycマーカーであり得る。この場合は、翻訳後、反応混合物は、金属キレートビーズを加えてまたは金属キレート加工したマイクロ滴定プレート（例：Talon、ClonTech）内でインキュベートされる。非結合タンパク質を洗浄後、ストレプトアビジン抱合蛍光色素及びその他の蛍光色素を抱合したC-myc抗体を使用して、プレートまたはビーズに検出反応を行う。さらに、ペルオキシダーゼと抱合した抗体を使用して、化学ルミネッセント検出法も使用することが可能である。

20

**【0110】**

N末端マーカー、アフィニティマーカー、さらにC末端マーカーは、全てエピトープを含むことが可能で、これは新生タンパク質をコードするメッセージまたはDNAが特定のエピトープに対応する核酸配列を有するようにデザインすることによって、新生タンパク質中に取り込まれ得ることは、分子生物学及び生化学領域の当業者には理解されるであろう。これは、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）を使用する、新生タンパク質をコードするDNA中に所望する核酸配列を取り込むプライマーのデザインのような既知の方法を使用して達成し得る。N末端マーカー及びC末端マーカーの両方を検出するために使用し得る、広く様々な検出方法が利用可能であることは、タンパク質生化学分野の当業者には理解されるであろう。その他の実例は、非化学ルミネッセント基質を化学ルミネッセント産物に転化する酵素が、特定のエピトープに対する抗体に抱合される、化学ルミネッセンスアッセイの使用を含む。

30

**【0111】**

このアプローチによる一例は、ルミネッセントマーカーを測定するためにルミノメーターを使用することに基づく。ピオチン検出マーカーは、ミスアミノアシル・tRNAを使用して、N末端に取り込まれる。ピオチンは、ウミシイタケ（sea pansy）由来のRenillaルシフェラーゼに抱合されるストレプトアビジンを使用することにより検出される。C末端配列は、ホタルルシフェラーゼに付着された結合因子と相互作用するエピトープを含む。タンパク質のN末端部近隣に位置する独特なエピトープを使用することによる新生タンパク質の分離後、タンパク質を、Promega Corpにより説明される手技及びDual-Luciferase（登録商標）レポーターアッセイとして知られる手順に基づくデュアルルミネッセント・ルシフェラーゼアッセイ（二重発光ルシフェラーゼアッセイ）にかける。このアッセイは、まずPromega Corp.から市販のルシフェラーゼアッセイ試薬IIを分離された新生タンパク質に加え、次に化学ルミネッセンスレベルを測定することから成る。次に、同時にホタルルミネッセンスを消し、Renilla ルミネッセンスを活性化する、Stop & Glo（登録商標

40

50

) 試薬を加える。ルシフェラーゼアッセイを実施して、秒単位で定量することができる。ホタルとRenillaルシフェラーゼから測定されたルミネッセンスレベルの比較は、新生タンパク質のコードされたメッセージ中に突然変異が存在するか否かの徴候を提供する。

【0112】

その他の実例では、N末端マーカは、ミスアミノアシル・tRNAを使用することにより、翻訳中にタンパク質のN末端部に取り込まれたアフィニティーマーカを含む。アフィニティーマーカは共役因子と相互作用し、新生タンパク質を翻訳混合物から分離するために作用する。新生タンパク質はまた、タンパク質のN末端に隣接または近隣に位置する、アフィニティーマーカを含む検出マーカを含む。さらに、それはタンパク質のC末端部またはその近隣に配列特異性マーカを含む。新生タンパク質のN末端及びC末端部近隣にある検出マーカを次に測定して、鎖終了またはフレーム外突然変異の存否を検出するために比較する。

10

【0113】

様々な他のアフィニティーマーカ、N末端マーカ及びC末端マーカが、本実施態様のために利用可能である。アフィニティーマーカは、ビオチン、または光開裂性ビオチンであり、N末端マーカはStepTag、さらにC末端マーカはC-mycエピトープであり得る。この場合は、翻訳後に、反応混合物を、ストレプトアビジンでコートされたビーズを加えてまたは、ストレプトアビジンでコートされたマイクロ滴定プレートでインキュベートする。非結合タンパク質の洗浄後、蛍光色素(ローダミンまたはテキサスレッド)を結合させた抗hisX6抗体、及びBODIPYのような他の蛍光色素を結合させたC-myc抗体を使用して、プレートまたはビーズに検出反応を行う。さらに、ペルオキシダーゼと結合された抗体を使用して、化学ルミネッセント検出法を使用することも可能である。ペルオキシダーゼ結合抗体の場合でさえ、蛍光性基質を使用することができ、蛍光イメージャーのような装置を使用して、N末端及びC末端標識を定量することができる。

20

【0114】

最適効果を得るためには、N末端マーカ及びアフィニティーマーカは、タンパク質のN末端部にできるだけ近接して配置されるべきである。例えば、N末端マーカがミスアミノアシル開始因子を使用して取り込まれる場合、それはN末端アミノ酸に位置する。この場合、アフィニティーマーカは、N末端マーカにすぐ隣接して位置するべきである。従って、メチオニンに結合されるBODIPYから成るBODIPYマーカが、ミスアミノアシル開始tRNAにより取り込まれると、StepTag (WSHPQFEK) (配列番号8)のようなエピトープ配列が次に続くはずであり、従って全N末端配列は、BODIPY-MWSPQFEK (配列番号10)となるであろう。10)。しかし、特別の場合は、N末端マーカとアフィニティーマーカまたはアフィニティーマーカに結合する共役因子間の相互作用を回避するために、BODIPY-Mとエピトープ配列間に介在アミノ酸を加えることは好都合となり得る。そのような相互作用は、N末端マーカ、アフィニティーマーカ及び共役因子の性質に依存して変化する。

30

【0115】

最適効果を得るためには、C末端マーカは、タンパク質のC末端部にできるだけ近接して配置されるべきである。例えば、His-X6 tagが使用される場合、タンパク質配列は6 Hisで終止する。ある場合は、エピトープは、新生タンパク質の特性を最適化するために、タンパク質C末端部の数残基前に位置し得る。これは、例えば、特定のアミノ酸配列が、溶解度または疎水性のような望ましい新生タンパク質の特定の特性を修飾するために必要である場合に起こる。

40

【0116】

本方法の通常適用では、正常メッセージから翻訳された新生タンパク質のN末端及びC末端マーカの測定レベルの比率を、標準正規化比を計算するために使用し得る。突然変異を含み得るメッセージの場合は、この標準比からの偏差を突然変異の度合いを予測するために使用し得る。例えば、全てのメッセージが欠落している場合は、N末端マーカに対するC末端マーカの比率はゼロであると予測される。他方、全てのメッセージが正常で

50

ある場合は、比率は1であると予測される。メッセージの半分のみが欠落している場合、例えば、鎖終止またはフレーム外読み取りエラーを起因する特定の遺伝的欠損についてヘテロ接合体である患者では、比率は1/2である。

【0117】

鎖終止またはフレーム外突然変異を検出するための既存の手法と比較して、本方法にはいくつかのユニークな利点がある。普通では、そのような突然変異は、従来のDNA配列法を使用して、疑われる遺伝子の全配列を分析することによって検出される。しかし、そのような方法は時間を要し、高価で、多数の試料についての迅速なスループットアッセイには適切ではない。これに変わる方法は、ゲル電気泳動を利用することであり、これは新生タンパク質の予測されるサイズから変異を検出することが可能である。このアプローチは、しばしばタンパク質トランケーション試験として言及されるが、ミスアミノアシル・tRNAによる検出マーカーの取り込みのような非放射性標識法を使用することにより可能なる。しかし、ハイスループットスクリーニングのような、多くの状況において、時間を要する（典型的には60～90分）ゲル電気泳動の使用を避けることが望ましい。本方法においては、ゲル電気泳動を実施する必要性が排除される。さらには、このアプローチは、蛍光性、ルミネッセントまたはその組み合わせであり得る分離された新生タンパク質由来の2つの検出シグナルの比較に依存するために、極めて自動化し易い。

10

【0118】

タンパク質のC末端部近隣に位置する配列依存性マーカーの測定は、フレームシフトまたは鎖終止突然変異のいずれかの存在についての情報を提供し、それはいずれかが存在すると不正確な配列を起因することに拠る。N末端マーカーの測定は、C末端マーカーが正規化された測定に対する内部対照を供給する。C末端マーカーレベルをN末端マーカーについて正規化することは、実験の正確性を損ない得る翻訳中のタンパク質発現レベルにおける変化のような本質的な変異を排除する。タンパク質のN末端部またはその近隣に位置するアフィニティマーカーを使用して、翻訳混合物からタンパク質を分離することは、タンパク質が翻訳中にメッセージのコード領域にある内部AUGから開始される場合に生じ得るフォールススタート（不正開始）の出現を排除する。フォールススタートは、鎖終止またはフレーム外突然変異後に起こるために、誤った結果の原因となり得る。これは、内部AUGがメッセージを有するフレーム内にある場合に特に真実である。この場合、メッセージが突然変異を含んでいても、ペプチドC末端マーカーは依然として存在する。

20

30

【0119】

B. レポーター基

本発明による他の実施態様は、系から成分を分離することなく、細胞または無細胞タンパク質合成系における新生タンパク質の合成をモニタするための方法を指示する。これらのマーカーは、いったん新生タンパク質中に取り込まれると、溶液中に遊離またはtRNAと結合されているマーカーから識別可能である。このタイプのマーカーは、レポーターとも称されるが、細胞または無細胞翻訳系において直接に新生タンパク質の合成を検出及び定量するための手段を供給する。

【0120】

米国特許第5,643,722号（本明細書に参考文献として編入）に既に説明されているレポーターの一つのタイプは、タンパク質合成系によって、いったん新生タンパク質中に取り込まれると、その物理的または生理化学的特性の少なくとも一つが変化を受けるという特徴を有する。結果生じる新生タンパク質は、タンパク質合成系をその成分に分離したり、部分的に精製することなく、リアルタイムで、合成系内において独自検出され得る。このタイプのマーカーは、タンパク質合成系中に既存のタンパク質から最初に新生タンパク質を分離する必要なく、その生産をモニタするための便利な非放射性方法を供給する。レポーターマーカーはまた、タンパク質発現中の異なる時期に、その特性が互いに識別可能な複数のマーカーを加えることにより、タンパク質合成中の異なる時期に生産される、異なる新生タンパク質の検出及びその識別のための手段も供給する。これは、分化遺伝子発現研究のための手段を供給する。

40

50

## 【 0 1 2 1 】

レポーター利用の一例を図10に概略表示する。tRNA分子は、モニタ及び励起のための特定波長では、弱い蛍光性を有するかまたは蛍光性のないレポーター(R)でミスアミノアシル化される。このミスアミノアシル・tRNAは、次に細胞または無細胞タンパク質合成系中に導入され、レポーター類似体を含む新生タンパク質が徐々に生産される。新生タンパク質中にレポーターが取り込まれると(R\*)、既知の波長において蛍光の増加を呈する。新生タンパク質の漸次な生産は、特定波長において蛍光の増加を検出することによりモニタされる。

## 【 0 1 2 2 】

レポーターの化学的合成は、化学的部分の結合、あるいは天然アミノ酸残基を有するレポーター特性を持つ分子成分に依存し得る。その環境に感受性があり、発光光線の波長は蛍光収量の変化を受ける多数の蛍光分子がある。アミノ酸と結合されている、これらの化学的部分が、合成タンパク質中に取り込まれると、バルク水性媒質とタンパク質内部間の差異が、水分へのアクセスの低下、電荷イオン基への曝露、易動度の低下、及び周囲媒質の誘電率の変化を生起し得るために、その環境が変更される。そのような2つの実例を図11Aに示す。

## 【 0 1 2 3 】

レポーター分子の一例は、蛍光性アクリジニウム部分に基づき、マイクロ環境の極性または粘度に応じて、その発光特性が変化するというユニークな特性を有する。それは、疎水性環境及び/または粘度に曝されると、量子効率のより高い蛍光を有する。レポーター自体が疎水性であるため、増殖新生ポリペプチド中への取り込み後、レポーターは新生タンパク質の疎水性コアと会合すると思われる。蛍光強度の増加は、翻訳系のタンパク質合成活性の直接的計測法である。しかし、タンパク質中において各レポーター残基の環境は異なり、またある場合は、レポーターはタンパク質表面上に存在して水性媒質に曝されることがあり、タンパク質中に取り込まれたレポーターの総分光特性にネットとしての変化がバルク水性媒質に関連して起こる。タンパク質中のレポーターのサブセットのみに関する分光特性の変化は、そのようなレポーターを取り込むタンパク質合成の検出には十分である。

## 【 0 1 2 4 】

その他のアプローチは、必ずしもその環境の変化への応答としてではなく、ペプチド結合形成時にその蛍光特性を変化するレポーターを利用することである。レポーターは、無細胞抽出物において異なる環境を分割するため、レポーター蛍光の変化は、新生タンパク質中へのレポーターの取り込みに際する蛍光の変化と比較して大きなシグナル変化を生じない。

## 【 0 1 2 5 】

レポーターの第2の実例は、6,7-(4', 5'-プロリノ)クマリン[6,7-(4', 5'-prolino) coumarin]のようなクマリン基材のマーカーである。この化合物は、ペプチド結合形成後に、フルオロフォアがその発光及び吸光特性を変更するように、クマリンのようなフルオロフォアをアミノ酸構造エレメントと結合することにより、化学的に合成し得る。例えば、二次アミノ官能基を含むプロリン環は、正常一次アミノ基と同様にペプチド結合形成に参与する。既存のフルオロフォアに関して新しく形成されたペプチド基の共平面性のために、蛍光の変化が生じる。これは、窒素孤立電子対の電子及びペプチド結合のカルボニル基のために、抱合/脱局在化を増加する。そのような化合物の合成は、アセト酢酸エチルを使用する、クマリン合成に基づく(図11C)。

## 【 0 1 2 6 】

レポーターは、タンパク質中に取り込まれる際にその蛍光特性を変化するそれらの非天然アミノ酸に限定はされない。これらはまた、電磁スペクトルのUV、可視および赤外領域における特定の吸光バンドの変化、ラマン活性で、共鳴ラマンスペクトロスコーピー、電子スピン共鳴活性、及び核磁気共鳴によって強化され得る発色団を含む他の電磁または分光特性において変化を受ける分子から合成され得る。一般的には、レポーターは、電磁場

10

20

30

40

50

及び放射への相互作用及び反応が、新生タンパク質中への取り込み後に変化を受ける分子成分から形成され得る。

【0127】

本発明においては、レポーターはさらに、同一新生タンパク質中に取り込まれている、またはタンパク質が発現されている反応チャンバーに存在する他のマーカー及び因子との相互反応のために、その物理的または生化学的特性の少なくとも一つに変化を受けることがある。2つの異なるマーカーの互いの相互作用が、特に検出性の原因となる。相互作用の一つのタイプは、2つのマーカーが約1オングストローム(A)~約50 A、好ましくは約10 A以内の距離内にある場合に生じる共鳴エネルギー移動である。この場合、電磁放射を有する一つのマーカーの励起が、検出可能な異なる波長で、第二マーカーの電磁放射放出を起因する。相互作用の第二のタイプは、マーカーが約5 A以内にある場合にのみ生じる、2つの異なるマーカー間の電子伝達に基づく。第三の相互作用は、2つのマーカー間の光化学的反応であり、蛍光のような検出特性を有する新種を生産する。これらのマーカーはまた、新生タンパク質中への取り込みに使用されるミスアミノアシル・tRNA上に存在し得るが、マーカーの相互作用は、主として、その近位性のためにタンパク質中に取り込まれた時に生じる。ある場合は、タンパク質中の2つのマーカーの近位性は、タンパク質の一次、二次、または三次構造のいずれかにおいて、互いに近接する位置にマーカーを取り込むtRNA種を選択することにより強化され得る。例えば、チロシン tRNA及びトリプトファン tRNAは、ユニークな隣接対チロシン トリプトファンを含むタンパク質配列において、2つの異なるマーカーが互いに近接する可能性を高めるために使用することができる。

10

20

【0128】

本方法による一つの実施態様では、共役因子と結合する際に、レポーター基が第二マーカーまたは因子と相互作用して、それらを特に検出可能にするように、ミスアミノアシル・tRNAを使用して、レポーター基が新生タンパク質中に取り込まれる。そのような相互作用は、いったん特定のアフィニティー要素が共役因子と相互作用すると、レポーター基と第二マーカー間の相互作用を最適化するように、特定のアフィニティー要素を新生タンパク質中に取り込むことにより最適化し得る。そのようなアフィニティー要素は、エピトープまたは非天然アミノ酸を形成する特定のアミノ酸配列を含む。一つの実例では、レポーター基は、ミスアミノアシル・tRNAを使用することにより、新生タンパク質のN末端部に

30

【0129】

都合よく使用されるマーカー間相互作用の一つのタイプは、2つのマーカーが約1オングストローム(A)~約50 A、好ましくは約10 A以内の距離内にある場合に生じる蛍光共鳴エネルギー移動を起因する。この場合、電磁放射を有する一つのマーカーの励起が、検出可能な異なる波長で、第二マーカーの電磁放射放出を起因する。これは、例えば、E. coli 開始tRNA<sup>fmet</sup>を使用して、タンパク質のN末端部に蛍光マーカーを取り込むことにより達成され得た。Sigma-Genosysにより説明されるStreptTag (WSHPQFEK) (配列番号8)のようなエピトープが次にN末端近辺に取り込まれる。ストレプトアビジンを次に既知の方法を使用して、第一マーカーによって効率よく蛍光エネルギー移行を受けると選択された第二蛍光マーカーと抱合する。このプロセスの効率は、2つのマーカーのスペクトル特性に依存するフォスターエネルギー移行半径(Forster energy transfer radius)を計算することにより測定し得る。マーカー・ストレプトアビジン複合体が次に翻訳混合物中に導入される。新生タンパク質StreptTagエピトープとストレプトアビジンの特異的相互作用のために、新生タンパク質が生産された時のみ、第一及び第二マーカー間に蛍光エネルギー移行が生じる。

40

【0130】

近隣部位に置かれると容易に検出可能なシグナルを生産する、本方法においてマーカー対として使用し得る様々な色素がある。以前は、そのような色素対は、例えば、PCR産物

50

を検出するために、一つのプローブは5'端かつ他のプローブは3'端を色素で標識したプローブにハイブリダイズすることにより、使用されていた。PCR産物の生産は、色素対を近隣部位におき、検出可能なFRETシグナルを生起する。一つの適用では、色素、フルオレセイン及びLC 640は、2つの異なるプライマー（Roche Molecular Biochemicals-<http://www.biochem.boehringer-mannheim.com/lightcycler/monito03.htm>）上で使用された。ダイオード・レーザーによって発生される緑色光線（約500 nm）で、フルオレセインが励起されると、LC 640は、適切なフィルター及び検出器で容易に検出し得る、赤色蛍光光線（約640 nm）を発光する。新生タンパク質の場合、色素対、BODIPY FL 及び LC 640は、同様な方法で機能する。例えば、タンパク質のN末端部上へのBODIPY FLの取り込みとN末端エピトープに対して指示されているLC 640による結合因子の標識は、新生タンパク質生産の検出を可能とする。

10

## 【0131】

マーカー対BODIPY-FLとクマリンの使用は、都合よく使用される第2番目の対である。一つの研究[Keller, R. C., Silvius, J. R., 及びDe Kruijff, B. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 207(2), 508~14]では、スペクトルオーバーラップを使用して、クマリン（BODIPY FL）及びクマリン（BODIPY530/550）についてフォスターエネルギー移行半径（ $R_0$ ） $50 \pm 2 \text{ \AA}$  及び  $40 \pm 2 \text{ \AA}$ が共役することが発見された。実験的には、これはそれぞれ、 $49.0 \sim 51.5 \text{ \AA}$  及び  $38.5 \sim 42.5 \text{ \AA}$ と推定された。類似または同一のスペクトル特性を有する2つのマーカーを、消光プロセスのために、マーカー対として使用することも可能である。例えば、一つの研究では、このプロセスは、無傷細胞における外在性タンパク質のプロセッシングを研究するために、BODIPY FLの事例で使用され[Reis, R. C., Sorgine, M. H., 及びCoelho-Sampaio, T. (1998) *Eur J Cell Biol* 75(2), 192~7]、また二番目の事例では、細胞内ウィルスアセンブリ動態学研究のために使用された[Da Poian, A. T., Gomes, A. M., 及びCoelho-Sampaio, T. (1998) *J Virol Methods* 70(1), 45~58]。

20

## 【0132】

上記に記載のように、レポーターを使用する主要な利点は、それ以上の精製または分離ステップなしに、直接に細胞または無細胞翻訳系におけるタンパク質の合成をモニタするための能力である。レポーターマーカーはまた、必要に応じて、レポーター特性を除去し得る切断可能なマーカーと併用して使用し得る。そのような手法は、取り込まれたマーカーを取り込まれなかったマーカーから区別するために分離ステップを必要とする、放射性アミノ酸を使用する場合では利用できない。インビトロ翻訳系では、これは、タンパク質合成の速度を測定し、また反応条件を変更することにより合成を最適化するための手段を供給する。例えば、インビトロ翻訳系は、特定の校正タンパク質の生産速度をモニタすることにより最適化することができた。これはさらに、細胞または無細胞系における遺伝子制御研究のための信頼でき、かつ正確な方法も供給する。

30

## 【0133】

## C. アフィニティーマーカー

本発明による他の実施態様は、細胞または無細胞タンパク質合成系において生産される新生タンパク質の検出または分離を容易にするマーカーの用途を指示する。そのようなマーカーは、アフィニティーマーカーと称され、受容体基を含む分子及び/または物質と選択的に相互作用する特性を有する。アフィニティーマーカーは、説明されるように、非天然アミノ酸類似体及び誘導体、さらにレポータータイプのマーカーのような他のマーカーと同一な方法で、tRNAをアミノアシル化することにより結合される。これらのアフィニティーマーカーは、いったんミスアミノアシル・tRNAが翻訳系に導入されると、新生タンパク質中に取り込まれる。

40

## 【0134】

アフィニティーマーカーは、共役因子を介する、生物学的または非生物学的起源である他の分子による選択的相互反応のために、新生タンパク質の分離を容易にする。例えば、受容体分子と言及される、アフィニティーマーカーが相互作用する特定の分子は、小有機

50

分子またはスルヒドリル基 (-SH) のような化学基、または抗体のような大型バイオ分子であり得る。結合は、事実上普通は化学的であり、共有または非共有結合の形成、あるいはイオンまたは水素結合のような相互作用を含み得る。結合分子または部分は、溶液中で遊離しているか、またはそれ自体が表面、ポリマートリックスに結合されているか、あるいは基質表面に常在し得る。相互作用はまた、光線、温度、圧力または触媒として作用する化学的または生物学的分子の添加のような外部因子によってトリガされ得る。

#### 【 0 1 3 5 】

反応混合物中にある新生タンパク質と他の既存タンパク質の検出及び/または分離は、アフィニティーマーカーと受容体分子間の相互作用、通常では結合の種類によって起こる。しかし、取り込まれたアフィニティーマーカーのあるものが新生タンパク質内部に埋め込まれているようなある事例においても、アフィニティーマーカーのいくつかは新生タンパク質表面に露出されている限りは、アフィニティーマーカーと受容体分子間の相互作用は起こる。アフィニティーマーカーはタンパク質配列のいくつかの位置に分散されているために、これは普通は問題とならない。

10

#### 【 0 1 3 6 】

アフィニティーマーカーは、共役因子が付着または取り込まれている、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸誘導体あるいはアミノ酸類似体を含む。例えば、非天然アミノ酸への共役因子の付着は、共有相互作用を介して起こるが、親水性または疎水性相互作用、水素結合、静電相互作用またはこれらの組み合わせのような非共有相互作用もまた可能である。有用な共役因子の実例は、ハプテン、免疫原性分子、ビオチン及びビオチン誘導体、さらにこれら分子のフラグメント及び組み合わせのような分子を含む。共役因子は、新しく形成された新生タンパク質の選択的結合または付着を可能として、その検出または分離を容易にする。共役因子は、特定の抗体に対する抗原部位を含むか、あるいはストレプトアビジンのような受容体基への強い結合を有することが知られているビオチンのような分子を含み得る。例えば、ビオチンはタンパク質鎖中に取り込まれたアミノ酸に共有結合し得る。ビオチンの存在は、表面上にコートされているアビジン分子中にそのようなマーカーを取り込んでいる新生タンパク質のみを選択的に結合する。適切な表面は、クロマトグラフィー分離用の樹脂、結合プレート用の組織培養表面のようなプラスチック、マイクロ滴定皿及びビーズ、セラミック及びガラス、磁性粒子、ポリマー及び他のマトリックスを含む粒子を含む。処理表面は、例えば、非新生タンパク質及び他の翻訳用試薬を取り除くためにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄され、新生タンパク質が分離される。ある場合は、これらの物質は、光ファイバー、ChemFET、及びプラズモン検出器のようなバイオ分子検知装置の一部であり得る。

20

30

#### 【 0 1 3 7 】

アフィニティーマーカーの一例はダンシルリジン (図5) である。ダンシル環と相互作用する抗体は市販されており (Sigma Chemical ; St. Louis, MO)、または、本明細書に参考文献として特に編入されている、Antibodies: A Laboratory Manual (抗体: 実験室マニュアル) (E. Harlow 及び D. Lane、編集、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988) に説明されるような既知のプロトコルを使用して調製し得る。ダンシル部分を含むタンパク質を、特異的抗体 ダンシル相互作用に基づいて、他のタンパク質から分離することを可能とする多数の従来手法が存在する。例えば、抗体をクロマトグラフィーカラムの充填材上に不動化することができる。アフィニティーマーカーカラムクロマトグラフィーとして知られる本方法は、ターゲットタンパク質を不動化抗体との相互反応によってカラムに保留し、他のタンパク質はカラムを通過することにより、タンパク質の分離を達成する。ターゲットタンパク質は次に、抗原抗体相互作用を破壊することにより遊離される。イオン交換またはアフィニティーマーカーセファローズ (Sephacrose)、セファデックス (Sephadex) 及び他のクロマトグラフィー用樹脂のような特定のクロマトグラフィーカラム材料が市販されている (Sigma Chemical ; St. Louis, MO ; Pharmacia Biotech ; Piscataway, NJ)。

40

#### 【 0 1 3 8 】

50

分離は、免疫沈降法、及び、フィルター上またはビーズ、プレートまたは樹脂のような他の表面上への抗体の不動化のような他の生化学的分離方法を使用して、抗体 ダンシル相互作用によって実施され得る。例えば、タンパク質は、タンパク質特異的抗体で磁性ビーズをコートすることにより分離することができた。ビーズは、磁場を使用して抽出物から分離される。アフィニティーマーカーとしてダンシルリジンを使用する特別の利点は、いったんタンパク質が分離されると、その蛍光特性のために好都合にもさらに検出され得ることである。

【0139】

抗体の他に、これと等しくターゲット分子または化学的部分と強い相互作用を呈示するその他の生物学的分子が存在する。実例は、ビオチンとアビジンの相互作用である。この場合は、ビオチン部分を含むアフィニティ類似体が、本発明の一部である方法を使用して、タンパク質中に取り込まれる。ビオチン リジンアミノ酸類似体は市販されている (Molecular Probes ; Eugene, OR)。

10

【0140】

アフィニティーマーカーはさらに、マーカー検出前に形成されなければならないマルチ成分複合体の一つの成分を含む。本検出手段による一つの特定の実施態様は、ルミネッセント金属キレート塩、特にルミネッセント希土類金属キレート塩の使用を含む。ある特定の分子は、希土類金属と極めて安定な複合体を形成することが知られている。さらに、これらのキレート塩への発色団の導入は、これらの複合体のルミネッセンスを感作することがよく知られている。ルミネッセント希土類金属キレート塩の使用に基づく様々な検出機構が説明されている : Hemmila, I.A., "Applications of Fluorescence in Immunoassays (免疫アッセイ法における蛍光の適用)", (Wiley&Sons 1991)。

20

【0141】

好ましい実施態様では、tRNAが、希土類シェルターとしてさらに作用する発色団でミスアミノアシル化される。この修飾アミノアシル・tRNAは、次に細胞または無細胞タンパク質翻訳系中に導入され、修飾アミノ酸が新生タンパク質中に取り込まれる。この混合物は次に、ゲル電気泳動を使用して分離され、ゲルは希土類陽イオンを含む溶液を加えてインキュベートされる。これらの条件下、希土類陽イオンは、新生タンパク質中にのみ存在するキレート化剤によって修飾されたアミノ酸とルミネッセント複合体を形成する。新生タンパク質は次に、形成されたランタニド複合体を励起する、中域UVトランスイルミネーター (350 nm) を使用して検出される。画像は次に、ポラロイドカメラまたはCCDアレイ及びフィルターを使用して記録される。一つの実施態様では、二成分検出システムの第一成分としてサリチル酸誘導体、また第二成分としてテルビウムイオンが使用される。

30

【0142】

アフィニティーマーカーはさらに、共役因子を取り込んでいる切断可能マーカーを含み得る。この特性は、タンパク質の天然構造及び機能を維持し、受容体基から新生タンパク質を遊離するために共役因子の除去が必要である場合に重要である。ある場合は、共役因子の切断及び除去は、天然アミノ酸の生産を生起する。一つのそのような実例は、アミノ酸と結合された光開裂型ビオチンである。

【0143】

光開裂型ビオチンは、X、Y 及びZによって図12に示す官能基により誘導体化されたフェニル環を含む光開裂部分を含む。Xは、反応基X'を介して、バイオ分子基質へのPCBの結合を可能とする。X'の実例は、Cl、O-N-ヒドロキシスクシンイミジル、OCH<sub>2</sub>CN、OPhF<sub>5</sub>、OPhCl<sub>5</sub>、N<sub>3</sub>を含む。Yは、1またはそれ以上のニトロまたはアルコキシルのような置換を含むフェニル環の置換パターンを示す。官能基Zは、クロスリンカー部分の光反応部分への結合を可能とする基を示す。光反応部分は、照射に際して、基質からPCB分子の切断を生起する光反応を受ける特性を有する。

40

【0144】

リジン tRNAは、光開裂型ビオチン リジンでミスアミノアシル化されるか、または化学的に修飾されて光開裂型ビオチンアミノ酸を付着する。ミスアミノアシル・tRNAは、無

50

細胞タンパク質合成系に導入されて、新生タンパク質が生産される。新生タンパク質は、ビーズと磁場の相互作用に基づく従来の方法を使用して、ストレプトアビジンでコートされた磁性ビーズによって、系の他の成分から分離し得る。新生タンパク質は、波長が約280 nmであるUV光線の照射により、ビーズから遊離される。

**【0145】**

タンパク質検出のためにデザインされた多数の装置が、ターゲットタンパク質と特定の不動化受容体分子の相互作用に基づいている。そのような装置はまた、ターゲット分子の不動化受容体基との相互作用によって変更された、表面プラズモン、光散乱及び物質の電子特性における変化の検知に基づくバイオディテクター（バイオ検出器）のようなアフィニティマーカーをいったん含むと、新生タンパク質を検出するために使用され得る。

10

**【0146】**

アフィニティタイプマーカーを含まないものを含む新生タンパク質は、他の従来の分離手法によって分離され得る。新生タンパク質を分離かつ精製するために適用または併用できるより有用な分離手法のいくつかは、フェノールまたはクロロホルム抽出のような化学抽出法、透析法、硫酸アンモニウムカットのような沈降法、電気泳動及びクロマトグラフィー法を含む。化学的分離法は、一般的には個々のタンパク質の特定な分離を供給しないが、バルク量の非タンパク質性物質の除去に有用である。電気泳動による分離は、新生タンパク質を含む翻訳混合物を、変性または非変性ポリアクリルアミドであるゲルまたはアガロースゲルのウェル中に入れること含む。直流またはパルス電流をゲルに印加し、系の様々な成分が、分子サイズ、形状、電荷またはその物理的特性の組み合わせに従って分離される。いったんゲル上で識別されると、分離タンパク質を含む部分を取り出して、新生タンパク質をゲルから精製する。アクリルアミド及びアガロースゲルからのタンパク質精製法は既知であり、市販されている。

20

**【0147】**

タンパク質の分離及び精製に有用であるクロマトグラフィー法は、ゲル透過、高速または高圧液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを含む。これらの手法は、選択マーカーを含むタンパク質種の分離及び精製に極めて便利である。

本発明による他の実施態様は、新生タンパク質のアミノ末端残基における、マーカーまたはアフィニティ特性を有する非天然アミノ酸またはアミノ酸誘導体の取り込みを指示する（図13）。これは、アミノ酸の側鎖の使用またはアミノ酸の末端アミノ基を誘導体化することにより達成し得る。どちらの場合も結果生じる分子は、アミノ酸誘導体と称される。タンパク質のアミノ末端残基は遊離基であり及、従ってその誘導体化は、新生ポリペプチドの形成を妨げないであろう。非天然アミノ酸またはアミノ酸誘導体は次に、アミノ酸合成の開始をシグナルする第一AUGコドンのみを認識する開始tRNAをミスアミノアシル化するために使用される。このミスアミノアシル開始tRNAのタンパク質合成系への導入後、マーカーは新生タンパク質のアミノ末端にのみ取り込まれる。これらの新生分子はほとんど天然立体配座にフォールドされて（折りたたまれて）いる可能性があるため、N末端残基に取り込む能力は重要である。これは、機能性新生タンパク質の検出や分離を所望するような研究では便利である。

30

40

**【0148】**

新生タンパク質のアミノ末端残基でミスアミノアシル・開始tRNAによって取り込まれた全てのマーカーが、タンパク質翻訳機構による同様な受容を示すわけではない。さらに、異なるマーカーの取り込み範囲は、リジン tRNAのような非開始tRNAの用途に比較するとより限定的であり得る。ミスアミノアシル・開始tRNAによる取り込みについてのマーカー間のこの識別に影響する因子については完全には解明されていないが、一つの可能性は、ホルミルメチオニン-開始tRNAをリボソームに運搬するために使用される開始因子（IF2）が役割を果たすことである。第二の可能性は、マーカー構造とリボソーム間の相互作用が役割を果たすことである。例えば、マーカー、BODIPY-FLは、タンパク質翻訳機構により、NBDのような小型蛍光マーカーよりも大幅に受容される。この理由で、BODIPY-FL は、

50

開始tRNAを介して取り込まれる場合は、新生タンパク質検出における使用には優れたマーカーである。

【0149】

マーカー基はまた、正常AUG開始コドン認識しない突然変異型tRNAを使用することにより、N末端に取り込まれ得る。ある場合は、これはマーカーのより高度な特異的取り込みを誘導し得る。例えば、アンチコドンがCAUからCUAに変更された（開始メチオニンコドンのアンバー終止コドンへの変更を起因）開始tRNAの突然変異体は、開始サプレッサーtRNAとして作用することが示されている（Varshney U, RajBhandary UL, Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Feb; 87(4): 1586~90; Initiation of protein synthesis from a termination codon（終止コドンからのタンパク質合成の開始）。このtRNAは、正常開始コドンAUGがアンバーコドンUAGによって置換されると、特定の遺伝子のタンパク質合成を開始する。さらには、UAGとtRNA (fMet<sup>CUA</sup>)によるタンパク質合成の開始は、メチオニンではなくグルタミンで起こることが発見された。新生タンパク質のN末端部にマーカーを導入するためにこのtRNAを使用するには、この突然変異体tRNAは、グルタミンで酵素的にアミノアシル化され、次に適切なマーカーで修飾され得る。他方、このtRNAは修飾アミノ酸（例えば、メチオニン-BODIPY）を使用して、化学的にアミノアシル化し得る。タンパク質翻訳は、UAGを含メッセージ上でこのタンパク質によってのみ開始できるため、全てのタンパク質は、タンパク質のN末端部にマーカーを含むであろう。

10

【0150】

D. 質量分析法

20

質量分析法は分子の質量を計測する。生物学における質量分析の用途は、迅速に進歩を続けており、炭水化物、タンパク質、核酸及びバイオ分子複合体の分析を含む多様な領域に適用されている。例えば、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）質量分析（MS）の開発は、タンパク質、オリゴヌクレオチド、及びオリゴサッカリドを含むバイオ分子の分析のための重要なツールを供給した[Karas, 1987 #6180; Hillenkamp, 1993 #6175]。この手法の成功は、大型バイオ分子及び非共有結合複合体（>500,000 Da）の分子量を、高精度（0.01%）及び感度（フェムトモル量以下）で計測するその能力に基づく。これまでは、これはDNAの迅速配列、生物活性ペプチドのスクリーニング及び膜タンパク質分析を含む生物学及び医学の多様な領域に適用できることが発見されている。

【0151】

30

ミスアミノアシル・tRNAによって新生タンパク質中、特にN末端部のような特定の位置、に取り込まれたマーカーは、質量分析法によって新生タンパク質を検出するために使用し得る。そのようなマーカーなしでは、抽出物中には類似の質量を有する多数の他の分子が存在するために、細胞または無細胞抽出物中で、合成された新生タンパク質に起因するバンドを検出するのは極めて困難であり得る。例えば、抽出物の総タンパク質量の0.01%以下が新生タンパク質を含むような場合である。さらには、新生タンパク質と類似の分子量を有する分子が混合物中に存在することがある。そのような分子は、新生タンパク質のピークとオーバーラップするであろう。この問題は、新生タンパク質が無細胞または細胞タンパク質合成に既に存在する転写または翻訳因子である場合に、特に重大である。タンパク質合成系におけるこのタンパク質を余分な量の合成は、ピーク強度がタンパク質濃度と直線的に相関しないために、質量分析法における既知の方法を使用して検出することは困難であろう。

40

【0152】

翻訳系で生産された新生タンパク質の質量分析による検出は、生産された新生タンパク質の質量が未知である場合は、さらに極めて困難である。この状況は、例えば、新生タンパク質が正確な配列が未知であるDNAから翻訳される場合に生じるであろう。そのような一つの実例は、特定の遺伝子または遺伝子フラグメント中に特定の突然変異を有する個体からのDNAの翻訳である。この場合は、突然変異はタンパク質配列の変化を起こすことがあり、突然変異が終止コドン起因する場合は鎖トランケーションさえ起こす結果となる。翻訳系において生産される新生タンパク質の質量は、DNAが遺伝子ライブラリーの異なる

50

るメンバーまたはそのフラグメントを含む可能性のある細菌コロニーのような未知の原料に由来する場合にも、また未知である。

【0153】

本発明による一つの実施態様では、特定の質量を持つマーカの新生タンパク質中への取り込みが、従来の質量分析法のアプローチに関連する前記に説明する問題全てを排除するために使用され得る。第一に、既知の質量を持つマーカでミスアミノアシル化されたtRNAを、タンパク質合成系に添加する。合成系を次に、新生タンパク質を生産するためにインキュベートする。タンパク質合成系の質量スペクトルを次ぎに測定する。新生タンパク質の存在は、未修飾タンパク質の質量と、新生タンパク質及びマーカの質量を含む修飾アミノ酸の質量に対応する高質量位置にある第二バンドに対応する、タンパク質合成系の質量スペクトルのピークを同定することにより直接検出し得る。

10

【0154】

本方法を使用する新生タンパク質の効率的な検出を最適化するために行い得るいくつかのステップがある。マーカの質量は、質量分析の分解能を超えるべきであり、従って新生タンパク質の質量の増加分は非修飾質量から解明され得る。例えば、質量が100 Daを超えるマーカは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)または電子噴霧イオン化法(ESI)のどちらを使用しても、総質量が100,000までのタンパク質中で容易に検出し得る。ミスアミノアシル・tRNA量は、質量マーカの取り込みが、生産される総新生タンパク質の約50%において生じるように調整されるべきである。開始tRNAは新生タンパク質のN末端部にのみ取り込まれるため、従って質量マーカの複数のコピーが新生タンパク質に含まれる可能性が回避されるので、開始tRNAが質量マーカの取り込みには好ましい。

20

【0155】

この方法の一例は、質量が282であるマーカ-BODIPY-FLの、ミスアミノアシル・開始tRNAを使用する、新生タンパク質への取り込みである。ミスアミノアシル・開始tRNAを使用する、新生タンパク質へのこのマーカの取り込みは、新生タンパク質に出現する正常バンドより上の約282 Daでバンドの出現を起こす。非ミスアミノアシルE.coli tRNA<sup>fmet</sup>と競合のために、マーカの取り込みはタンパク質当たり1以下であるために、非修飾タンパク質に対応するピークもまた出現する。マーカの質量によって分離されるこれらの2つのバンドの同定は、新生タンパク質由来のバンドの初期同定を可能とする。新生タンパク質由来のバンドのそれ以上の確認は、翻訳混合物中にあるミスアミノアシル・開始tRNAレベルを調整することにより行い得る。例えば、ミスアミノアシル・開始tRNAが省かれる場合、非修飾タンパク質に対応するピークのみがタンパク質合成系の質量スペクトルに出現する。BODIPY-FLを有するミスアミノアシル・tRNAを含むタンパク質合成系及び含まないタンパク質合成系からの質量スペクトルを比較することにより、タンパク質合成系中に類似または同一質量を持つタンパク質が既に存在する場合でさえも、新生タンパク質の存在を独自に同定し得る。

30

【0156】

新生タンパク質の質量分析による同定の目的には、光開裂型マーカの利用がしばしば都合がよい。この場合は、質量スペクトル中にある新生タンパク質のピークは、マーカを光開裂する照射に露光された、または露光されていないタンパク質合成系の試料からのスペクトルを測定及び比較することにより容易に同定され得る。露光されていない試料は、取り込まれた質量マーカを有する新生タンパク質の質量に対応するバンドを呈示するが、露光された試料は、質量マーカが除去された後の新生タンパク質の質量に対応するバンドを呈示する。照射に起因する質量スペクトルの特定バンドのこのシフトは、タンパク質合成系において新生タンパク質に起因するバンドのユニークな識別子を供給する。

40

【0157】

この方法の一例は、光開裂型マーカである、光開裂型ビオチンの使用を含む。光開裂型ビオチンが、ミスアミノアシル・E. coli 開始tRNA<sup>fmet</sup>を使用して、ブドウ球菌によって生産される毒素である、試験タンパク質ヘモリジン中に取り込まれると、質量スペ

50

クトルは、新生タンパク質の質量35,904 Daに対応するピークと、36,465 Daに新生タンパク質の質量プラス光開裂型ビオチンの質量に対応する第二ピークの2つのピークを呈示する。細胞または無細胞抽出物を、波長が約365 nmであるUV光線に、約10分露光することによるマーカの光開裂後、新生タンパク質からマーカが切断されるために、2つのバンドの強度は変更を受ける。例えば、スパーサーを1つ含む光開裂型ビオチンの場合は、質量の変化は561.57である。これらの特徴の変化は、次に新生タンパク質に対応するピークを独自同定するために使用される。MALDI質量分析法の場合は、十分な強度に調整されると、レーザーパルス・プローブは、光開裂型ビオチンの光開裂を達成するために使用され得る。この場合は、変化は、測定期間中に従来の方法で測定することができ、従って新生タンパク質に関連するピークの検出を容易にする。同様なアプローチが、細胞または無細胞翻訳系において、質量が未知である1つ以上の新生タンパク質の同定に使用され得る。

10

## 【0158】

ミスアミノアシル・tRNAによって新生タンパク質中に取り込まれる、アフィニティー特性を有するマーカはさらに、質量分析によるそのようなタンパク質の検出にも極めて便利である。そのようなマーカは、新生タンパク質を、残りの無細胞または細胞翻訳系から分離するために使用され得る。この場合は、残りの無細胞混合物からの新生タンパク質の分離は、タンパク質翻訳系にある他の分子のバンドからの妨害を排除する。このアプローチの実例は、ミスアミノアシル・tRNAを使用する、新生タンパク質のN末端への光開裂型ビオチンの取り込みである。このマーカが、E. coli tRNA<sup>met</sup>を使用して、新生タンパク質のN末端郡上に取り込まれると、それはストレプトアビジンアガロースのようなストレプトアビジン親和性媒質を使用して結合され得る便利なアフィニティー標識を供給する。この方法によって、いったん新生タンパク質が残りのタンパク質合成系から分離されると、UV光線によって遊離され、さらに質量分析によって分析され得る。MALDI質量分析法の場合は、新生タンパク質の遊離は、MALDI システムのUVレーザー励起パルスを使用して、大変便利にも達成し得る。他方、MALDI または ESI質量分析の場合は、質量分析を行う前に試料を照射し得る。

20

## 【0159】

## E. 電気泳動法

本発明による他の実施態様は、電気泳動によって翻訳系において翻訳された新生タンパク質と分子または因子の相互作用を検出するための方法を指示する。この方法は、多数の化合物または因子を、タンパク質が分離されたり、その機能が同定されていなくても、特定遺伝子による発現タンパク質との相互作用の可能性について迅速なスクリーンを行うことを可能とする。この方法はさらに、遺伝子プールによって発現されているタンパク質ライブラリーを、これらのタンパク質または因子を分離する必要なく、化合物または因子との相互作用について迅速にスクリーンすることも可能にする。因子は、化合物の組み合わせライブラリーの一部であるか、または天然試料のような複雑な生物学的混合物中に存在し得る。因子は、新生タンパク質に結合することによりこれと相互作用するか、または相互作用して化学的あるいは酵素的修飾による新生タンパク質の構造の変化を生起する。

30

## 【0160】

ポリアクリルアミドゲルのようなゲル中でタンパク質の電気泳動易動度を測定する、ゲル電気泳動法の他に、この方法は毛管電気泳動を使用して実施し得る。CEは、分子の電荷質量比に比例する、タンパク質の電気泳動移動時間を測定する。時にはアフィニティー毛管電気泳動と称される、CEの一つの形状は、結合事象後に結合がタンパク質の電荷質量比に変化を起こす限り、小型リガンドを含む他分子とタンパク質の相互作用に極めて感度が高いことが発見されている。タンパク質が、特定の検出性電磁スペクトル特性を有する蛍光色素のようなマーカと抱合されている場合に最大感度を得ることができる。電気泳動クロマトグラムにおけるピークの検出は、主として可視波長であるレーザー誘導性発光によって達成し得る。蛍光色素の実例は、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド及びBODIPYを含む。

40

## 【0161】

50

高感度検出の必要性和抽出物中に電荷質量比が類似する多数の他分子が存在するため、次の分離及び標識ステップなしには、CEによる細胞または無細胞抽出物中で合成された新生タンパク質の検出は極めて困難である。例えば、抽出物の総タンパク質量の0.01%以下が新生タンパク質を含むような典型的な場合である。新生タンパク質と類似する電気泳動移動時間を有する他分子が混合物中に存在することがある。そのような分子は、新生タンパク質のピークとオーバーラップするであろう。

#### 【0162】

さらに、従来のCE法を使用して、無細胞または細胞合成系において生産される新生タンパク質と分子の相互作用を検出することは極めて困難である。アフィニティー毛管電気泳動は、結合事象後に結合がタンパク質の電荷質量比に変化を起こす限り、小型リガンドを含む他分子とタンパク質の相互作用に極めて感度が高いことが発見されている。しかし、蛍光色素のようなマーカーの新生タンパク質への選択的添加は、ほとんどのマーカー試薬は、タンパク質合成系における新生タンパク質以外の他分子を非選択的に標識するために、従来の手段の使用では不可能である。ある場合は、新生タンパク質とのみ結合する特異的基質またはリガンドを利用することにより可能となり得る。しかし、この方法は、新生タンパク質の結合特性について詳細な知識と、マーカー特性を備えるリガンドの特別なデザインを必要とする。新生タンパク質はまた、タンパク質合成系から分離され、次に検出マーカーで選択的に標識され得る。しかし、これはまた、新生タンパク質分離のための手順の開発を必要とし、時間を要し、タンパク質の特性またはアフィニティーエピトープを取り込むためのタンパク質工学に関する高度な知識を必要とする。新生タンパク質が分離された後でさえ、各標識タンパク質の電荷質量比が同一であるように、タンパク質をマーカーで均一に標識することはしばしば困難である。標識の最も都合のよい形態は、蛍光性の強いマーカーが、タンパク質中の一つの特定位置のみに取り込まれ、従って、異なる電気泳動易動度を持つタンパク質のセットを回避される。

#### 【0163】

本発明による方法は、ターゲットタンパク質が翻訳系で発現された新生タンパク質である場合に、米国特許第5,783,397号（本明細書に参考文献として編入）によって説明されるような、毛管電気泳動を使用する、新しい治療効果のある化合物についての試料の迅速スクリーニングに関連する主要な問題も克服する。これは、普通では長い分離ステップと均一標識のための特別の手法を必要とするCEによる高感度分析のために、翻訳系にある発現ターゲットタンパク質をマーカーで均一に標識する必要性を含む。

#### 【0164】

この方法はまた、本明細書に参考文献として特に編入している、米国特許第565,451号に説明されているような新cDNAクローンの分離用の発現クローン法と併用しても使用することができる。本特許は、a) 約100の個別細菌コロニーのプールを収集し；b) プール中にあるcDNAによってコードされるタンパク質をインビトロで発現することにより、cDNAクローンを同定するための新方法を説明する。この方法によって同定し得るタンパク質は、以下に限定はされないが、核酸結合タンパク質、細胞骨格タンパク質、生長因子、分化因子、翻訳後修飾タンパク質、リン酸化タンパク質、タンパク質分解による切断タンパク質、グリコシル化タンパク質、タンパク質複合体のサブユニットまたは複数成分、酵素、既知タンパク質のイソ型、既知タンパク質の突然変異型を含む。重要なことには、本方法は、タンパク質翻訳系から所望するタンパク質を同定する重要なステップを含む。タンパク質同定について説明された2つのそのような方法は、放射性標識及び化学標識を含む。しかし、これらのステップには極めて時間を要し、所望タンパク質についての抽出物を迅速にスクリーンするためには向いていない。

#### 【0165】

本発明は前記に説明した問題の全てを回避する。本発明による一つの実施態様では、検出マーカーでミスアミノアシル化されたtRNAをタンパク質合成系に添加する。検出マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系をインキュベートする。1またはそれ以上の分子（因子）を次に、新生タンパク質に併合して（分離の前でも後でもよい）、因子を新生

10

20

30

40

50

タンパク質と相互作用させる。との混合物のアリコートを次に電気泳動にかける。因子と相互作用した新生タンパク質は、取り込まれたマーカを有する新生タンパク質の電気泳動の易動度の変化を検出することにより同定される。因子が新生タンパク質と相互作用した場合、タンパク質は分離されて、その後それ以上の分析を行うことができる。因子が新生タンパク質に結合された場合は、新生タンパク質を分離することにより結合因子が同定され得る。

#### 【0166】

本方法の一例では、前記に説明するように、蛍光マーカ-BODIPY-FLを、E. coli 開始tRNA<sup>fmet</sup>をミスアミノアシル化するために使用する。このミスアミノアシル・tRNAを次に、タンパク質合成系に添加し、さらに系を、N末端部にBODIPY-FLを含む新生タンパク質を生産するためにインキュベートする。新生タンパク質に結合し得る特定の化合物を、次に特定の濃度で、タンパク質合成系に添加する。混合物のアリコートを次に毛管電気泳動用の装置中に注入する。混合物中の新生タンパク質は、488 nmに同調されたアルゴンレーザーからの励起光線を使用して、BODIPY-FLからの蛍光の検出によって同定される。特定の化合物の相互作用は、特定の化合物に曝露された新生タンパク質についての電気泳動易動度を、曝露されていない新生タンパク質の同様な測定と比較することにより測定される。化合物の結合強度は、次にタンパク質合成系に添加される特定化合物の濃度を変更し、非複合体化及び複合体化新生タンパク質に当たるバンドの相対強度における変化を測定することにより確認することができる。

#### 【0167】

この方法は、タンパク質翻訳系において翻訳された一つの新生タンパク質と一つの因子の相互作用の研究に限定されるわけではない。例えば、化合物ライブラリーをスクリーニングして、特定のターゲットタンパク質のリガンドとして作動する化合物を同定し得る。新生タンパク質に1またはそれ以上の因子を結合することを含む相互作用の他に、以下に限定はしないが、リン酸化、タンパク質分解、グリコシル化、他のバイオ分子との複合体の形成を含む、新生タンパク質の修飾を起因する相互作用が、新生タンパク質に取り込まれたマーカを電気泳動法と組み合わせて使用することにより、検出され得る。例えば、抗体の新生タンパク質との相互作用は、形成された複合体の実際の電気泳動易動度の変化によって検出され得る。同様なアプローチを、新生タンパク質と結合する複合体混合物中にある1またはそれ以上の化合物の存在を同定するために使用し得る。そのような混合物は、組み合わせ化学によって生産される化合物または治療効果のある化合物を含み得る天然試料のような複雑な生物学的混合物中に存在し得る化合物のライブラリーを構成する。

#### 【0168】

##### F. マイクロスケール法

本発明は、毛管電気泳動(上記参照)を考案するが、他の方法もまた考案される。特に、マイクロスケール法は、新マーカ(例:BODIPY)及び本発明による方法と併用して使用することができる。装置上のチャネルの寸法(及び対応する液体容量)が極めて小さいこと(典型的にはピコメーター領域)において、本方法は「マイクロスケール」である。例えば、チャネルは、典型的には奥行きが約0.10 ~ 0.50 μm、幅が約5 ~ 500 μmである。

#### 【0169】

統合液体系を構造するためには多数のフォーマット、材料及びサイズのスケールがあるが、本発明は、大スケールスクリーニングの多くの効率の悪さに対するソリューションとしてのマイクロ加工装置を考案する。装置は多数の材料からマイクロ加工され得る。シリコンは、計算用マイクロプロセッサの構造に使用される材料であり、その加工テクノロジーは過去30年の間に先例を見ないような速度で発達してきた。セミコンダクター統合サーキット加工のための主要な近代的方法は、所謂プレーナープロセスである。プレーナープロセスは、シリコン特有の特徴に基づき、沈殿、酸化、光リソグラフィ、分散及び/またはイオン注入、及び金属被覆を含む製造ステップから成る複雑なシーケンスを含み、シリコン基質中に「積層」統合サーキット装置を加工する。例えば、本明細書に参考文献

10

20

30

40

50

として編入する、W. Miller、米国特許第 5,091,328号を参照のこと。この技術は、当初はマイクロエレクトロニクス（超小型電子技術）装置作製に適用されたが、同じ技術が、現在ではマイクロメカニカルシステムのために使用されている。

【0170】

連続性流動液体輸送は、シリコンで開発されたマイクロ液体装置を使用して説明されている。J. Pfahler et al., Sensors and Actuators A21-A23 (1990)、pp431~434)を参照のこと。シリコンのマイクロ機械加工に基づいて、流動を生起するために外力を使用するポンプがまた、説明されている。H.T.G. Van Lintel et al., Sensors and Actuators 15 : 153~167 (1988)を参照のこと。マイクロ加工チャンネルにおけるタンパク質のSDS毛管電気泳動もまた説明されている。Yao S et al., "SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels (マイクロ加工チャンネルにおけるタンパク質のSDS毛管電気泳動)" PNAS 96 : 5372 (1999)を参照のこと。さらに伝統的である二次元変性ゲル電気泳動（一般的に時間を要し、相当量の試料を必要とする）と比較して、このマイクロチャンネルベースによる分離技術は、迅速で、高分解能を提供することが示された。

【0171】

メカニカル建造材料として、シリコンはよく知られている加工特徴を有している。シリコン製装置の経済的魅力は、その関連するマイクロ機械技術が特に写真再生技術であることである。これらのプロセスでは、不透明デザインを含む透明なテンプレートまたはマスクが、シリコン基質表面上で物体を光限定するために使用される。テンプレート上のパターンは、コンピューターデザインプログラムによって発生され、1ミクロン以下の線幅で構造を描写し得る。いったんテンプレートを発生したら、テンプレートをほぼ無期限に使用して、同一のレプリカ構造を生産し得る。従って、構成要素の全てがシリコンマイクロ機械加工に適合性があれば、極めて複雑なマイクロ機械でさえ大量生産かつ低価格で再生が可能である。本発明は、マイクロ加工分析装置を構造するための光リソグラフィ法における使用に、ガラスまたはクォーツのような他の基質を考案するが、同一構造内に広く様々な電子構成要素を加工できるさらなる利点があるために、シリコンが好ましい。

【0172】

一つの実施態様では、本発明は、統合分析システムにおけるシリコンマイクロ機械構成要素を考案する。試料（例：試験化合物）及び1またはそれ以上の試薬（例：BODIPY標識新生タンパク質）は、エントリポートを通して装置中に連続的またはパルスで注入され、チャンネルを通過して、混合と反応が行われる温度制御リアクターのような反応チャンパーに輸送される。生化学的生成物は、次に新しいチャンネルを下って（または、必要に応じて、電気泳動モジュールによって）、ここで検出器によって移動データが収集され、記録装置に伝達される。必要に応じて、分子篩による分解能を供給するためにチャンネル内にポリマーを使用し得る。生化学的生成物は、フローを転換することにより、その後に行われる分析のために、分離することができる。重要なことには、液体及び電子成分は、その機能及び構造において、生物学的反応及び試薬と完全に適合性があるようにデザインされている。本実施態様では、試験候補化合物は、標識新生タンパク質または翻訳反応系で同時発現されている複数の新生タンパク質との相互作用について迅速にスクリーンされ得る。このようにして、このシステムは、有用な薬物を同定するために相可作用についてスクリーンするために使用され得る。

【0173】

他の実施態様では、タンパク質合成系の1またはそれ以上の成分がエントリポートを通して装置内に導入され、チャンネルを通過して温度制御リアクターのような反応チャンパーに輸送され、そこでBODIPYのようなマーカを含む新生タンパク質の発現が起こる。標識新生タンパク質は次に、エントリポートから装置内に導入される1またはそれ以上の試薬（例：試験化合物）と混合され得る。反応が起こった後で、生化学的産物は、次に新しいチャンネルを下って（または、必要に応じて、電気泳動モジュールによって）、ここで検出器によって移動データが収集され、記録装置に伝達される。装置内に導入され得るタンパク質合成系の成分は、ミスアミノアシル・tRNA、DNA、mRNA、アミノ酸及びヌクレオチドを

10

20

30

40

50

含み得る。成分は連続的あるいは間欠性パルスで導入され得る。DNAがまた、既に説明されたポリメラーゼ鎖反応のような酵素反応により、マイクロ機械装置内で生産され得る。Kopp et al., "Chemical Amplification Continuous Flow PCR on a Chip (チップ上での連続フローPCRの化学的増幅法)" Science 280: 1046 (1998)を参照のこと。

【0174】

シリコンマイクロ機械加工では、閉鎖チャンネルを形成する単純な技術は、基質表面上での開口トラフの食刻(エッチング)、さらに次に開口チャンネル上に第二の食刻を加えていない基質を接着することを含む。広く様々な等方性及び異方性食刻試薬、液体またはガス状、があり、適切に限定された側壁と均一な食刻奥行きを有するチャンネルを製造し得る。チャンネルパスは光加工マスクによって規定されるために、装置上のチャンネルパターンの複雑さは実質的に制限がない。制御食刻はまた、基質を完全に貫通する試料エントリホールを製造することが可能で、装置外側表面上にあるエントリポートをチャンネル構造に接続する結果となる。

10

【0175】

G. 複数ミスアミノアシル・tRNA

タンパク質の種類中に1以上のマーカータンパク質を取り込むことが好都合なことがしばしばある。これは、ダンシルリジンのようなマーカータンパク質及びピオチン リジンのような共役因子の両方でミスアミノアシル化されたリジンtRNAのような単一tRNA種を使用することによって達成され得る。他方、異なるマーカータンパク質でそれぞれミスアミノアシル化された異なるtRNAもまた使用することができる。例えば、クマリン誘導体がトリプトファンtRNAのミスアミノアシル化、さらにダンシルリジンがリジンtRNAのミスアミノアシル化に使用することができる。

20

【0176】

複数ミスアミノアシル・tRNAの一つの用途は、レプレッサー(抑制因子)またはアクチベーター(活性化因子)、あるいはプロモーターまたはオペレーターのような異なる遺伝的要素の制御下でタンパク質発現を研究することである。例えば、内部あるいは外部因子に対する応答としての2つの異なる時期でのタンパク質合成は、異なる時期に、細胞または無細胞タンパク質合成系中にミスアミノアシル・tRNAを導入することにより識別することができる。tRNA<sup>tyr</sup>はマーカータンパク質Aで電荷され、tRNA<sup>lys</sup>はマーカータンパク質Bで電荷され、それぞれA-tRNA<sup>tyr</sup>とB-tRNA<sup>lys</sup>を生ずる。この場合、一つのプロモーターの制御下にあるタンパク質1は、反応系にA-tRNA<sup>tyr</sup>を加えることにより標識され得る。第二番目のミスアミノアシル・tRNAであるB-tRNA<sup>lys</sup>を次に加え、タンパク質2の第二のプロモーターが活性化されると、生産される新生タンパク質は標識AとBのどちらも含むであろう。追加タンパク質の発現をさらに研究するためには、追加tRNA分子を使用して、追加マーカータンパク質をさらに加えることができる。複数標識された新生タンパク質の検出及び分析は、複色電気泳動パターン読み取りシステムを使用して行うことが可能であり、これは米国特許第5,069,769号及び第5,137,609号に説明されており、そのどちらも本明細書に参考文献として特に編入されている。

30

【0177】

複数ミスアミノアシル・tRNAの二番目の用途は、新生タンパク質の分離と検出の組み合わせである。例えば、ピオチン リジンマーカータンパク質を一つのtRNAのミスアミノアシル化、さらにクマリンマーカータンパク質を他のtRNAのミスアミノアシル化に使用することができる。取り込まれたリジン ピオチンに結合するストレプトアビジンでコートされた磁性粒子は、反応混合物から新生タンパク質を分離するために使用され、クマリンマーカータンパク質は検出と定量に使用され得る。

40

【0178】

上記の方法の基礎の概略図を図14に示す。第一ステップでは、レポーター(R)またはアフィニティー(A)特性を有し得る選択マーカータンパク質(M)が、単一tRNA種または異なるtRNAから成る混合物について化学的または酵素的にミスアミノアシル化される。タンパク質合成前に、蛍光マーカータンパク質で電荷されたミスアミノアシル・tRNAの既定量を、ミスアミノアシル

50

・ tRNAが対応するtRNAと効果的に競合するに十分な濃度で、無細胞タンパク質合成反応系に混合する。約1~3時間のインキュベーション後、反応混合物は、従来のポリアクリルアミドまたはアガロースゲル電気泳動を使用して分析される。電気泳動後、ゲルはUV照射を受ける。新生タンパク質によるバンドは、明確な蛍光を呈示し、既存タンパク質の非蛍光バンドから、可視または写真により、容易かつ迅速に識別され得る。新生タンパク質は、蛍光バンドを切除することにより分離され、抽出ゲル片からタンパク質を電解溶出され得る。新生タンパク質の量及び分子量は、その蛍光を既知分子量及び既知量のタンパク質のセットによって発生される蛍光と比較することにより決定され得る。アッセイ結果を記録し、標準電子イメージング及び写真または分光的方法を使用して、将来の分析のために保存し得る。

10

**【0179】****H. 最終組成物**

本発明による他の実施態様は、マーカーの存在において翻訳後に従来の方法によって分離または精製された新生タンパク質を含む組成物を指示する。組成物は、組織培養産物のコーティング及び製薬産業における試薬調製目的の製造に利用し得る。

**【0180】**

製造において利用される新生タンパク質中へのマーカーの取り込みは、マーカー検出による最終製造産物または工程の分析を容易にする。例えば、生産された新生タンパク質は、組織培養産物のコーティングとして使用することができる。ある特定のコーティングプロセスの再現性は、コートされた産物表面上のマーカー発光の変異を検出することにより、正確に測定され得る。さらに、ホルモン、ステロイド、免疫製品またはサイトカインのような薬物調製物の範囲に含まれるタンパク質中に取り込まれた非毒性マーカーは、そのタンパク質調製物の安全かつ経済的な分離を容易にするために利用され得る。そのような製品はマーカーを取り除く必要なく、直接に使用することができる。極めて低濃度のマーカーが好ましい場合、限定量のマークを付けたタンパク質を、精製手順を通してタンパク質の追跡に使用し得る。そのようなタンパク質は、効率よく精製され、最終組成物の純度を正確に測定し得る。さらには、マーカーの存在は、試験中の薬物組成物の研究及び分析を容易にし得る。例えば、マーカーは、患者において血清半減期、最適血清レベル、さらに組成物の分解産物の存否を測定するために利用することができる。

20

**【0181】**

他方、新生タンパク質は、毒性物質のような治療的に有効な化合物として作用する特定のマーカーを含み得る。これらのタンパク質は患者に投与され、タンパク質が同定されそれぞれのターゲットに結合されたと思われた後、治療用部分が遊離される。遊離は、電気的刺激、光化学的切断、または新生タンパク質によりターゲットされる領域にその部分が特に沈殿されるような他の手段であり得る。さらに、新生タンパク質から遊離後にのみ毒性となる修飾毒素のような部分を利用することができる。新生タンパク質はまた、取り込まれたマーカーに活性治療効果のある機能を授けたり、マーカーがその治療またはイメージング作用前に体内で分解することを防止する薬物担体としても作用し得る。

30

**【0182】**

新生タンパク質中の切断可能なマーカーの取り込みはさらに、マーカーの非天然部分を取り除いて、完全に天然な形状であるタンパク質の分離を容易にする手段を供給する。例えば、新生タンパク質中に導入された光開裂型ビオチンのような切断可能なアフィニティマーカーは、タンパク質の経済的な分離を容易とし、薬物組成物としてのそれ以後の用途のためにマーカーの除去を可能とする。

40

**【0183】**

マーカーの存在下において翻訳により調製されたタンパク質から成る薬物組成物はさらに、例えば、水分、油、脂質、ポリサッカリド、グリセロール、コラーゲン、またはこれら担体の組み合わせのような薬学的に受容可能な担体を含んでもよい。有用な免疫組成物は、ワクチンのような免疫活性組成物、ヒトにおいて疾患は障害治療のために使用され得る治療または予防薬のような薬学的活性組成物を含む。

50

## 【0184】

## I. キット

本発明による他の実施態様は、好ましくは、mRNAまたは遺伝子によってコードされた新生タンパク質中にマーカーを取り込む特定のミスアミノアシル・tRNAを含む無細胞翻訳を含み、共役された転写 翻訳系を必要とし、さらに疾病生物学的試料中でのみ検出可能である、診断用キットまたはエイドを指示する。そのようなキットは、ある種の疾患または障害の存在についてヒトまたは他の動物をスクリーンするための迅速な手段として有用であり得る。検出し得る疾患は、感染症、組織異常増殖及び遺伝的障害を含む。最も容易に試験できる生物学的試料は、血液、血清、組織、尿または便、出生前試料、胎児細胞、鼻細胞または髄液から成る試料を含む。一つの実例では、ミスアミノアシル<sup>fmet</sup> tRNAを、原核細胞を含む生物学的試料中の細菌の存在を検出する手段として使用し得る。キットは、タンパク質を合成するために必要な翻訳試薬に加えて検出可能な非放射性マーカーで電荷されたtRNA分子を含む。細菌特異性遺伝子を含む生物学的試料の添加は、翻訳に必要とされる核酸を供給する。これらの試料からの細菌は、コリシンE1のような細菌毒素またはいくつかのその他の細菌特異性透過化因子を使用して、選択的に分解される。細菌DNA由来の特定の遺伝子はまた、本明細書に参考文献として特に編入している、米国特許第4,683,195号によって説明されているように、特定のオリゴヌクレオチドプライマーをポリメラーゼ鎖反応(PCR)と併用することにより、増幅され得る。マーカーを含む新生タンパク質は、必然的に細菌から生産されるべきである。他のマーカーまたは他のタイプの検出キットを使用して、特定の細菌感染が同定し得る。

10

20

## 【0185】

本発明はまた、前記に説明するGFTTを可能とするキットも考案する。例えば、本発明は、家族性腺腫性ポリープ症のような特定の疾患を検出するためのキットを考案する。家族性腺腫性ポリープ症の症例の約30~60%において、疾病組織はまた、APC遺伝子の鎖終止またはトランケート型転写物を含んでいる(S.M. Powell et al., N. Engl. J. Med. 329:1982~87, 1993)。鎖終止は、フレームシフトがUAG、UAAまたはUGAのような終止コドンを、リーディングフレーム内に出現させて、翻訳を終結する場合に起こる。サブレッサーtRNAをコードするミスアミノアシル・tRNAを使用して、そのような転写物を安価なキットで迅速かつ直接に検出し得る。これらのキットは、翻訳系、例えば、光開裂型クマリン・ピオチンのような検出マーカーを含む電荷サブレッサーtRNA及び適切な緩衝液と試薬を含む。そのようなキットはまた、プライマーまたは「プレプライマー」を含み、前者はプロモーター、RBS、開始コドン、アフィニティータグのコード領域及び鑄型の相補領域を含み、後者はプロモーター、RBS、開始コドン、アフィニティータグのコード領域を含むが、鑄型の相補領域を欠如している。プレプライマーは、鑄型の相補領域の連結を可能とする(使用する特定の鑄型の特製化を可能とする)。疾病細胞、組織または分離DNAまたはmRNAあるいはDNAのPCR産物のような生物学的試料は系に添加して、系をインキュベートし、さらに産物を分析する。分析及び、必要に応じて分離は、HRPに結合されたストレプトアビジンを使用して、その蛍光により特異的に検出され得るクマリンまたはピオチンのようなマーカーによって容易となる。そのようなキットは、迅速で、感度の高い、疾患の存否についての選択的非放射性診断用アッセイを供給する。

30

40

## 【実施例】

## 【0186】

以下の実例は、本発明による実施態様を例示するが、本発明の範囲を限定するものと考察されるべきではない。以下の実例のいくつかにおいて、以下のような特定の試薬及び方法が使用された:

## 試薬:

tRNA<sup>fmet</sup>、アミノアシル・tRNAシントナーゼ、アミノ酸、緩衝塩、及びリボヌクレアーゼ・フリー・ウオーター(リボヌクレアーゼを含まない水)は、Sigma(St. Louis, MO)から購入した。多数の蛍光色素は、Molecular Probes(Eugene, OR)から購入した。ルーチンキットを含む翻訳サプライは、Promega(Madison, WI)から購入した。Sephadex G-

50

25は、Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) から購入した。インビトロ翻訳キット及びCAT (PinPoint (登録商標)) 及びルシフェラーゼ (pBESTluc (登録商標)) をコードするプラスミドDNAは、Promega (Wisconsin-Madison, WI) から、DHFR プラスミド DNA (pQE16-DHFR) は、Qiagen (Valencia, CA) からそれぞれ購入した。-ヘモリジン用プラスミドDNA、pT7-WT-H6- HLは、Prof. Hagan Bayley (Texas A & M University) よりの提供であり、-HL DNAの大規模調製は、Qiagenプラスミド分離キットを使用して行った。バクテリオオブシンプラスミドDNA (pKKbop) は、実験室ストックから使用した。

#### 【0187】

フルオロタグtRNAの調製：

精製tRNA<sup>f<sup>met</sup></sup>をまずメチオニンでアミノアシル化した。典型的な反応では、1500 pM (~1.0 OD<sub>260</sub>)のtRNAを過剰アミノアシルtRNAシントナーゼを使用して、アミノアシル化ミックス中、37 °Cで45分インキュベートした。インキュベーション後、混合物に0.1容積 (pH 5.0) の3 M酢酸ナトリウムを添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (25 μl)。メチオニンの -アミノ基への蛍光分子のNHS-誘導体の結合は、50 mM 炭酸ナトリウム (pH 8.5) 中で、アミノアシル・tRNA<sup>f<sup>met</sup></sup> (25 μl) に蛍光試薬 (最終濃度 = 2 mM) を加えて、0 °Cで10分インキュベートすることにより行われ、反応はリジン (最終濃度 = 100 mM) の添加により停止された。修飾tRNAをエタノールで沈殿して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム (0.5 × 5 cm) を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70 °C) した。アミノアシルtRNAの修飾度は、酸尿素ゲル電気泳動によって評価した。このtRNAは、正しく保管される場合は、少なくとも6ヶ月は安定であることが発見された。

#### 【0188】

タンパク質の無細胞合成及びその検出：

インビトロ翻訳反応は、典型的には、最適化プレミックスを加えたE. coli T7転写 翻訳システム (Promega) を使用して行った。典型的な翻訳反応混合物 (10 μl) は、抽出物 3 μl、プレミックス 4 μl、完全アミノ酸ミックス 1 μl、30 pM 蛍光メチオニンtRNA及び適切なプラスミドDNA 0.5 μgを含んだ。最適化プレミックス (1×) は、57 mM HEPES (pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び16 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応は、37 °Cで45分進行させた。SDS-PAGEには、反応ミックスのアリコート 4~10 μlを、5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1×ローディングバッファー (loading buffer) に溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmliに従って行われ、アルゴンレーザーを励起源として使用するMolecular Dynamics FluorImager 595を使ってゲルをスキャンした。他方、ポリアクリルアミドゲル中の新生タンパク質はまた、UVトランスイルミネーターを使用して検出され、緑色フィルター (Tiffen green #58、Polaroid DS34 camera フィルターキット) を装備したポラロイドカメラを使って、写真撮影を行った。

#### 【0189】

BODIPY-FL標識タンパク質の可視化には、530+/-30狭バンド励起フィルターを装備した488 nmを励起源として使用した。ゲルは、PMT 電圧 1000 V、さらに100/200ミクロンピクセルサイズを使用してスキャンした。

酵素/タンパク質活性：

-ヘモリジンの生物学的活性は以下のように行われた：要するに、インビトロ翻訳反応混合物の様々なアリコート (0.5~2 μl) を500 μlのTBSA (1 mg/ml BSAを含むトリス緩衝生理食塩水、pH 7.5) に添加した。これに、ウサギ赤血球 (rRBCs) 10%溶液 25 μlを加え、室温で20分インキュベートした。インキュベーション後、このアッセイミッ

10

20

30

40

50

クスを1分間遠心分離して、上清の吸光度を415 nmで測定した（ヘモグロビンの遊離）。TBSA 500  $\mu$ l中でインキュベートした等量のrRBCsを対照としてとり、水 500  $\mu$ l中でインキュベートしたrRBCsを100%溶解とした。DHFR活性を分光光度計で測定した。ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega）を使用して測定し、さらにルミネッセンス（発光）は、Packard Lumi-96ルミノメーターを使用して測定した。

#### 【0190】

-HLの精製及び -HLへのBODIPY-FL取り込みの測定：

-HL（His<sub>6</sub>）をコードするプラスミドの翻訳を100  $\mu$ lスケールで行い、Talon-Sepharose（ClonTech）を製造元の指示に従って使用して、生産された -HLを精製した。 -HL中に取り込まれた蛍光を次に、幾つかの既知濃度の（標準として使用された）遊離BODIPY-FLと共に、Molecular Dynamics FluorImagerで測定した。同一試料中にあるタンパク質の量は、Pierceタンパク質アッセイキット（Pierce, Rockford, IL）を使用して、標準Bradfordアッセイにより測定した。

10

#### 【0191】

〔FLAG捕捉アッセイ（Capture Assay）〕

（FLAG抗体のビオチン化）

FLAG M2モノクローナル抗体（SIGMA Chemical, St. Louis, MO）ストック液 4.4 mg/mLを等量の100 mM重炭酸ナトリウム（ $\sim$ 15 mM最終抗体濃度）で希釈する。その後、NHS-LC-Biotin（Pierce Chemical, Rockford, IL）を、最終濃度が150 mMとなるように、2 mMストック液（DMF中）を加える。反応は氷上で2時間インキュベートする。この混合物を次に、マイクロ遠心分離（14,000 R.P.M）で2.5分間遠心分離することにより清澄させる。未反応標識試薬は、ゲル濾過クロマトグラフィーによって除去する。

20

（FLAG抗体コートELISAプレートの調製）

NeutrAvidin（登録商標）ビオチン結合タンパク質（Pierce Chemical, Rockford, IL）を、最終濃度が100 mM重炭酸ナトリウム中で50 mg/mLになるように希釈して、Microlite（2+ 白色不透明 96-ウェル ELISA プレート（Dyner Technologies, Chantilly, VA）をコートするために使用する。プレートをTBS-Tで洗浄し、TBS-T中の5 mg/mLビオチン化FLAG M2抗体溶液を使用してコートする。プレートをTBS-Tで洗浄し、翻訳希釈緩衝液（TDB）[TBS（pH 7.5）中、4.5% Teleostean Gelatin、2% 脱脂粉乳、10 mM EDTA、0.1% Tween-20、1.25 mg/mL 免疫前マウスIgG、2.5 mM d-ビオチン]でブロックする。

30

#### 【0192】

（ターゲットタンパク質の結合と検出）

ウサギ網状赤血球抽出物を使用して、インビトロ翻訳によって生産されたトリプル・エピトープタグ付きターゲットタンパク質を、TDBで1/25～1/75に希釈して、抗体でコートされたELISAプレートに添加する。ターゲットタンパク質の捕捉後、プレートをTBS-Tで洗浄する。c-mycの検出を、ポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）、次にペルオキシダーゼ標識二次抗体を使用して実施する。His<sub>6</sub> タグの検出はペルオキシダーゼ標識ニッケルキレートベース・プローブ（India（His Probe-HRP）, Pierce, Rockford, IL）で達成される。抗体はTDBで希釈され、India（His Probe-HRP）は免疫前マウスIgG 5 mg/mLを補充したTBS-Tで希釈される。全ての場合、シグナルが発生には化学ルミネッセント基質系を使用する。

40

#### 【0193】

〔Hisタグ 金属アフィニティー捕捉ELISAアッセイ〕

（ターゲットタンパク質の結合と検出）

ウサギ網状赤血球抽出物を使用して、インビトロ翻訳によって生産されたトリプル・エピトープタグ付きターゲットタンパク質を、1% BSA/TBS-Tで1/25～1/75に希釈して、ニッケルキレートでコートしたELISAプレート（Pierce Chemical, Rockford, IL）に添加する。ターゲットタンパク質の捕捉後、プレートをTBS-Tで洗浄し、1% BSA/TBS-Tでブロックする。結合ターゲットタンパク質上のエピトープタグの検出は、モノクローナルFLAG M2抗体（SIGMA Chemical, St. Louis, MO）またはポリクローナルc-myc抗体（Santa Cruz

50

Biotechnology, Santa Cruz, CA) を、適切なペルオキシダーゼ標識二次抗体と併用することにより達成される。ビオチン - リジシ・tRNA<sup>lys</sup> を介してターゲットタンパク質中に取り込まれたビオチンの検出は、ペルオキシダーゼに抱合されているNeutrAvidin (商標) ビオチン結合タンパク質 (Pierce Chemical, Rockford, IL) を使用して達成される。NeutrAvidin (登録商標) 抱合体及び全ての抗体は、1% BSA/TBS-Tで希釈する。全ての場合、シグナルが発生には化学ルミネッセント基質系を使用する。

#### 【0194】

[実施例1]: マーカーの調製

クマリンアミノ酸の合成: 4-(プロモメチル)-7-メトキシクマリン (図15、化合物1; 6.18 mM) 及びジエチルアセトアミドマロン酸塩 (図15、化合物2; 6.18mL) を、無水エタノール中でナトリウムエトキシド溶液に添加して、混合物を4時間還流した。反応混合物の中和及びクロロホルム抽出後に得られた中間生成物 (図15、化合物3) をさらに、メタノール溶液から結晶化によって精製した。この中間生成物をアセトン及びHCl (1:1) の混合物中に溶解して、1時間還流した。反応混合物を乾燥するまで蒸発して、アセトンを使用してアミノ酸塩酸塩を沈降した。この塩酸塩は、50%エタノールに溶解しさらにピリジンを添加してpH4~5にすることにより、遊離アミノ酸 (図15、化合物4) に転化された。遊離アミノ酸のプロトン (<sup>1</sup>H) NMRスペクトルは以下であった: (m.p. 274~276(C、分解)) -OCH<sub>3</sub> ( 3.85 s, 3H)、-CH<sub>2</sub>- ( 3.5 d, 2H)、-CH- ( 2.9 t, 1H)、CH-CO ( 6.25 s, 1H)、環H ( 7.05 s, 1H)、 ( 7.8 d, 2H)。

#### 【0195】

クマリンFmoc誘導体の合成: クマリンアミノ酸 (1.14 mM) を、フルオレニルメチルオキシカルボニルN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (Fmoc-NHSエステル) 1.08 mM) と、1.14 mMトリエチルアミンの存在下、室温で30分反応させた。反応混合物を酸性化し、さらに沈降物を1 N HClで洗浄してから乾燥した。遊離アミノ酸のNMRスペクトルは以下であった: (MP 223~225 ) -OCH<sub>3</sub> ( 3.85 s, 3H)、-CH<sub>2</sub>Br ( 3.5 広域 一重項、2H)、-CH- ( 3.0 t, 1H)、CH-CO ( 6.22 m, 1H)、環H ( 7.05 s, 1H)、 ( 7.8 d, 2H)、フルオレン H CH<sub>2</sub>-CH ( 4.2 m, 2H)、CH<sub>2</sub>-CH ( 4.2 5 m, 1H)、特徴的多重項を示す芳香族領域。

#### 【0196】

PCBの合成: 光開裂型ビオチンは以下に説明するように合成された。2-プロモ, 2'-ニトロアセトフェノン (図15、化合物5) は、まずそのヘキサメチルテトラアンモニウム塩に転化され、これは次に分解されて2-アミノ, 2'-ニトロアセトフェノン (図15、化合物6) を得た。ビオチンN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (図15、化合物7; Sigma Chemical; St. Louis, MO) を、6-アミノカプロン酸 (図15、化合物8) と反応させて、その対応酸 (図15、化合物9) を得た。この酸を、DCCを使用して、2-アミノ, 2'-ニトロアセトフェノンと結合して、ケトンを得た (図15、化合物10)。ケトンは、水素化ホウ素ナトリウムを使用して還元され、アルコールが得られ (図15、化合物11)、これはさらに塩化ギ酸誘導体 (図15、化合物12) に転化された。誘導体 (化合物12) のプロトンNMRスペクトルは以下であった: ( 1.3 m, 3H)、 ( 1.4 m, 2H)、 ( 1.5 m, 5H)、 ( 1.62 m, 1H)、 ( 2.1 t, 2H) ( 2.4 t, 2H)、 ( 2.6 d, 1H)、 ( 2.8 m, 1H)、 ( 3.0 t, 1H)、 ( 3.1 m 1H)、 ( 4.15 qt, 1H) ( 4.42 qt, 1H)、 ( 5.8 t, 1H)、 ( 6.25 s, 1H)、 ( 6.45 s, 1H)、 ( 7.5 t, 1H)、 ( 7.75 m, 4H)、 ( 7.9 d, 1H)。

#### 【0197】

[実施例2]: tRNAのミスアミノアシル化

ミスアミノアシル・tRNAを生起するために使用される一般的ストラテジーを図16に示し、これはtRNA分子のトランケーション、ジヌクレオチド合成 (図17)、ジヌクレオチドのアミノアシル化 (図18) 及びリガーゼ媒介結合を含む。

a) トランケート型tRNA分子は、Neu 及び Heppel (J. Biol. Chem. 239: 2927~34, 1964) によって基本的に説明されるように、リジン及びアルカリホスファターゼの存在下

で、過ヨウ素酸分解によって生成された。要するに、4 mM 非電荷E. coli tRNA<sup>lys</sup> 分子 (Sigma Chemical ; St. Louis, MO) は、50 mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムと0.5 MリジンをpH 9.0、60 で30分、総容量50  $\mu$ lで、2回連続処理することによりトランケートされた。反応条件は常に50 以上で、10倍の過剰メタ過ヨウ素酸塩を使用した。過剰過ヨウ素酸塩は1 Mグリセロール5  $\mu$ lで処理することにより破壊された。溶液pHは、最終濃度が0.1 Mになるように、トリス・塩酸15  $\mu$ lを加えて、8.5に調整した。反応容量は、水 100  $\mu$ lを加えて150  $\mu$ lまで増加した。アルカリホスファターゼ(15  $\mu$ l、30ユニット)を加えて、次に反応混合物を60 で2時間再インキュベートした。インキュベーションに続いて、総tRNAのエタノール沈降、エタノール洗浄、ペレットの乾燥及びペレットの水20  $\mu$ lへの溶解が行われた。この工程を2回繰り返して、トランケート型tRNAが得られた。

10

## 【0198】

b) ジヌクレオチド合成は、基本的にはHudson (J. Org. Chem. 53 : 617~24, 1988) によって実施されたように行い、デオキシシチジン保護、アデノシン保護及びジヌクレオチド合成の3ステップ工程として説明することができる。

デオキシシチジン保護：全ての反応は、特記されない限りは室温で行われた。第一に、デオキシシチジンの5' 及び3' ヒドロキシル基を、4.1当量の塩化トリメチルシリルで、一定の攪拌を加えながら2時間反応させることにより保護した。環外アミノ官能基を1.1当量のFmoc-Clと3時間反応させることにより保護した。5' 及び3' ヒドロキシル基の脱保護は、0.05当量のKFを加えて30分インキュベートすることにより達成された。最終産物(図17、化合物19)は収率87%で生産された。リン酸基は、この化合物を、1当量のビス (2

20

クロロフェニル) ホスホクロリデイトを加えてインキュベートし、その混合物を0 で2時間インキュベートすることによって添加された。この場合の収率は、25~30%であった。

## 【0199】

アデノシン保護：塩化トリメチルシリル(4.1当量)をアデノシン残基に添加して、2時間インキュベートし、その後、1.1当量のFmoc-Clを導入して、インキュベーションを3時間持続した。TMS基は、上記に説明するように0.5当量のフッ素イオンで脱保護された。Fmoc保護アデノシン(化合物22)は収率56%で得られた。さらに2' ヒドロキシル基を保護するために、化合物22は1.1当量のテトライソプロピルジシロキシル塩化物(TIPDSCl<sub>2</sub>)で3時間反応され、68~70%の収率で化合物23を生産した。化合物は、ジオキサン中で20

30

当量のジヒドロピラン及び0.33当量のpトルエンスルホン酸を加えて4~5時間インキュベートすることにより、化合物24に転化された。この化合物は、テトラヒドロフラン、ピリジン、及び水の混合物中で8当量のフッ化アンモニウムテトラブチルを加えることにより、分離することなく、化合物25(図17)に直接に転化された。ジヌクレオチド合成：保護デオキシシチジン、化合物20、と保護アデノシン、化合物25(図17)を、テトラヒドロフラン中で、1.1当量の2クロロフェニルビス (1ヒドロキシベンゾトリアゾール)リン酸塩を加えて、30分間一定の攪拌を加えることにより結合させた。次に、Nメチルイミダゾールの存在下で、30分間1.3当量の保護アデノシン、化合物25を加えた。結合収率は、約70%であり、結合産物、化合物26、のプロトンNMRスペクトルは以下であった：( 8.76 m, 2H)、( 8.0 m, 3H)、( 7.8 m, 3H)

40

( 7.6 m, 4H)、( 7.5 m, 3H)、( 7.4 m, 18H)、( 7.0 m, 2H)、( 4.85 m, 14H)、( 4.25 m, 1H) ; ( 3.6 m, 2H)、( 3.2 m, 2H)( 2.9 m, 3H)、( 2.6 m, 1H)、( 2.0-1.2 m, 7H)。

## 【0200】

c) ジヌクレオチドのアミノアシル化は、保護マーカアミノ酸、Fmoc-クマリンをエステル結合でジヌクレオチドに結合することにより達成された。第一に、保護アミノ酸を、テトラヒドロフラン中で、6当量のベンゾトリアゾール 1  $\mu$ l オキシトリス (ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩及び60当量の1ヒドロキシベンゾトリアゾールで活性化した。混合物に持続的攪拌を加えながら20分インキュベートした。次に、3当量のNメチルイミダゾール中で1当量のジヌクレオチドを添加し、反応を室温で

50

2時間持続した。脱保護は、テトラメチルグアニジン及び、4-ニトロベンザアルドキシムを添加することにより行われ、さらに3時間攪拌を続けた。反応は、酢酸を添加し、さらに0℃で30分持続的に攪拌を加えインキュベートすることにより完了され、アミノアシル化ジヌクレオチドを生産した(図18)。

#### 【0201】

d) アミノアシル化ジヌクレオチドへのtRNAの連結は、基本的にはT.G. Heckler et al. (Tetrahedron 40 87~94, 1984) によって説明されるように実施した。要するに、トランケート型tRNA分子(8.6 O.D.<sub>260</sub> ユニット/ml)及びアミノアシル化ジヌクレオチド(4.6 O.D.<sub>260</sub> ユニット/ml)を、T4 RNAリガーゼ 340 ユニット/mlを加えて、4℃で16時間インキュベートした。反応緩衝液は、55 mM Na-Hepes (pH 7.5)、15 mM MgCl<sub>2</sub>、250 µM ATP、20 µg/ml BSA 及び10% DMSOを含んだ。インキュベーション後、反応混合物を最終濃度が50 mM NaOAc、pH 4.5 (10 mM MgCl<sub>2</sub>を含む)となるまで希釈した。最終混合物を、50 mM NaOAc (pH 4.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>で平衡化した、DEAEセルロースカラム(1 ml)に4℃で加えた。カラムを0.25 mM NaClで洗浄して、RNAリガーゼ及び他の非tRNA成分を除去した。tRNA含有分画をプールして、50 mM NaOAc (pH 4.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、及び1.0 M NaClで平衡化したBDセルロースカラムに4℃で装填した。未反応tRNAは、10 mlの同じ緩衝液で洗浄することにより除去された。精製ミスアミノアシル・tRNAは、25%エタノールを含む緩衝液でカラムを溶出することにより得られた。

#### 【0202】

[実施例 3]: 抽出物及び鋳型の調製

抽出物の調製: コムギ胚芽胚抽出物は、シクロヘキサノールと四塩化炭素の混合物(1:6)を使用して、胚濃厚化のためにコムギ胚芽の浮上により調製し、その後一晩乾燥した(約14時間)。浮上コムギ胚芽胚(5 g)は、微細な粉末を得るために5 gの粉末ガラスを加えて、モルタル中で粉碎した。滑らかなペーストが得られるまで、抽出用媒質(緩衝液I: 10 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.6)、1 mM 酢酸マグネシウム、90 mM 酢酸カリウム、及び1 mM DTT)を少量ずつ加えた。破壊された胚を含むホモジネート及び抽出用媒質 25 mlを23,000 x gで2回遠心分離した。抽出物をSephadex G-25微細カラムにかけて、緩衝液II(10 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.6)、3 mM 酢酸マグネシウム、50 mM 酢酸カリウム、及び1 mM DTT)で溶出した。明るい黄色バンドがゲル粒子以外の容量で移動し、1 mlの分画として回収(S-23)され、液体窒素中で凍結された。

#### 【0203】

鋳型の調製: 鋳型DNAは、プラズミドpSP72-bopをEcoRIで線形化することにより調製した。制限線形鋳型DNAは、フェノール抽出及びDNA沈降により精製した。大規模mRNA合成は、SP6-ribomax system (Promega; Madison, WI)を使用して、インビトロ転写によって行った。精製mRNAは、使用の直前に67℃で10分変性した。

#### 【0204】

[実施例 4]: 無細胞翻訳反応

取り込み混合物(100 µl)は、S-23抽出物を50 µl、5 mM 酢酸マグネシウム、5 mM トリス酢酸(pH 7.6)、20 mM Hepes-KOH 緩衝液(pH 7.5); 100 mM 酢酸カリウム、0.5 mM DTT、0.375 mM GTP、2.5 mM ATP、10 mM クレアチンリン酸、クレアチンキナーゼを60 µg/ml及びバクテリオオプシンをコードする遺伝配列を含むmRNAを100 µg/ml含んだ。ミスアミノアシル・PCB-リジンまたはクマリンアミノ酸・tRNA<sup>lys</sup>分子を、170 µg/ml加え、マグネシウムイオン及びATP濃度を最適化した。混合物を25℃で1時間インキュベートした。

#### 【0205】

[実施例 5]: PCB-リジンを含む新生タンパク質の分離

ストレプトアビジンでコートされた磁性Dynabeads M-280 (Dyna; Oslo, Norway)は、1 mgビーズ当たり10 µgのビオチン化タンパク質の結合能力を有する。濃度2 mg/mlでビーズを少なくとも3回洗浄して、安定化BSAを除去した。新生タンパク質中に取り込まれたPCB-リジンを含む翻訳混合物に、ストレプトアビジンでコートされたビーズを加えて混

合し、室温で30分インキュベートした。磁性粒子集線装置 (MPC: magnetic particle concentrator) (Dynal; Oslo, Norway) を使用して、0.5~1.0分磁場をかけ、上清をピペットで取り除いた。反応混合物を3回洗浄して、磁性ビーズを50  $\mu$ lの水に懸濁した。

【0206】

Black-Ray 長波長 UV ランプ、Model B-100 (UV Products, Inc.; San Gabriel, CA) を使用して、クオーツキュベット中で光分解を行った。発光ピーク強度は、365 nmで、約1100  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>であった。磁性捕捉を反復して、ビーズを取り除いた。得られた新生タンパク質を定量し、収率は推定70~95%であった。

[実施例 6]: 蛍光を使用する検出の下限

ホウ酸塩緩衝液 (pH8.0) 中に0.25 mg/mlになるように懸濁したウシ血清アルブミン (BSA) を、50 mg/ml の25倍モル過剰フルオレサミン (Sigma Chemical; St. Louis, MO) と合わせて、修飾蛍光BSAを生産した。修飾タンパク質の様々な量 (1 ng、5 ng、10 ng、25 ng、50 ng、75 ng、100 ng、150 ng、200 ng) をローディングバッファー (プロモフェノールブルー、グリセロール、2-メルカプトエタノール、トリス・塩酸 (pH 6.8)、SDS) 中に懸濁して、3%濃縮剤を加えた12%ポリアクリルナミドゲルの1.5 mmの厚さの個別ウェル中に添加した。水冷ゲルを50Vで4時間電気泳動した。電気泳動後、ゲルを電気泳動装置から除去して、UVトランスイルミネーター上に配置し、10秒の露光時間を使用してpolaroid Type 667フィルムを使って写真撮影をした。これらの条件で観察された最低限度は10 ngであった。これらの結果は、典型的な分子生物学実験室で見られる装置を使用して、蛍光標識タンパク質は、ng量単位で検出され得ることを示した。さらに高

【0207】

[実施例 7]: クマリン アミノ酸を含む新生タンパク質

無細胞翻訳を、ベンゾピレン・フルオロフォア部分と結合されたリジンでミスアミノアシル化された電荷tRNA<sup>lys</sup> 分子及びリジンに対する21コドンを含むヒト  $\beta$ -インターフェロンmRNAを使用して、説明したように実施する。混合物の試料は、プロモフェノールブルー、グリセロール、2-メルカプトエタノール、トリス・塩酸 (pH 6.8)、SDSを含む緩衝液を補充して、分子量マーカーセットと共に、12%ポリアクリルアミドゲル (3%濃縮剤) に直接加える。電気泳動を50Vで3時間行う。ゲルを電気泳動装置から除去して、UV光線下で写真撮影をする。蛍光標識インターフェロンタンパク質のバンドは、分子量約25 Kdaで特異的に検出される。ゲル上では他の有意な蛍光活性は観察されない。遊離ミスアミノアシル・tRNA分子は、ゲルの外に電気泳動され、特に検出されないであろう。

【0208】

[実施例 8]: 薬物組成物のインビボ半減期

無細胞翻訳反応は、上記に説明するように化学的ミスアミノアシル化により調製され、TE中で1.7 mg/ml) となるように懸濁されたPCB-クマリンアミノ酸・tRNA<sup>leu</sup> 10  $\mu$ l、S-23抽出物 50  $\mu$ l、水 10  $\mu$ l及び10  $\mu$ lの50 mM酢酸マグネシウム、50 mMトリス酢酸 (pH 7.6)、200 mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 7.5); 1 M酢酸カリウム、5 mM DTT、3.75 mM GTP、25 mM ATP、100 mMクレアチンリン酸から成る溶液及び600  $\mu$ g/mlのクレアチンキナーゼを混合することにより実施される。この混合物を、組み換え型IL-2 cDNAから転写かつ分離された500  $\mu$ g/mlヒトIL-2mRNA (26ロイシンコドンを含む) を20  $\mu$ l追加するまで、氷上に保持する。混合物は、25  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートして、氷上に置く。ストレプトアビジンでコートした磁性Dynabeads (2 mg/ml) 100  $\mu$ lを混合物に加えて、室温で30分放置する。インキュベーション後、混合物をマイクロフュージで3,000 x g、5分間遠心分離するか、またはMPCを使用して溶液に磁場をかける。上清を取り除いて、TEを使用して手順を3回繰り返す。最終洗浄ペレットを、50 mMトリス・塩酸 (pH7.5) 50  $\mu$ lに再懸濁し、クオーツキュベットに移す。Black-Ray 長波長 UV ランプからのUV光線を、約1秒懸濁液に照射する。MPCで溶液に1.0分磁場をかけてから、上清をピペットで除去する。上清を滅菌濾過して、50%グリセロール、1.8% NaCl及び25 mM 重炭酸ナトリウムを含む等量の滅菌緩衝液を加えて混合する。タンパク質濃度は、O.D.<sub>260</sub>を測定することによ

り決定される。

【0209】

最終組成物（濃度1 mg/ml）0.25 mlを、2匹のBalb/c miceの尾静脈中に経静脈注射する。2匹の対照マウスはまた、比較可能量の緩衝液を注射される。様々な時点（0、5分、15分、30分、60分、2時間、及び6時間）において、血清試料 100  $\mu$ lを足裏から得て、0.9%生理食塩水 400  $\mu$ lに加える。血清試料を、抗クマリン抗体でコートされたdynabeads（2 mg/ml）溶液に添加して、室温で30分インキュベートする。MPCで溶液に1分磁場をかけてから、上清をピペットで除去する。470 nmにおける蛍光を測定し、試料をラットIL-2タンパク質特異性モノクローナル抗体で処理する。IL-2タンパク質含量を各試料について定量し、これを検出された蛍光量に等しいと考える。得られた結果より、インビボIL-2半減期は正確に決定される。

10

【0210】

[実施例 9]： -ヘモリジン中への様々なフルオロフォアの取り込み

*E. coli* tRNA<sup>fmet</sup> をまずメチオニンで定量的にアミノアシル化し、幾つかのフルオロフォアのNHS 誘導体を使用して、 -アミノ基を特異的に修飾した。試験された蛍光レポーター分子（フルオロフォア）のリスト及びその特性を表2に示す。修飾条件下で、修飾メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup> は安定であることが、酸 尿素ゲルによる評価によって発見されている。試験された全ての蛍光分子は、異なる光学特性（励起及び発光）を有するために、我々は、新生タンパク質を含むゲルの定量のために使用された条件下で、相対蛍光強度を測定した。

20

【0211】

新生タンパク質の蛍光検出は、 -ヘモリジン（ -HL）をモデルタンパク質（C末端His<sub>6</sub>-tag付き）として使用してまず評価を行った。 -HLは、比較的小型タンパク質（32 kDa）であり、インビトロ翻訳で効率的に生産され得た。さらに、その活性は、ウサギ赤血球溶血アッセイを使用して、タンパク質翻訳混合物中で直接に測定し得る。 HLのインビトロ翻訳は、*E. coli* T7 S30転写/翻訳抽出物（Promega Corp., Madison, WI）を使用して、上記に説明されたように幾つかの異なる修飾メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup> の存在下で行われた。反応後、アリコート（3~5  $\mu$ l）をSDS-PAGE分析にかけ、蛍光バンドが検出され、FluorImager F595（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）を使用して定量された。

30

【0212】

データを図20に示す。レーン1はDNAを含まない対照である。レーン2は、BODIPY-FL-SSEの結果を示す。レーン3は、BODIPY-FL-SEの結果を示す。レーン4は、NBDの結果を示す（構造については表2を参照）。レーン5は、Bodipy-TMRの結果を示す。レーン6は、BODIPY R6Gの結果を示す。レーン7、8、9及び10は、FAM、SFX、PYMPO 及び TAMRAで得られた結果をそれぞれ示す（構造については表2を参照）。

【0213】

この結果は、BODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>（レーン2と3）の存在下で生産された -HLが最も強い蛍光を呈示したことを明らかに指摘する（全てのデータは、BODIPY-FL-SSEについて正規化される）。2つの異なるBODIPY-FL試薬（BODIPY-FLスルホスクシンイミジルエステル（SSE）及びBODIPY-FLスクシンイミジルエステル（SE））は、溶解度に関してのみ異なる。評価されたフルオロフォアで次に最も好ましいものは、6（テトラメチルローダミン 5（及び6）カルボキシアミド）ヘキササン酸、スクシンイミジルエステル（TAMRA-X、SE）で、BODIPY-FL-SSEの35%蛍光（相対蛍光に補正された）を呈示した。BODIPY、BODIPY-TMR、SE（6（（4,4ジフルオロ 1,3ジメチル 5（4-メトキシフェニル）4ボラ 3a,4aジアザ s インダセン プロピオン酸）アミノ）ヘキササン酸、スクシンイミジルエステル）及びBODIPY-R6G、SE（4,4ジフルオロ 5フェニル 4ボラ 3a,4aジアザ s インダセン 3プロピオン酸、スクシンイミジルエステル）から成る2つの他の形状は、BODIPY-FL、SSEの蛍光の3%以下しか呈示しなかった。ニューロキニン 2レセプター中に既に取り込まれている蛍光分子である、スクシンイミジル6（7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジオゾール-4-yl）アミノヘキササン酸塩（NBD-X-

40

50

SE)、はBODIPY-FL-SSEの蛍光の6%のみを呈示した。2つのフルオレセイン類似体、5-(及び6)-カルボキシフルオレセイン、スクシンイミジルエステル(FAM, SE)及び6-(フルオレセイン-5-(及び6)カルボキシアミド)ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル(SFX, SE)はまた極めて低い蛍光を示した(BODIPY-FLと比較して、それぞれ8.4%及び4.6%)。

#### 【0214】

##### [実施例 10]: 最適化取り込み

新生タンパク質中に取り込まれるBODIPY-FL量を最適化するために、存在するBODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>量を反応当たり3~60 pMの範囲で増加して、-HLの翻訳反応を行った。反応は、ウサギ赤血球の溶血活性によって測定されるHLと同様な量を生産し、これは、この範囲内で外因的に添加されるBODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>は、タンパク質合成を阻害しないことを示した。対照的に、HLに対応する蛍光バンド強度は、10 µl反応当たり30 pM BODIPY-FL-メチオニン・tRNAまで増加を続けた(データの表示なし)。このレベル以上の増加は、蛍光を増加を生じることではなく、従って、以後の反応はこのBODIPY-FL-メチオニン・tRNAレベルを使用して実施した。

BODIPY-FL取り込みを最適化するために使用した第二ステップは、反応混合物からNホルミルテトラヒドロ葉酸塩(fTHF)を省くことに基づいた。原核細胞では、Nホルミルテトラヒドロ葉酸塩(fTHF)は、酵素メチオニン・tRNAトランスホルミラーゼの補因子として作用し、メチオニンによるアミノアシル化後に開始tRNAをホルミル化する。タンパク質合成は、次にこの修飾tRNA(ホルミルメチオニン・tRNA)を使用して開始される。本発明をいずれの特定メカニズムに限定することなく、反応混合物からfTHFを省くことは、この内在性開始tRNAと外因的に添加された修飾開始tRNA間のタンパク質合成開始に対する競合を、内在性開始tRNAのホルミル化を防止することにより、低減すると考えられる。これは、反応混合物中にfTHFが存在する、また存在しない場合の反応についてのSDS-PAGEから直接蛍光を測定することにより確認された。後者の場合、2~3倍の蛍光増加が見られた(データの表示なし)

##### [実施例 11]: 他のタンパク質中への取り込み

このアプローチの一般的適応性を探索するために、BODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>を使用する転写/翻訳反応を、ジヒドロフォレート還元酵素(DJFR)、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(アセチル基転移酵素)(CAT)及びバクテリオロドプシン(BR)をコードする様々なプラスミドDNAを使用して実施した。BRは、膜タンパク質を代表するために含まれ、典型的には極めて疎水性である。他のタンパク質への取り込みを調査するために、Talon金属キレート樹脂(Clontech, Palo Alto, CA)を使用して、遊離BODIPY-FL及びBODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>と共に、最適共役化された転写/翻訳系を使用した。結果は図21A(レーザーベースのMolecular Dynamics FluorImager 595を使用して可視化)、及び21B(UVトランスイルミネーターを使用して可視化)に示す。レーン1はDNAを含まない対照である。レーン2、3、4、5及び6は、それぞれ、ヘモリジン、DHFR、ルシフェラーゼ、CAT及びバクテリオロドプシンである。

#### 【0215】

蛍光バンドは、各タンパク質について、対応する関連分子の位置で蛍光スキャナーを使用して観察される。ルシフェラーゼの場合、内部メチオニンにおける偽開始による予想産物に対応するバンドが観察される(Promega Technical Bulletin TB219)。全てのタンパク質に対応するバンドはまた目視により、さらに>450 nmである光線を通す発光フィルターと組み合わせたUVトランスイルミネーター(UVP TMW-20)を使用して写真撮影によっても観察された。この場合の励起は、300~400 nmから伸びるBODIPY-FLのUV吸光バンド内で生じるらしい。

#### 【0216】

BODIPY取り込み量を次に、BODIPY-FLの異なる濃度からなる溶液との比較、さらにBradfordタンパク質アッセイをそれぞれ使用して、精製試料中に存在する取り込まれたBODIPY-FL量及びタンパク質量を測定することによって決定した。3度の測定値の平均は、モル比

0.29+/-0.03%を生じた。しかし、トリプトファン及びチロシンのようなタンパク質残基を有するBODIPY-FLの蛍光消光が、水溶液中のBODIPY-FLと比較して蛍光量子収率を低下するであろうから、取り込み収率は、より高いものと思われる。

#### 【0217】

合成された新生タンパク質活性への蛍光標識手順の影響をさらに評価した。これは、インビトロ発現クローニング及びインビトロテクノロジーである他のプロテオミク適用の場合のような、下流機能分析の実施を所望するような場合には重要である。N末端蛍光標識がタンパク質の機能を修飾する可能性があるが、低モル取り込みレベル（~0.3%）は、抽出物の総活性を大幅に修飾はしないはずである。これは、様々な酵素アッセイにより確認されており、BODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>が存在する場合、また存在しない場合に合成されたDHFR、 $\beta$ -HL及びルシフェラーゼについて測定された活性には有意差がないことが発見されている（表3を参照）。

10

#### 【0218】

##### [実施例 12]：感度の測定

本方法の感度を評価するために、オリジナル反応混合物 0.003~0.5  $\mu$ lに対応する翻訳抽出物の様々な希釈液をSDS-PAGEで分析した。対照として、DNAを欠損して実施された反応からの抽出物を分析した。図22Bに見られるように、オリジナル反応混合物の0.007  $\mu$ lに対応するほど少量の $\beta$ -HLバンドからの蛍光が検出可能であった。インビトロ系において生産される総新生タンパク質、50~80  $\mu$ g/mlの範囲、に関する我々の推定に基づく、これは、0.35~0.5 ngのヘモリジンに対応する。これは、新生タンパク質のそのような低い発現はX線フィルムへの長時間の曝露を必要とし、その結果重大なバックグラウンド問題を生じることのある、新生タンパク質のラジオアイソトープ標識を使用して得られる感度に劣ることはない。これはさらに、市販されているクーマシーブルー（8~100 ng）を使用して現在ゲル上でタンパク質を測定する感度を超越している。BODIPY-FL取り込みレベルを向上し、さらにゲル材料、抽出物及び添加された修飾tRNAにおける蛍光不純物に起因すると思われるバックグラウンド蛍光を低減することによって、感度はさらに改善されると予測される。

20

#### 【0219】

##### [実施例 13]：時間の関数としての合成

新生タンパク質合成を時間の関数としてモニタするための蛍光標識アプローチの能力をまた評価した。この目的には、 $\beta$ -HL転写/翻訳混合物の少量アリコート（4  $\mu$ l）を、反応中の様々な時間に取り出して、SDS-PAGEで分析した。図22Aに見られるように、 $\beta$ -HLに起因するバンドは、早い場合はインキュベーション開始5分後に明らかに検出され得る。蛍光標識 $\beta$ -HLの合成は、翻訳の15分後には飽和状態となるとと思われる。

30

#### 【0220】

##### [実施例 14]：修飾試薬

ミスアミノアシル・tRNAを形成するために使用されるアミノアシル化後修飾の場合、重要な要素は、天然アミノ酸に修飾を加えるために使用される修飾試薬である。例えば、フルオロフォアBODIPY FLの場合は、BODIPY-FL-SE 及び BODIPY-FL-SSE（Molecular Probes）として知られる2種類の異なる市販のBODIPY FL NHS試薬がある。どちらの試薬も、脱離基としてN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）に基づいている。しかし、スルホン酸（スルホ）基の一つの形状（SSE）の存在により、この2つの形状は水溶解性が異なる（構造については表2を参照のこと）。この実例では、これらの2種類の異なる試薬を使用して、メチオニンによってアミノアシル化されている精製tRNA<sup>fmet</sup>に、BODIPY FLフルオロフォアを添加することを目的として、標準生化学的手順に基づく最適化反応を行った。この目的には、まずtRNA<sup>fmet</sup>をメチオニンでアミノアシル化した。典型的な反応では、1500 pM（~1.0 OD<sub>260</sub>）のtRNAを過剰量のアミノアシル・tRNAシンテターゼを使用して、アミノアシル化ミックス中、37 °Cで45分インキュベートした。アミノアシル化ミックスは、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液（pH 7.5）、150 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM ATP 及び 1600 ユニットのアミノアシル・tRNAシンテターゼから構成された。アミノアシル化度は、酸

40

50

尿素ゲル、さらに<sup>35</sup>S メチオニンを使用することにより測定した。インキュベーション後、混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム (pH5.0)を添加して中和し、グロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1)を行った。エタノール (2.5容積)を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解して (37.5 (1)、修飾に使用した。

#### 【 0 2 2 1 】

##### ( A ) BODIPY-FL-SSEによるアミノアシル・tRNAの修飾

上記のアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO<sub>3</sub> 2.5 (lを加え (最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次に水中で10 mM BODIPY-FL-SSE溶液 10 (l (Molecular Probes)を加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じる溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を水50mlマイクロリットルに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム (0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70 )した。

10

#### 【 0 2 2 2 】

##### ( B ) BODIPY-FL-SEによるアミノアシル・tRNAの修飾

上記のアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO<sub>3</sub> 2.5 (lを加え (最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次にDMSO 20 (l (Molecular Probes)を加え、その後、DMSO で10 mM BODIPY-FL-SE溶液 10 (l (Molecular Probes)を加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じる溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を水 50mlに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム (0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70 )した。

20

#### 【 0 2 2 3 】

##### ( C ) 分析

メチオニンの アミノ基の修飾度は、NHSBODIPY FL試薬の非スルホン酸化形と比較してNHS BODIPY FLのスルホン酸化形を使用することにより、実質的に高くなることが、HPLCを使って経験的に発見されている。さらに、スルホン酸化形を使用して形成されたミスアミノアシル・tRNA<sup>fmet</sup>は、優れた特性を呈示することが発見されている。BODIPY FLをタンパク質 (T7プロモーター制御下でHL遺伝子を含むプラズミドを使用するヘモリジン) 中に取り込むために、最適化S30 E.coli翻訳系において使用されると、発現されたHLに対応するSDSPAGEゲル上のバンドは、非スルホン酸形を使用して形成されたミスアミノアシル化を使う同様な系と比較して、アルゴンレーザーベースの蛍光イメージャーを使用して検出される際に、約2倍高い蛍光レベルを呈示した。

30

#### 【 0 2 2 4 】

##### ( D ) クマリン

上記に説明されたことと同様な結果が、クマリンの非スルホン化及びスルホン化NHS誘導体、これらはまた市販されており、それぞれスクシンイミジル7 アミノ メチル アミノ 酢酸クマリン (AMCA-NHS; Molecular Probes) 及びスルホスクシンイミジル7 アミノ 4 メチルクマリン 3 酢酸 (AMCA-sulfo-NHS; Pierce Chemicals) として言及されている、を比較することにより得られた。この場合は、メチオニンによってアミノアシル化されている精製tRNA<sup>fmet</sup>に、クマリンフルオロフォアを添加するために、標準生化学的手順に基づくこれらの2種類の異なる試薬を使用して、最適化反応を行った。

40

#### 【 0 2 2 5 】

上記に説明するアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO<sub>3</sub> 2.5 (lを加え (最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次に水中で10 mM スクシンイミジル7 アミノ 4-メチルクマリン 3 酢酸溶液 (AMCA-sulfo-NHS; Pierce Chemicals) 10 (lを加えた。混合物を0 (Cで10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じる溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノール

50

で沈降した。沈降物を50mlの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70 )した。

【0226】

上記のアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO<sub>3</sub> 2.5 (lを加え(最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次にDMSO 20 (lを加え、その後、DMSO中で10 mM スクシンイミジル7 アミノメチル アミノ 酢酸クマリン溶液 10 μl (AMCA-NHS ; Molecular Probes)を加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した(最終濃度 = 100 mM)結果生じる溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を50mlの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70 )した。

10

【0227】

この場合は、クマリン NHS (AMCA-NHS) の非スルホン酸化形を使用して形成されたクマリン メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>は、標準E. coli S30翻訳混合物中で使用される際に、標準UVトランスイルミネーターからのUV光線を使用して検出するときに、極めて低レベルの検出性蛍光バンドを生じた。対照的に、同一の手順を使って添加される際は、スルホン化形(AMCA-スルホ-NHS)は、UVトランスイルミネーターを使用することにより容易に検出されるバンドを生じる。

【0228】

メチオニンの アミノ基の修飾による開始tRNAを使用して、クマリンを取り込む試みは、文献上で報告されているが、失敗に終わっている。開始tRNAへのクマリンの付着は、次に化学的クロスリンカーを使用するより高度で複雑な化学的付着を必要とした。これは、まずtRNAをメチオニンでアミノアシル化し、次にアミノアシル・tRNAをDTDGモノスクシンイミジルエステル(DTDGは、ジチオジグリコール酸)と反応することにより達成された。反応生成物は、次にDTTを使用して還元され、さらにCPM(3' 4' マレイミドフェニル) 4' メチル ジエチルアミノクマリンと反応された。(Odom, O. W、Kudlicki, W 及び Hardestry, B. 1998. In vitro engineering using acyl-derivatized tRNA, In Protein synthesis Methods and Protocols (アシル誘導体化tRNAを使用するインビトロ工学、タンパク質合成方法及びプロトコル)、PP.93~103、Humana press、Totowa, NJ)。

各マーカーについて特別の手順をデザインする必要があるため、そのようなアプローチは、化学的アミノアシル化後手順によって、tRNAへの広範囲のマーカーの一般的な付着のためには実用的ではない。

20

30

【0229】

スルホン酸化NHS試薬を、tRNAの化学的アミノアシル化後に有用とする唯一の可能な要素は、水性緩衝液におけるその溶解度である。対照的に、BIDOPY FL NHS試薬のような非スルホン酸化試薬は、ポストケミカル・修飾にはDMSOのような有機性緩衝液を必要とする。有機性緩衝液の使用がなぜ総合的なマーカーの取り込みを低下するのかはまだ明らかではないが、一つの可能性は、アミノ酸とtRNA間に形成されたアミノアシル結合の加水分解が修飾の総合的レベルを低下することである。

40

【0230】

[実施例 15] : 水溶解度の分与

一般的に、水溶解度特性は、いくつかの方法によって化学試薬に分与することができる。これらのいくつかを以下に要約する :

(スルホン酸化NHSのような)脱離基への極性官能基の導入。

スパーサーアームへの極性官能基の導入。

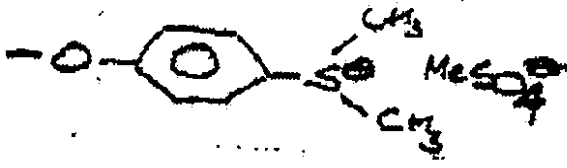
試薬部分それ自体への極性官能基の導入。

-SO<sub>3</sub>-Na<sup>+</sup> (スルホ-)基の導入が好ましいが、(DSPのような)他の極性電離基もまた使用することができ、DSPを以下に示す :

【0231】

50

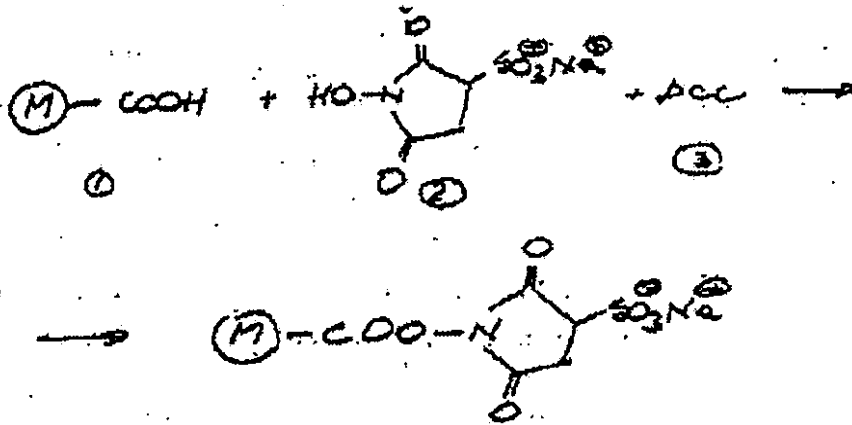
## 【化1】



最終水溶解度は、例えば、ポリエーテルスパーサー（例：テトラエチレングリコールに基づくようなもの）を使用することにより、スパーサーアーム中に巧みに操作処理することができる。一般的に、遊離カルボキシル基を有するいずれの部分も、そのスルホ NHS 10  
 活性エステルに転化することができる。この反応は、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド（N-hydroxy-sulfosuccinimide）（モノナトリウム塩）、マーカー及びDCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）のような共役因子を含む。

【0232】

## 【化2】



典型的な反応では、マーカー（1）、55 mMを10 mlのDMF（ジメチルホルムアミド）に溶解して、さらに（2）（5 mM）を添加し、次に（3）（1.1当量）を加える。混合物を室温で一晚攪拌し、沈殿物を濾過除去し、さらに室温減圧下で、濾液を蒸発する。必要に応じて、カラムクロマトグラフィーを使用して生成物を精製し、再結晶化する。 30

【0233】

本発明による一つの好ましい実施態様は、スルホン化NHS試薬を含むマーカーを使用するミスアミノアシル・tRNA形成のためのtRNAのポストケミカル・修飾を含む。そのような試薬は一般的には市販されていないが、様々な有用なマーカーから常套手段により生産され得る。例えば、UV及び可視励起に高い蛍光量子収率を有するフルオレセインは、スルホン酸化NHSを含む形に調製することが可能である。

【0234】

[実施例 16]：トリプルマーカーシステム

この実施例では、新生タンパク質を検出するために3マーカーシステム、すなわち、N末端マーカー、C末端マーカー、及びアフィニティマーカー（後者は内在性アフィニティマーカー）を使用する。実験は、1) マーカーを有するtRNAの調製、従ってマーカーが（翻訳中）にタンパク質のN末端に導入され得る；2) 野生型及び突然変異型ヘモリジンをコードする核酸でヘモリジンを翻訳；及び4) マーカーの定量を含む。 40

【0235】

1. ビオチン メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>の調製

精製tRNA<sup>fmet</sup>（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）をまずにメチオニンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応は、1500 PM (-1.0 OD<sub>260</sub>) tRNA、20 mM イミダ 50

ゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM メチオニン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシルtRNAシンターゼ (Sigma) を含んだ。反応混合物を37 °Cで45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (25 µl)。メチオニンの  $\epsilon$ -アミノ基へのNHS-ビオチンの結合は、50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 中で、アミノアシル・tRNA<sup>fmet</sup> (25 µl) にNHS-ビオチン (最終濃度 = 2 mM) を加えて0 °Cで10分インキュベートすることにより行われ、反応はリジン (最終濃度 = 100 mM) の添加により消光された。修飾tRNAをエタノールで沈降して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム (0.5 × 5 cm) を通過させて、遊離試薬が残っている場合は、これを除去した。

10

【0236】

2.  $\epsilon$ -HL DNAのインビトロ翻訳

WT及びアンバー (135位置) 突然変異型プラズミドDNAを、そのC末端にアミノ酸配列His-His His His His (His 6) (配列番号 5) を担う32 kDaタンパク質である、 $\epsilon$ -ヘモリジン (HL) をコードするために使用した。WT及びアンバー突然変異型  $\epsilon$ -HL 遺伝子 (Amb 135) のインビトロ翻訳を、E. coli T7環状転写/翻訳系 (Promega Corp., Wisconsin, WI) を使用して、ビオチン-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup> (AmberGen, Inc) の存在下で行った。100 µlの翻訳反応は、E. coli 抽出物 (Promega Corp., Wisconsin, WI) を30 µl、アミノ酸を含まないプレミックスを40 µl、アミノ酸混合物 (1 mM) を10 µl、WT及び突然変異体  $\epsilon$ -HL をコードするプラズミドDNAを5 µg、ビオチン-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup> を150 pM及びリボヌクレアーゼフリー・ウォーターを使用して行った。プレミックス (1×) は、57 mM HEPES (pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び16 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応プレミックスから、n<sup>6</sup>-ホルミル テトラヒドロ葉酸塩 (fTHF) が省かれた。翻訳は、37 °Cで1時間行われた。DNAを含まずにインキュベートされた翻訳反応混合物を対照とする。翻訳反応混合物が、等量のTBS (トリス緩衝生理食塩水、pH 7.5) で希釈された後、各試料を2つのアリコートに分割して、以下に説明するようにそれぞれプロセスした。

20

30

【0237】

3. 抗- $\epsilon$ -HL抗体マイクロ滴定プレートの調製

抗ウサギ IgGでコートされたマイクロ滴定プレート (Pierce Chemicals, Rockford, IL) をSuperblock緩衝溶液 (Pierce) で洗浄し、Superblock緩衝溶液中で調製した抗- $\epsilon$ -HLポリクローナル抗体溶液 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 100 µg/mlを加えて、マイクロ滴定プレートシェーカー (振とう器) 上で、室温で1時間インキュベートした。プレートを次にSuperblock緩衝液で洗浄して (3回 × 200 µl)、将来の使用のために4 °Cで保存した。

【0238】

4. N末端 (ビオチン) マーカーの定量

対照、WT及びアンバー  $\epsilon$ -HL DNA用の翻訳反応混合物 (50 µl) を、抗- $\epsilon$ -HL抗体マイクロ滴定プレートの異なるウェル内にいれ、シェーカー上で、室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、200 µl のSuperblock緩衝液で、ウェルを5回洗浄し (各5~10分)、上清を捨てた。これらのウェルに、100 µlの1:1000希釈ストレプトアビジン 西洋ワサビペルオキシダーゼ (Streptavidin-HRP; 0.25 mg/ml; Promega) を加え、プレートを振とう条件下で、室温で20分インキュベートした。インキュベーション後、Superblock緩衝液で念入りに洗浄することにより (各5回 × 5分)、過剰ストレプトアビジン HRPを取り除いた。最後に、HRP (HRP緩衝液中のOPD) 用基質 200 µlを加えて、分光高度計を使用して、441 nmで吸光度を測定することにより、HRP活性を測定した。

40

【0239】

50

### 5. C末端 (His-6-タグ) マーカーの定量

対照、WT及びアンバー<sup>-</sup>HL DNA用の実施例2からの翻訳反応混合物(50 μl)を、抗<sup>-</sup>HLマイクロ滴定プレートの異なるウェル内にいれ、シェーカー上で、室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、200 μlのSuperblock緩衝液で、ウェルを5回洗浄し(各5~10分)、上清を捨てた。これらのウェルに、100 μlの1:1000希釈抗-His-6抗体(Clontech, Palo Alto, CA)を加え、プレートを振とう条件下で、室温で20分インキュベートした。インキュベーション後、Superblock緩衝液で念入りに洗浄することにより(各5回 x 5分)、過剰抗体を取り除いた。その後、ウェルに二次抗体(抗マウスIgG HRP、Roche-BM, Indianapolis, IN)を加えて、室温で20分インキュベートした。過剰二次抗体を洗浄後、上記に説明するようにHRP活性を測定した。

10

【0240】

### 6. N及びC末端マーカーのゲルフリー定量

上記に説明する定量の結果を図23A(N末端、ピオチンマーカーの定量)及び図23B(C末端、His-6マーカー)に示す。ピオチン-メチオニン・tRNAの存在におけるWT<sup>-</sup>HL DNAのインビトロ転写/翻訳の場合は、合成されたタンパク質は、タンパク質のC末端部に翻訳されたHis-6タグを有し、<sup>-</sup>HL分子のいくつかは、さらにそのN末端部に、ピオチン-メチオニン・tRNAを使用して取り込まれた、ピオチンを担うであろう。<sup>-</sup>HLを含む全翻訳反応混合物が、抗<sup>-</sup>HL抗体プレート上でインキュベートされた場合は、選択的に全ての<sup>-</sup>HLが、抗体と内在性アフィニティーマーカーとの相互作用によりプレートに結合するであろう。非結合タンパク質は洗浄除去され、結合タンパク質のN及びC末端は、ストレプトアビジン HRP及び抗His-6抗体を使用して、それぞれ定量し得る。WT<sup>-</sup>HLの場合は、タンパク質は、N末端(ピオチン)及びC末端(His-6)タグのどちらも担い、従って、どちらの場合もHRPシグナルを生じ、ストレプトアビジン HRP及び二次抗体 HRPが使用されたHis-6と抱合するであろう(HL、図23A)。他方、アンバー突然変異型<sup>-</sup>HLの場合は、<sup>-</sup>HLのN末端フラグメント(最初の134アミノ酸のみが生産され、N末端マーカー、ピオチンのみを有するが、コドン番号135におけるアンバー突然変異のためにHis-6マーカーを有しないであろう。この突然変異の結果、アンバー<sup>-</sup>HL DNAを使用して生産されたタンパク質は、抗体プレートと結合するが、ストレプトアビジン-HRP(HL-AMB、図23A)の場合のみにシグナルを生じ、抗hisX6抗体(HL-AMB、図23B)にはシグナルを生じないであろう。

20

30

【0241】

#### [実施例 17] 電気泳動易動度シフトアッセイ

膜の存在における光分解またはオリゴマー形成のいずれかによるSDSゲル上の蛍光標識新生タンパク質の電気泳動易動度の変化を実証するために、我々は、C末端にアミノ酸配列His-His His His His His (His-6)(配列番号5)を担う32 kDaタンパク質をコードする<sup>-</sup>ヘモリジン(<sup>-</sup>HL)のプラスミドDNAを使用した。<sup>-</sup>HL遺伝子のインビトロ翻訳は、E. coli T7環状転写/翻訳系(Promega Corp., Wisconsin, WI)を使用して、BODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>(AmberGen, Inc)の存在下で行った。本実験は、1)翻訳中のN末端マーカーの導入のためのtRNAマーカーの調製、2)翻訳、3)精製、4)プロテアーゼ処理、または5)オリゴマー形成を含んだ。

40

【0242】

#### 1. BODIPY-FL-メチオニンtRNAの調製:

BODIPY-FL-メチオニン・tRNAは、まず精製tRNA<sup>fmet</sup>(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)をメチオニンを使用してアミノアシル化し、次にメチオニンの<sup>-</sup>アミノ基をBODIPY-FL-SSE(4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセンプロピオン酸、スルホスクシンイミジルエステル; Molecular Probes, Eugene, OR)を使用して修飾することにより調製した。典型的なアミノアシル化反応(100 μl)は、1500 pM(-1.0 OD<sub>260</sub>) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液(pH 7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM メチオニン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシルtRNAシンテターゼ(Sigma)を含んだ。反応混合物を37°Cで45分インキュベートした。インキュベーション

50

後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム (pH5.0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (25  $\mu$ l)。メチオニンの  $\gamma$ -アミノ基へのBODIPY-FL-SEの結合は、50  $\mu$ l の反応容積中で、50 mM 重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を使用して、25  $\mu$ lのアミノアシル・tRNA<sup>fmet</sup> (1.5 nM) に10  $\mu$ lのof BODIPY-FL-SSE (10 mM) を加えて、0 で10分インキュベートすることにより行われ、反応はリジン (最終濃度 = 100 mM) の添加により消光した。修飾tRNAをエタノールで沈降して、さらにペレットをリボヌクレアーゼフリー・ウオーターに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム (0.5  $\times$  5 cm) を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。

【 0 2 4 3 】

2 .  $\gamma$ -ヘモリジン DNAのインビトロ翻訳  
100  $\mu$ Lの翻訳反応は、E. coli 抽出物 (Promega Corp., Wisconsin, WI) を30  $\mu$ l、アミノ酸を含まないプレミックスを40  $\mu$ l、アミノ酸混合物 (1 mM) を10  $\mu$ l、 $\gamma$ -HL をコードするプラズミドDNAを5  $\mu$ g、150 pMのBODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup> 及びリボヌクレアーゼフリー・ウオーターを含んだ。プレミックス (1 $\times$ ) は、57 mM HEPES (pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び6 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応プレミックスから、n ホルミルテトラヒドロ葉酸塩 (fTHF) を省いた。翻訳は、37 で1時間行われた。DNAを含まずにインキュベートされた翻訳反応混合物を対照とする。

【 0 2 4 4 】

### 3 . His-6- $\gamma$ -HLの精製

50  $\mu$ lの翻訳反応混合物 (上記より) を、His-6-  $\gamma$ -HL精製のために、Talon-Sepharose (ClonTech, Palo Alto, CA) クロマトグラフィーにかけた。これは粗抽出物を、150 mM NaCl を含む50 mM トリス・塩酸 (pH 8.0) で予め平衡化したTalon-Sepharose カラム上に装填し、さらに非結合タンパク質を除去するためにカラムを洗浄することにより行った。結合タンパク質は次に上記緩衝液に100 mMイミダゾールを加えることにより溶出された。溶出された  $\gamma$ -HLは、50 mMトリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析された。

【 0 2 4 5 】

### 4 . プロテアーゼ検出用EMSA

精製蛍光標識  $\gamma$ -HL (-5  $\mu$ g) (実施例3) を、50 nM酢酸緩衝液 (pH5.0) (100:1; タンパク質：プロテアーゼ比) 中で、0.05  $\mu$ gの精製トリプシン (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) を加えて、37 で5分インキュベートした。タンパク質分解反応は、1X SDSゲルローディングバッファーを加え、試料を5分煮沸することにより停止された。SDS-PAGE は、4~20%勾配ゲル (ready-gel, Bio-Rad, Richmond, CA) を使用して、Laemmli (Laemmli, U. K. 1970、Nature 227, 680~685) により説明されるように行った。ゲル電気泳動後、ゲルを、FluorImagerF 595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を使用して目視観察した。

【 0 2 4 6 】

$\gamma$ -HLの極めてはっきりした切断を得るために、トリプシンは極めて限定された条件 (シングル・ヒット動態学) の元で使用された (50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0)、100:1: タンパク質：プロテアーゼ比、37 で5分)。これらの条件下で、 $\gamma$ -HL中のグリシン濃厚ループが最も切断されやすく、その結果、17 kDaのタンパク質分解性フラグメントが観察された (Vecesey-Semjen, B., Knapp, S., Mollby, R., Goot, F.G. 1999、Biochemistry, 38 4296~4302)。蛍光標識  $\gamma$ -HLが極めて弱いトリプシン処理を受けると、その結果として、 $\gamma$ -HL の切断は、SDS-PAGE上の蛍光バンドの易動度の変化の証拠として、約17~18 kDaの大きさのN末端フラグメントを発生した (図24レーン1は、未処理タンパク質、レーン2はプロテアーゼ処理タンパク質)。この結果は、そのようなアッセイは、新生タンパク質の電気泳動易動度シフトを起因する可能性がある、プロテアーゼ、またはキナーゼ、トランスフェラーゼ等のようなその他の酵素活性をスクリーンするために使用すること

10

20

30

40

50

が可能であることを示す。この特定のアッセイには我々は精製新生タンパク質を使用した  
が、精製されていない新生タンパク質（全翻訳反応混合物）を使用できないという理由は  
ない。

#### 【 0 2 4 7 】

##### 5 . 膜上にある新生タンパク質のオリゴマー形成用EMSA

全翻訳反応混合物（10  $\mu$ l）（上記参照）を、ウサギ赤血球（rRBCs、Charles River F  
arm, CT）が存在する場合と存在しない場合について、0 で30分インキュベートした。イン  
キュベーション後、過剰非結合 -HLを除去するために洗浄し、さらに1 mg/ml BSAを含  
む（TBSA）トリス緩衝生理食塩水（TBS）中でrRBCs を37 で20分インキュベートし、その  
期間中にrRBCsの分解が起こった。rRBC膜を遠心分離後に分離して、1X SDS-ゲル ローデ  
ィングバッファーに溶解して、試料を加熱しないで、SDS-PAGE（4~20%勾配ゲル）にか  
けた。ゲル電気泳動後、FluorImager F595を使用してゲルを目視観察した。

10

#### 【 0 2 4 8 】

-HLは溶解性単量体タンパク質を発現し、様々な膜の存在において、オリゴマー化し  
てヘプタメリック孔を形成し得る（Walker, B., Krishnasastriy, M., Zorn, L., Kasi  
anowicz, J. 及び Bayley, H., 1992, J. Biol. Chem. 267, 10902~10909）。さらに、  
オリゴマーのいくつかの中間形もまた観察された。この実験では、脂質膜の存在における  
オリゴマー形成に起因する -HL易動度のシフトを検出するためのEMSAの適応性を観察す  
るために、全翻訳反応混合物を（全く精製しないで）使用した。新生 -HLを含む全翻訳  
抽出物にrRBCを加えてインキュベートすると、rRBC膜上に -HLのオリゴマー形成を起因  
し、SDS抵抗性である様々な分子量に対応するはっきりした蛍光バンドを生じた（図25：  
レーン1は未処理タンパク質のみを示し、レーン2はrRBCで処理したタンパク質を示す）。

20

#### 【 0 2 4 9 】

この結果は、そのようなアッセイは、タンパク質の研究に使用することができ、様々な  
天然及び人工膜と相互作用し、さらに結果としてタンパク質の易動度がシフトされること  
を実証する。

##### [ 実施例 18 ] : リジン・tRNA<sup>lys</sup>を使用する取り込み

この実施例は、リジン-tRNA<sup>lys</sup>を使用する、新生タンパク質中への蛍光標識の取り込み  
を説明する。より詳しくは、様々な蛍光分子は、リジン・tRNA<sup>lys</sup>を使用して、1) E coli  
翻訳系における翻訳中にヘモリジン、及び2) コムギ胚芽系における翻訳中にルシフェ  
ラーゼ中に取り込まれる。実験は、1) tRNAマーカ化合物の調製、2) 翻訳、及び3) ゲ  
ル上の検出を含んだ。

30

#### 【 0 2 5 0 】

##### 1 . 蛍光標識ミスアミノアシル・tRNA<sup>lys</sup>の調製

精製tRNA<sup>lys</sup>（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）をまずにリジンでアミノアシル化し  
た。典型的なアミノアシル化反応（100  $\mu$ l）は、1500 pM（-1.0 OD<sub>260</sub>） tRNA、20 mM  
イミダゾール・塩酸緩衝液（pH 7.5）、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM リジン、2 mM ATP、150  
mM NaCl 及び過剰量のアミノアシル・tRNAシテターゼ（Sigma）を含んだ。反応混合物  
を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢  
酸ナトリウム（pH 5.0）を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出（1：1）  
を行った。エタノール（2.5容積）を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解し  
た（25  $\mu$ l）。リジンの -アミノ基への様々な蛍光分子のNHS-誘導体（表2を参照）の  
結合は、50 mM CAPS緩衝液（pH10.5）中で、アミノアシル・tRNA<sup>lys</sup>（25  $\mu$ l）に蛍光  
試薬（最終濃度 = 2 mM）を加えて0 で10分インキュベートすることにより行い、反応は  
リジン（最終濃度 = 100 mM）の添加により消光した。修飾tRNAをエタノールで沈降して、  
さらにペレットをリボヌクレアーゼフリー・ウォーター 50  $\mu$ lに溶解して、Sephadex G-  
25ゲル濾過カラム（0.5  $\times$  5 cm）を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、こ  
れを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存（  
-70 ）した。アミノアシル・tRNAの修飾度は、酸 尿素ゲル電気泳動（Varshney, U., L  
ee, C.P. 及びRajBhandary, U.L., 1991 J. Biol. Chem 266, 24712~24718）により評

40

50

価された。

【0251】

2. 原核性 (E. coli) 翻訳抽出物におけるタンパク質の無細胞合成

典型的な翻訳反応混合物 (10  $\mu$ l) は、E. coli 抽出物 (Promega Corp., Wisconsin, WI) を3 $\mu$ l、プレミックスを4  $\mu$ l、アミノ酸ミックス (1 mM) を1 $\mu$ l、30 PM 蛍光リジン・tRNA、ヘモリジン (HL) プラズミドDNAを0.5  $\mu$ g含んだ。プレミックス (1 $\times$ ) は、57 mM HEPES (pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び6 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応は、37  $^{\circ}$ Cで45分進行させた。SDS-PAGEには、反応ミックスのアリコート 4~10  $\mu$ lを、5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1 $\times$ ローディングバッファーに溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmli (Laemmli, U.K. 1970, Nature, 227, 680~685) に従って行った。

10

【0252】

3. 真核性 (TnTコムギ胚芽) 翻訳抽出物における無細胞合成

典型的な翻訳反応混合物 (10  $\mu$ l) は、TnTコムギ胚芽抽出物 (Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI) を5 $\mu$ l、TnT反応緩衝液を0.4  $\mu$ l、アミノ酸ミックス (1 mM) を1 $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼを0.2  $\mu$ l、30 pM 蛍光リジン・tRNA、及びルシフェラーゼRNA (Promega) を0.5  $\mu$ g、さらにリボヌクレアーゼフリー・ウオーターを含んだ。翻訳反応は、37  $^{\circ}$ Cで45分進行させ、不溶性物質を除去するために反応混合物を5分遠心分離した。清澄抽出物を次に5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1 $\times$ ローディングバッファーに溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmli (Laemmli, U.K. 1970, Nature, 227, 680~685) に従って行った。

20

【0253】

4. 新生タンパク質の検出

新生タンパク質を含むゲルは、アルゴンレーザー (488 nm) を励起源として、FluorImager 595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を使用してスキャンし、さらにポリアクリルアミドゲル内の新生タンパク質は、UVトランスイルミネーターを使用して検出し、Tiffen緑色フィルターを装備したポラロイドカメラ (Polaroid, Cambridge, MA) を使って、写真撮影を行った。図26A及び26Bは、様々な蛍光tRNA<sup>lys</sup>の存在において生産されるHLのインビトロ翻訳の結果を示す。この結果から、NBD、フルオレセイン誘導体等のような色素を含む、ミスアミノアシル・tRNA (フルオロフォア修飾リジン・tRNA<sup>lys</sup>) を使用して新生タンパク質中に様々な蛍光分子を取り込むことができることは明白である (レーン1: DNAを含まない対照; レーン2: BODIPY-FL-SSE (4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセンプロピオン酸、スルホスクシンイミジルエステル); レーン3: BODIPY-FL-SE (4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセンプロピオン酸、スクシンイミジルエステル); レーン4: NBD-X-SE (スクシンイミジル6-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジメチル-4-yl) アミノヘキサン酸塩; レーン5: BODIPY-TMR-SE ((6-994,4-ジフロロ-1,3-ジメチル-5-(4-メトキシフェニル)-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-2-プロピオニル) アミノ) ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル; レーン6: BODIPY-R6G-SE ((4,4-ジフロロ-5-フェニル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3プロピオン酸、スクシンイミジルエステル); レーン7: FAM-SE (5-(6-)-カルボキシフルオレセイン、スクシンイミジルエステル); レーン8: SFX-SE (6-フルオレセイン-5-(and 6-)カルボキシアミド) ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル); レーン9: PyMPO-SE (1-(3-(スクシンイミジルオキシカルボニル)ベンジル)-4-(5-(4-メトキシフェニル)オキサゾール-2-yl) 臭化ピリジニウム (PyMPO)); 及びレーン10: TAMRA-SE (6-(テトラメチルローダミン-5-(and-6)-カルボキシアミド) ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル)。

30

40

【0254】

50

[ 実施例 19 ] : クマリンのNHS誘導体

2種類のBODIPY分子(すなわち、BODIPY-FL-SSE と BODIPY-FL-SE)について上記の結果が得られたため、取り込みに適するように他のマーカーを誘導体化する試みが行われた。本実施例は、1) 標識tRNAの調製、2) 翻訳、及び3) 標識(またはマーカー)を含む新生タンパク質の検出を含む。

【 0 2 5 5 】

1 . 蛍光標識メチオニン・ tRNA<sup>fmet</sup>の調製

精製tRNA<sup>fmet</sup> (Sigma Chemicals, St. Louis, MO)をまずにメチオニンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応(100  $\mu$ l)は、1500 pM (約1.0 OD<sub>260</sub>) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液(pH 7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び 過剰量のアミノアシル・tRNAシンテターゼ(Sigma)を含んだ。反応混合物を37 °Cで45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム(pH 5.0)を添加して中和し、クロロホルム: 酸フェノール抽出(1:1)を行った。エタノール(2.5容積)を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した(25  $\mu$ l)。クマリンのNHS誘導体[要するに、スルホスクシンイミジル7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸 [1] (AMCA-sulfo-NHS; Pierce Chemicals)、Alexa 350-N-ヒドロキシ-スクシンイミジルエステル (Molecular Probes) 及び スクシンイミジル 7-aメチル-アミノ-酢酸クマリン (AMCA-NHS Molecular Probes)]のメチオニンの -アミノ基への結合は、50 mM 重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)中で、アミノアシル・tRNA<sup>fmet</sup> (25  $\mu$ l)に蛍光試薬(最終濃度=2 mM)を加えて0 °Cで10分インキュベートすることにより行い、反応は遊離リジン(最終濃度=100 mM)の添加により消光した。AMCA-NHSの場合は、試薬はDMSOに溶解され、結合反応は、40% DMSOの存在下で行われた。修飾tRNAをエタノールで沈降して、をリボヌクレアーゼフリー・ウオーター 50  $\mu$ lに溶解して、Sep hadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 x 5 cm)を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70 °C)した。アミノアシル・tRNAの修飾度は、酸 尿素ゲル電気泳動(Varshney, U., Lee, C.P. 及びRajBhandary, U.L., 1991 J. Biol. Chem 266, 24712~24718)により評価された。

【 0 2 5 6 】

2 . 原核性(E. coli)翻訳抽出物におけるタンパク質の無細胞合成

典型的な翻訳反応混合物(10  $\mu$ l)は、E. coli S-30抽出物(Promega Corp., Wisconsin, WI)を3  $\mu$ l、プレミックスを4  $\mu$ l、アミノ酸ミックス(1 mM)を1  $\mu$ l、30 pM 蛍光メチオニン・tRNA、及び ヘモリジン(-HL)プラズミドDNAを0.5  $\mu$ gを含んだ。プレミックス(1x)は、57 mM HEPES(pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び6 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応は、37 °Cで45分進行させた。SDS-PAGEには、反応ミックスのアリコート 4~10  $\mu$ lを、5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1xローディングバッファーに溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmli(Laemmli, U.K. 1970, Nature, 277, 680~685)に従って行った。

【 0 2 5 7 】

3 . 新生タンパク質の検出

新生タンパク質を含むゲルは、長波長用UV電球(>300 nm)を装備したUVトランスイルミネーターを使用して目視観察し、Tiffen緑色フィルターを装備したポラロイドカメラ(Polaroid, Cambridge, MA)を使って写真撮影を行った。図27は、様々な蛍光tRNAの存在において生産された -HLのインビトロ翻訳の結果を示す(レーン1は、DNAを含まない対照を示し; レーン2は、AMCA-NHSで修飾されたメチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>による結果を示し; レーン3は、AMCA-スルホ-NHSで修飾されたメチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>による結果を示し; さらにレーン4は、Alexa-NHSで修飾されたメチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>による結果を示す)。

明らかに、蛍光分子の水溶性NHSエステル（レーン3）によって修飾されたミスアミノアシル・tRNAを使用して、新生タンパク質中にクマリン誘導体分子を取り込むことができる。さらに、負の電荷を有する色素（Alexa、レーン4）は、その中性対（AMCA；レーン3）のようには取り込まないように思われる。

#### 【0258】

上記の結果及び本明細書による一般的教示より、当業者は、その他のマーカースを選択して、本発明による方法に従って、これを取り込みに適応する（例えば、化学的処理により）ことが可能である。

#### 【実施例 20】：毛管電気泳動

この実施例は、易動度シフトによるインビトロ合成蛍光タンパク質の検出のための毛管電気泳動（CE）の用途について説明する。この実施例は、1）BODIPYマーカースを含むtRNAの調製、2）インビトロ翻訳、3）精製、4）プロテアーゼ消化、及び5）易動度シフトアッセイによる検出を説明する。

#### 【0259】

##### 1. BODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>の調製

精製tRNA<sup>fmet</sup>をまずメチオニンでアミノアシル化した。典型的な反応では、1500 pM（～1.0 OD<sub>260</sub>）のtRNAを過剰量のアミノアシル・tRNAシントナーゼを使用して、アミノアシル化ミックス中、37℃で45分インキュベートした。アミノアシル化ミックスは、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液（pH 7.5）、150 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM ATP 及び1600 ユニットのアミノアシル・tRNAシントナーゼを含んだ。アミノアシル化度は、酸尿素ゲル、さらに<sup>35</sup>Sメチオニンを使用することにより測定された。インキュベーション後、混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム（pH5.0）を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出（1：1）を行った。エタノール（2.5容積）を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解して（37.5 μl）、修飾に使用した。上記のアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO<sub>3</sub> 2.5 μlを加え（最終濃度 = 50 mM、pH 8.5）、次に水中で10 mM BODIPY-FL-SSE溶液 10 μl（Molecular Probes）を加えた。混合物を0℃で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した（最終濃度 = 100 mM）。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc（pH 5.0）を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を50ulの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過コラム（0.5 × 5 cm）で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存（-70℃）した。

#### 【0260】

##### 2. Hs-6- $\alpha$ -ヘモリジン DNAのインビトロ翻訳

500 ulの翻訳反応は、E. coli 抽出物（Promega Corp., Wisconsin, WI）を150 ul、アミノ酸を含まないプレミックスを200 ul、アミノ酸混合物（1 mM）を50 ul、Hs-6- $\alpha$ -HLをコードするプラスミドDNAを25 ug、1000 pMのBODIPY-FL-メチオニン・tRNA<sup>fmet</sup>及びリボヌクレアーゼフリー・ウオーターを含んだ。プレミックス（1×）は、57 mM HEPES（pH 8.2）、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び16 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応プレミックスから、n<sup>6</sup>-ホルミルテトラヒドロ葉酸塩（fTHF）を省いた。翻訳は、37℃で1時間行われた。DNAを含まずにインキュベートされた翻訳反応混合物を対照とする。

#### 【0261】

##### 3. Hs-6- $\alpha$ -HLの精製

500 μlの翻訳反応混合物（上記ステップ2を参照）を、Hs-6- $\alpha$ -HL精製のために、Talon-Sepharose（ClonTech, Palo Alto, CA）クロマトグラフィーにかけた。これは粗抽出物を、150 mM NaClを含む50 mM トリス・塩酸（pH 8.0）で予め平衡化したTalon-Sepharose カラムに装填し、さらに非結合タンパク質を除去するためにカラムを洗浄することにより行った。結合タンパク質は次に上記緩衝液中で100 mMイミダゾールを加えることにより溶出された。溶出されたHs-6- $\alpha$ -HLは、50 mMトリス・塩酸緩衝液（pH 7.5）に対して透析

された。精製かつ透析した HLの蛍光をMolecular Dynamics FluorImager F595でチェックした。

【 0 2 6 2 】

4 . プロテアーゼ消化

精製蛍光標識 -HL ( ~5 ug ) ( 上記ステップ3を参照 ) を、50 mMトリス・塩酸緩衝液 ( pH 7.5 ) 中で、純正トリプシン ( Sigma Chemicals, St. Louis, MO ) 0.1 ugを加えて ( 50 : 1 ; タンパク質 : プロテアーゼ比 ) 、室温で10分インキュベートした。タンパク質分解反応は、1X CESDSゲルローディングバッファーを加えて試料を10分煮沸することにより停止された。

【 0 2 6 3 】

5 . 易動度シフトアッセイ

SDS-毛管電気泳動 ( SDS-CGE ) は、Bio-Rad BioFocus 3000CEシステムを使用して実施した。毛管は、内径75 um、全長24 cm、及び検出器までの長さ19.5 cmの熔融シリカ製であった。蛍光標識タンパク質試料 ( -HL ) 50 μlを、SDS-CGE試料ローディングバッファーを加えて混合し、95 で10分インキュベートした。毛管は、各注入前に、0.1 M NaOH、0.1 M HCl 及び SDS-ランバッファー で、それぞれ60、 60 及び120秒洗浄した。試料は電気泳動注入 ( 10 kVで20秒 ) を使用して注入した。分離は15 kV ( 定圧 ) で25分行った。毛管及び試料は20 で維持した。試料の検出は、488 nmアルゴンレーザー及び520 nm発光フィルターを使用して行った。

【 0 2 6 4 】

SDS-CGEの結果を図28に示す。図に見られるように、蛍光標識 -HLは、電気泳動条件下で24分付近で溶出される主要な種として移動する ( 上部パネル ) 。さらに、電気泳動図はまた試料中に存在する微量の不純物の存在を示し、これらは17及び20.5分付近で溶出される。蛍光標識 -HL試料をトリプシン処理して、SDS-CGEを使用して分析すると、早期 ( 13、14、及び15分 ) に溶出するピークと21分に主要ピークを示した ( 下部パネル ) 。この結果は、 -HLがトリプシンによりタンパク質分解されて、N末端が蛍光標識された様々なタンパク質分解フラグメントが電気泳動図に観察されることを示した。

【 0 2 6 5 】

[ 実施例 21 ] : ヘモリジンへの3マーカの取り込み

これは、ミスアミノアシル・tRNAを使用して取り込まれるマーカと共に、N及びC末端マーカが取り込まれるような条件下でインビトロでタンパク質が生産される事例である。実施例は、1) N末端及びC末端検出マーカを有するプライマーによるPCR、2) tRNAの調製、3) インビトロ翻訳、4) 新生タンパク質の検出を含む。

【 0 2 6 6 】

1 . -ヘモリジンDNAのPCR

-ヘモリジン、pT7-WT-H6- HLのプラスミドDNAを、以下のプライマーを使用して、PCR増幅した。

フォワードプライマー ( HL-5 ) は :

【 0 2 6 7 】

【 数 1 】

5' -GAATTC-TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA  
TATGGAACAAAAATTAATCTCGGAAGAGGATTTGGCAGATTCTGATATTAATA  
TTAAAACC-3' ( 配列番号11 )

リバースプライマー ( HL-3 ) は :

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

## 【数2】

5'-AGCTTCATTA-ATGATGGTGATGG-TGGTGAC 3' (配列番号12)

である。

フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーター、太字領域は、リボソーム結合部位 (Shine-Dalgarno配列)、太字及び下線配列は、C-mycエピトープを含み、イタリック体で示されるヌクレオチドは、-ヘモリジン配列の相補領域である。リバースプライマーでは、下線配列は、HisXエピトープ配列に対応する。100  $\mu$ lのPCR反応混合物は、鑄型DNAを100 ng、0.5  $\mu$ M 各プライマー、1 mM  $MgCl_2$ 、PCRマスターミックス (Qiagen, CA) を50  $\mu$ l、及びヌクレアーゼフリー・ウオーター (Nuclease free water) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 水を含んだ。PCRは、ホットリドを取り付けたHybaid Omni-E thermocycler (Hybaid, Franklin, MA) を使用して、以下の条件で行われた: 95 (2分) の後、95 (1分)、61 (1分)、及び72 (2分) から成るサイクルを35回繰り返し、最終伸長は72 で7分行った。PCR産物を次に、Qiagen PCR クリーンアップキット (Qiagen, CA) を使用して精製した。精製PCR DNAは、翻訳反応に使用された。

## 【0269】

2. BODIPY-FL-リジン・tRNA<sup>Lys</sup>の調製

精製tRNA<sup>Lys</sup> (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応は、1500 pM ( $\sim 1.0 OD_{260}$ ) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM  $MgCl_2$ 、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシルtRNAシンテターゼ (Sigma Chemicals, St. Louis, M) を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム: 酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (35  $\mu$ l)。この溶液に、0.5 M CAPS緩衝液 (pH 10.5) 5  $\mu$ lを加えて (最終濃度 50 mM)、その後10 mM BODIPY-FL-SSE溶液 10  $\mu$ lを加えた。混合物を0で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0) を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を50  $\mu$ lの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過コラム (0.5  $\times$  5 cm) で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70 ) した。アミノアシルtRNAの修飾度は、酸 尿素ゲル電気泳動によって評価した。Varshney et al., J. Biol. Chem. 266: 24712~24718 (1991)。

## 【0270】

## 3. 真核性 (コムギ胚芽) 翻訳抽出物におけるタンパク質の無細胞合成

典型的な翻訳反応混合物 (20  $\mu$ l) は、TnTコムギ胚芽抽出物 (Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI) を10  $\mu$ l、TnT反応緩衝液を0.8  $\mu$ l、アミノ酸ミックス (1 mM) を2  $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼを1  $\mu$ l、30 pM BODIPY-FL-リジン・tRNA<sup>Lys</sup>、プラズミドまたはPCR DNA (実施例1) を1~2  $\mu$ g、さらにリボヌクレアーゼフリー・ウオーター水を含んだ。翻訳反応は、37 で60分進行させ、不溶性物質を除去するために反応混合物を5分遠心分離した。清澄抽出物を次に5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1 $\times$ ローディングバッジファーに溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmli Nature, 227: 680~685に従って行った。

## 【0271】

## 4. 新生タンパク質の検出

電気泳動後、ゲルを、励起源としてアルゴンレーザーを備えるFluorImager 595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を使用してスキャンした。BODIPY-FL標識新生タンパク質の可視化には、最大励起に最も近値であるために励起源として488 nmを使用し、発光に

は、530+/-30フィルタを使用した。ゲルは、PMT 電圧 1000 V、さらに100または200マイクロンピクセルサイズのいずれかを使用してスキャンした。

【0272】

結果を図29に示す。図から、所望するマーカを含むPCR DNAからタンパク質をインビトロで生産し得ることが理解できる。この実施例の場合は、タンパク質（ $\alpha$ -ヘモリジン）は、N末端にC-mycエピトープを有し、さらにC末端にHisX6エピトープを有する。さらに、蛍光レポーター分子であるBODIPY-FLは、タンパク質中に取り込まれる。レーン1： $\alpha$ -ヘモリジンプラスミドDNA対照；レーン2：DNAを含まない対照；レーン3：PCR  $\alpha$ -ヘモリジンDNA及びレーン4：ヘモリジンアンバー135DNA。全てのレーンにおいて上部（T）及び下部（B）バンドは、コムギ胚芽抽出物中にあるいくつかのタンパク質、及び翻訳反応に存在する遊離蛍光tRNAと蛍光tRNAとのそれぞれ非特異的結合に由来する。

10

【0273】

[実施例 22]：プライマーデザイン

本発明を特定のプライマーに限定することは意図していない。新生タンパク質中に究極的にマーカを取り込む目的で、本発明において使用するために、（上記の説明のように）様々なプライマーが考案されている。この実施例は、1) マーカを有するプライマーによるPCR、2) インビトロ翻訳、及び3) 新生タンパク質の検出を含む。

【0274】

PCRには、以下のプライマーが使用された：

フォワードプライマー：

20

【0275】

【数3】

**5'GGATCCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGAACAAAAATTAATAT**  
**CGGAAGAGGATTTGAATGTTTCTCCATACAGGTCACGGGGA-3'**(配列番号13)

リバースプライマー：

【0276】

【数4】

**5'-TTATTAATGATGGTGATGGTGGTG-TTCTGTAGGAATGGTATCTCGTTTTTC-3'**  
(配列番号14)

30

フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーター、太字及び下線配列は、C-mycエピトープを含み、イタリック体で示されるヌクレオチドは、 $\alpha$ -ヘモリジン配列の相補領域である。リバースプライマーでは、太字配列は、His-6エピトープに対応し、下線配列は、 $\alpha$ -ヘモリジン配列の相補領域に対応する。100  $\mu$ lのPCR反応混合物は、100 ngの鋳型DNA、0.5  $\mu$ M 各プライマー、1 mM MgCl<sub>2</sub>、50  $\mu$ lのPCRマスターミックス（Qiagen, CA）及びヌクレアーゼフリー・ウォーター（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）水を含んだ。PCRは、ホットリドを取り付けたHybaid Omni-E thermocycler（Hybaid, Franklin, MA）を使用して、以下の条件で行われた：95（2分）の後、95（1分）、61（1分）、及び72（2分）から成るサイクルを35回繰り返し、最終伸長は72で7分行った。PCR産物を次に、Qiagen PCR クリーンアップキット（Qiagen, CA）を使用して精製した。精製PCR DNAは次に様々な翻訳反応に使用し得る。検出は上記に説明されたように行うことができる。

40

【0277】

結局、本発明は、特定の所望するエピトープに基づいて様々なプライマーデザインを考案する（エピトープの例示リストについては表4を参照のこと）。一般的に、エピトープはN末端またはC末端として挿入し得る。さらに、エピトープは、タンパク質中にアフィニティー領域（すなわち、抗体または他のリガンドと結合する領域）を導入するためにも使用し得る。

【0278】

50

【実施例 23】：プライマーをコードするエピトープの抗体検出

これは、アフィニティー領域がタンパク質中に取り込まれその後に検出されるような条件下でインビトロでタンパク質が生産される実例である。実施例は、1) エピトープをコードする配列を含むプライマーによるPCR、2) tRNAの調製、3) インビトロ翻訳、4) 新生タンパク質の検出を含む。

【0279】

1. プライマーをコードするエピトープによるPCR

ヒト結腸由来の全RNA (Clontech, Palo Alto, CA) に、ClonTech RT-PCR キットを使用して、ワンステップRT-PCR反応を行った。フォワードプライマー、PTT-T7-P53は、

【0280】

【数5】

**[5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA-TGGGACACCACCATC  
ACCATCACGGAGATTACAAAGATGACGATGACAAA-GAGGAGCCGCAGTCA  
GATCCTAGCGTCGA-3']** (配列番号15)

で、リバースプライマー、Myc-P53-3'は、

【0281】

【数6】

**[5'-ATTATTACAAATCCTCTTCCGAGATTAATT-TTTGTTCGTCTGAGTCAGGCC  
CTTCTGTCTTGAACATG-3']**(配列番号16)

であった。フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーター、イタリック体で示されるヌクレオチドは、His-6タグに対応し、太字の配列は、FLAG-エピトープをコードし、残りのプライマーは、P53 DNAの相補領域である。リバースプライマーでは、下線配列は、c-Mycエピトープ配列に対応する。

【0282】

50  $\mu$ l のRT-PCR/PCR反応混合物は、全ヒト結腸RNAを1  $\mu$ g、0.5  $\mu$ M 各プライマー、RT-PCRマスターミックス (ClonTech) を43.5  $\mu$ l、及びヌクレアーゼフリー、ウオーター (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 水を含んだRT-PCR/PCRは、PTC-150 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA) で、以下の条件を使用して行った：50 (1時間)、95 (5分) の後、95 (45秒)、60 (1分)、及び70 (2分) から成るサイクルを40回繰り返し、最終伸長を70 で7分を行った。PCR産物は、1%アガロースゲルで分析して、PCR増幅DNAは、さらに精製することなく翻訳反応に使用された。P53の人工C末端トランケート型突然変異体は、リバースプライマー、3'-P53-Mutが

【0283】

【数7】

**5'-CTCATTCAGCTCTCGGAACATC-TCGAAGCG-3'**(配列番号17)

である以外は、上記の説明と全く同じ手順を使用して調製された。

2. tRNA 標識

精製tRNA<sup>lys</sup> (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応 (100  $\mu$ l) は、1500 pM (-1.0 OD<sub>260</sub>) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシルtRNAシントラーゼ (Sigma) を含んだ。反応混合物

10

20

30

40

50

を37℃で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (35 µl)。この溶液に、0.5 M CAPS緩衝液 (pH 10.5) を5 µl加えて (最終濃度 50 mM)、その後10 mM BODIPY-FL-SSE溶液を10 µl加えた。混合物を0℃で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0) を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物をリボヌクレアーゼフリー・ウオーター 50 µlに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過コラム (0.5 × 5 cm) を通過して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70℃) した。アミノアシルtRNAの修飾度は、酸尿素ゲル電気泳動 [Varshney, U., Lee, C.P. 及び Rajbhandary, U.L., J. Biol. Chem. 266, 24712 ~ 24718(1991)、またはHPLC[Anal Biochem. 279: 218 ~ 225 (2000)] により評価された。

10

## 【0284】

## 3. 翻訳

P53 DNAの翻訳 (上記ステップ1を参照) は、蛍光tRNAの存在下 (上記ステップ2)、ウサギ網状赤血球翻訳抽出物中で行われた。

## 4. 検出

いったん翻訳が終了したら、アリコート (5 µl) をSDS-PAGEにかけて、FluorImager SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を使用して、新生タンパク質を目視観察した。目視観察後、ゲルをトランスファーバッファー (12 mM トリス、100 mM グリシン 及び0.01 % SDS、pH 8.5) 中に10分浸した。ゲルからのタンパク質は、次に標準ウェスタンブロッティング・プロトコルにより、BioRad液浸トランスファーユニットを1時間使用して、PVDF膜に転移された。転移後、次に転移量をチェックするために、膜をフェロジン (Ferrozine) / 鉄全タンパク質染色を使用して、1分逆染色し、その後、アンバーブロッキング溶液 (トリス緩衝生理食塩水 (pH7.5) 中、4.5% (容量/容量) teleosteanゼラチン、2% (重量/容量) 脱脂粉乳末、0.1% (重量/容量) Tween-20) を使って2時間ブロックして、その後適切に希釈した抗体を加えて、(4℃で12~15時間、定速シェーカー上で) 一晚インキュベートした。Flag検出には、2000倍希釈抗Flag M2抗体 (Sigma)、His-6検出には、500倍抗His6抗体 (Santa-Cruz Biotech, CA)、及びc-Myc検出には、500倍希釈抗C-Myc抗体 (Santa-Cruz Biotech, CA) を使用した。

20

30

## 【0285】

一次抗体インキュベーション後、膜をTBST (0.1% Tween-20を加えたトリス緩衝生理食塩水、pH 7.5) で4回 (各10分洗浄) 洗浄し、適切に希釈した二次抗体 (10,000倍希釈) を加えて、定速シェーカー上、室温で1時間インキュベートした。非結合二次抗体は、TBSTで (4洗浄/各10分) 洗浄され、ECL-Plus化学ルミネッセンス検出システム (Amersham-Pharmacia Biotech, NJ) を使用して、プロットを目視観察した。

## 【0286】

結果は図30A及び30Bに示す。図30Aは、DNA欠如ネガティブ対照及びp53DNAを加えた試料をそれぞれ含む、3複写プロットのゲルからのタンパク質転移後のPVDF膜の全タンパク質染色を示す。図30Bは、標準化学ルミネッセントウェスタンブロット法を使用して、3エピトープタグに対する抗体を使用してプローブされた同一プロット (全タンパク質染色は可逆性がある) を示す。矢印は、p53の位置を示す。

40

## 【0287】

## [実施例 24] : ガン遺伝子用ゲルベースPTT

タンパク質におけるランケート型突然変異の検出は、Roestと共同研究者らにより始めて報告され、Vogelstein、Kinzler及び共同研究者らにより、APC遺伝子におけるランケート型突然変異の検出に応用された。翻訳タンパク質におけるランケート型突然変異の検出は、フレームシフト、スプライシング、及び点突然変異によって起こり、その結果、遺伝子のリーディングフレーム内における終止コドンの出現を生じる。ランケート型ポリペプチ

50

ドは、放射線標識（例： $^{35}\text{S}$ -メチオニン）が存在するインビトロ系においてターゲット遺伝子に対応するDNAの特異的領域を翻訳し、さらに標準PAGE法を使用して結果生じたポリペプチドを分析することによって検出し得る。そのようなアプローチは、BRCA1/BRCA2、ATM、MHS2、MLH1を含む様々なガン関連遺伝子におけるトランケート型突然変異分析について報告されている。しかし、放射性アイソトープの使用は、検出に必要とされる時間（5時間以上）の点から問題があり、これは、高スループット分析には重大である。この理由で、放射能を検出のためのより迅速な手段に置き換えることは非常に好都合であろう。

【0288】

この実施例では、N末端タグの使用に基づく迅速トランケーション分析の可能性を実証する。本発明は、臨床的意義を持つ広範囲の遺伝子におけるトランケーション突然変異をスクリーンするための、便利で、正確かつ迅速な方法を供給する。実施例は、1) APC遺伝子に相補性である配列を有するプライマーによるPCR、2) tRNAの調製、3) インビトロ翻訳、4) 新生タンパク質の検出を含む。

10

【0289】

#### 1. 臨床試料のPCR

臨床試料は、常染色体優性ガン症候群である家族性腺腫性ポリープ症（FAP）の特徴である、APC遺伝子における鎖トランケーションについてのスクリーニングのために、ワシントン大学分子診断学検査室から付託された。ゲノムDNAを分離して、APC遺伝子の特定領域（エクソン15-セグメント2）が、まずT7プロモーターとKozak配列をDNA中に取り込んだプライマーを使用して、PCRにより増幅した。フォワードプライマー、T7-APC2は、

20

【0290】

【数8】

**[5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGATGCATGTGGA-ACTTTGTGG-3']**(配列番号18)

で、リバースプライマー、3'-APC2は、

【0291】

【数9】

30

**[5'-GAGGATCCATTAGAT-GAAGGTGTGGACG-3']**(配列番号19)

であった。フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーターであり、イタリック体で示す配列は、効率的な真核性翻訳開始に必要であるKozak配列に対応する。50  $\mu\text{l}$  のPCR反応混合物は、200~500 ngの 鋳型DNA（WTまたは突然変異体）、0.5  $\mu\text{M}$  各プライマー、及び25  $\mu\text{l}$  のPCRマスターミックス（Qiagen, CA）、さらにヌクレアーゼフリー・ウォーター（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）水を含んだ。PCRは、ホットリドを取り付けたHybaid Omni-E thermocycler（Hybaid, Franklin, MA）を使用して、以下の条件で行われた：95（3分）の後、95（45秒）、55（1分）、及び72（2分）から成るサイクルを40回繰り返し、最終伸長を72 で7分行った。PCR産物を、1%アガロースゲルで分析して、PCR増幅DNAは、さらに精製することなく翻訳反応に使用された。

40

【0292】

#### 2. tRNAの調製

精製tRNA<sup>lys</sup>（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応（100  $\mu\text{l}$ ）は、1500 pM（-1.0 OD<sub>260</sub>） tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液（pH 7.5）、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM リジン、2 mM ATP、15 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシルtRNAシンターゼ（Sigma）を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸

50

ナトリウム (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (35  $\mu$ l)。この溶液に、0.5 M CAPS緩衝液 (pH 10.5) を5  $\mu$ l加えて (最終濃度 50 mM)、その後10 mM BODIPY-FL-SSE溶液を10  $\mu$ l加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0) を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物をリボヌクレアーゼフリー・ウオーター 50  $\mu$ lに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過コラム (0.5  $\times$  5 cm) を通過して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70 ) した。アミノアシルtRNAの修飾度は、酸 尿素ゲル電気泳動 (Varshney, U., Lee, C.P. 及びRajBhandary, U.L., 1991 J. Biol. Chem 266, 24712~24718) により評価された。

10

【0293】

## 3. 翻訳

PCR産物 (上記ステップ1を参照) を精製しないで、BODIPYリジン・tRNA (上記ステップ2を参照) もまた含んでいる、Promegaウサギ網状赤血球TnTクイックシステムの少量アリコートに直接に加えた。より詳細には、PCR後、0.5 ~ 1  $\mu$ lのPCR産物を、PCR産物用ウサギ網状赤血球抽出物 (Promega) を8  $\mu$ l、1 mM完全アミノ酸ミックスを0.5  $\mu$ l、BODIPY-FL-リジン・tRNAを1  $\mu$ l含む翻訳反応混合物に直接に添加した。翻訳反応を1時間進行させ、反応生成物を14% SDS-PAGEで分析した。Molecular Dynamics FluorImagerを使用して、画像診断を1~2分以下で行った。

20

【0294】

## 4. 検出

図31は、APCタンパク質のフラグメント内に蛍光標識を取り込むためにBODIPY-FL-リジン・tRNA<sup>lys</sup> を使用した、いくつかの異なるヒトゲノム試料の分析結果を示す。レーン1はDNA欠如対照である。レーン2は、野生型DNAの結果を示し、レーン3~8は、FAP (結腸がん) を罹患する患者から分離された様々な突然変異型DNAについての結果を示す。最終レーンは、蛍光分子量マーカーである。図31に示すように、WT DNA (レーン2) は、APC遺伝子フラグメントのセグメント2、正常エクソン15に対応するバンドを生じる。対照的に、全ての他のレーン (レーン6を除く) は、WTバンド及びエクソン15 セグメント2のランケート型フラグメントに対応する追加バンドを呈示する。従って、これらの個人は異型接合体性であり、APC遺伝子中に1個のWT及び1個の鎖ランケート型突然変異を担っている。対照的に、レーン6の結果は、どちらの遺伝子についても本領域においてWT配列を示す。大学分子診断学検査室が行った、伝統的放射性PAGE法を使用する患者試料の分析によっても、同様な結論が独立して得られた。

30

【0295】

エクソン15-セグメント3における鎖ランケート型突然変異検出のために、同様な分析が行われた (図32)。タンパク質は、BODIPY-FL-リジン・tRNA<sup>lys</sup> と併用してインビトロ翻訳系においてウサギ網状赤血球を使用して合成された。SDS-PAGEによる分離後、翻訳されたタンパク質は、蛍光イメージング (図32A)、またはBODIPYフルオロフォアに対するポリクローナル抗体を使用する化学ルミネッセントウェスタンブロッティング法により目視観察された。レーン1はDNA欠如対照である。レーン2は、APC3野生型DNAについての結果を示し、レーン3はAPC3ランケート型突然変異体についての結果を示す。レーン4は、APC2野生型DNAについての結果を示し、レーン5はAPC2異型接合体性突然変異体についての結果を示す。

40

【0296】

総合して、これらの結果は、ヒト遺伝性疾患に関連する鎖ランケーションについて、放射性PTTスクリーニングを、蛍光ベーススクリーニングで置換する可能性を実証する。

[実施例 25] : ガン遺伝子用ゲルフリーPTT

実施例24 (上記) における蛍光標識による放射能の置換は現在のPTTテクノロジーの改良を示すが、未だにハイスループットスクリーニングへの適用が困難であるゲルの使用に

50

依存している。この理由で、この実施例は、化学ルミネッセント検出の使用に基づく非ゲルアプローチを実証する。本アプローチでは、ガン関連タンパク質またはタンパク質由来のポリペプチドフラグメントは、特別にデザインされたプライマーとtRNAを使用して、N末端、C末端及びタンパク質の2端間に取り込まれた異なる検出及び結合タグを有する対応する遺伝子から、インビトロで発現される。検出及び結合タグは、トランケートしているタンパク質分画またはタンパク質フラグメントを定量する手段を供給し、タンパク質の2端間に位置するタグがトランケーション領域を決定するために使用される。例えば、全長タンパク質は、N及びC末端タグの両方を含むが、トランケート型タンパク質はN末端タグのみを含む。タンパク質の2端間にあるランダムリジンに取り込まれたタグからのシグナル（鎖内シグナル）は、トランケートフラグメントのサイズに比例して減少するであろう。結合による鎖トランケーションの妨害を回避するために、N末端に近位にあるマーカーでタンパク質を捕捉することがさらに重要である。

10

【0297】

本方法を評価するために、我々は、WT配列またはトランケート型突然変異のいずれかを含むAPC及びp53遺伝子で実験を行った。どちらの場合も、ウサギ網状赤血球システムにおけるインビトロ合成中にターゲットタンパク質に一連のマーカーを取り込むために、プライマーと特別にデザインされたtRNAの組み合わせを使用した。インビトロ発現後、96ウェルELISAプレート内で、プレートに結合されたアフィニティー因子を使用により、発現タンパク質が捕捉された。N末端、C末端及び鎖内シグナルの相対量は、次に別の化学ルミネッセントベースのアッセイを使用して測定した。

20

【0298】

1. ガン遺伝子のPCR

A. APC セグメント3

まず、ゲノムDNA（WT及び突然変異APC遺伝子を有する細胞株から分離されたもの）を以下のプライマーを使用してPCR増幅した。フォワードプライマー、PTT-T7-APC3は、

【0299】

【数10】

**GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATG-CACCACCATCACCATC  
ACGGAGGAGATTACAAAGATGACGATGACAAA-GTTTCTCCATACAGGTCA  
CGGGGAGCCAAT-3'**(配列番号20)

30

で、リバースプライマー、PTT-Myc-APC3は、

【0300】

【数11】

**[5'-ATTATTACAAATCCTCTTCCGAGATTAA-TTTTGTTCACTTCTGCCTTCTGT  
AGGAATGGTATCTCG-3']**(配列番号21)

40

であった。

フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーター、イタリック体で示されるヌクレオチドは、His-6タグに対応し、太字の配列は、FLAG-トエピトープをコードし、残りのプライマーは、APCセグメント3DNAの相補領域である。リバースプライマーでは、下線配列は、c-Mycエピトープ配列に対応する。50 µlのPCR反応混合物は、200~500 ngの鑄型DNA（WTまたは突然変異体）、0.5 µM 各プライマー、及び25 µlのPCRマスターミックス（Qiagen, CA）、さらにヌクレアーゼフリー・ウォーター（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）水を含んだ。PCRは、ホットリドを取り付けたHybaid Omni-E thermocycler（Hybaid, Franklin, MA）を使用して、以下の条件で行われた：95（3分）の後、95

50

(45秒)、55 (1分)、及び72 (2分) から成るサイクルを40回繰り返し、最終伸長を72 で7分行った。PCR産物を、1%アガロースゲルで分析して、PCR増幅DNAは、さらに精製することなく翻訳反応に使用された。

#### 【0301】

##### B . P53

p53 DNAは、実施例23 (上記) に説明するように調製した。

##### 2 . tRNAの調製

BODIPY-FL-リジン・tRNA<sup>lys</sup>は、実施例23 (上記) に説明するように調製した。ピオチンリジン・tRNA<sup>lys</sup> and PC-ピオチン-リジン・tRNA<sup>lys</sup> の調製は、以下のように行った。精製tRNA<sup>lys</sup> (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応は、1500 pM (-1.0 OD<sub>260</sub>) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰アミノアシルtRNAシンテターゼ (Sigma Chemicals, St. Louis, M) を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に3M酢酸ナトリウムの0.1容積 (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1 : 1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (35 µl)。この溶液に、0.5 M CAPS緩衝液 (pH 10.5) 5 µlを加えて (最終濃度 50 mM)、その後ピオチンまたは光開裂型ピオチンのいずれかの10 mM溶液10 µlを加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0) を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を水 50ulに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過コラム (0.5 × 5 cm) で精製して、遊離「蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70 ) した。アミノアシルtRNAの修飾度は、酸 尿素ゲル電気泳動 (Varshney, U., Lee, C.P. 及びRajBhandary, U.L., 1991 J. Biol. Chem 266, 2471224718) により評価された。

#### 【0302】

##### 3 . 翻訳

典型的な翻訳反応混合物 (20 µl) は、16 µlのPCR DNA 用TNTウサギ網状赤血球抽出物 (Promega, Madison, WI)、1 µlのアミノ酸ミックス (1 mM)、1~2 µlのPCR DNA (上記に説明するAPC及びp53調製法を参照のこと) 及びリボヌクレアーゼ・フリーウォーター (Rnase-free water) を含んだ。蛍光検出には、翻訳反応混合物中にBODIPY-FL-リジン・tRNA<sup>lys</sup> が含まれた。翻訳反応は、30 で60分進行させた。

#### 【0303】

##### 4 . 検出

図33Aは、RT-PCR中にp53タンパク質中に取り込まれた鎖トランケーションを検出するためにデザインされた当初の実験の結果を示す。この場合、N末端FLAGエピトープは、捕捉のために使用され (実験セクションの始めに記載の96ウェルELISAプレートを使用する捕捉アッセイの説明を参照のこと)、His<sub>6</sub> 及び c-mycはそれぞれN末端及びC末端マーカーとして使用された。N末端Hisタグの検出は、ペルオキシダーゼ標識ニッケルキレートベース・検出用プローブ (India (登録商標) His Probe-HRP, Pierce, Rockford, IL) を使用して達成された。C末端の検出は、ヒトc-mycエピトープに対するウサギポリクローナル抗体の後、ペルオキシダーゼ標識マウス抗 [ウサギIgG] 二次抗体を使用して達成された。観察されるように、C/N末端シグナル比は、WTと比較してトランケート型タンパク質では約25倍低下される。本アッセイのさらに最適化した結果、1/100突然変異体 / WT p53タンパク質のトランケート型突然変異を検出するために十分な感度得られ、従って非侵襲性結腸ガンスクリーニングへの適用を可能とするにちがいない。

#### 【0304】

二番目の実験 (図33B) では、捕捉は、N末端His<sub>6</sub>タグで行われ、FLAG及びc-mycはそれぞれN及びC末端マーカーとして使用された。さらに、鎖内光開裂型ピオチンマーカーが、PC-ピオチン-リジン・tRNAをインビトロ混合物中に加えることにより取り込まれた。ピオ

10

20

30

40

50

チン検出は、ペルオキシダーゼ標NeutrAvidin (登録商標) (Pierce)を使用して達成された。この結果は、WTと比較して、トランケート型p53のC/N比が13倍の低下を示した。さらに、鎖内ピオチンシグナルは、N末端シグナルと比較して、75%低下した。

#### 【0305】

三番目の化学ルミネッセントタンパク質トランケーションアッセイは、突然変異細胞株のAPC遺伝子における鎖トランケーション検出のためにデザインされた(図33C)。捕捉は、N末端His<sub>6</sub>タグで行われ、FLAG及びc-mycはそれぞれN及びC末端マーカースとして使用された。図33Cに見られるように、トランケート型APCは、C/N比の明らかな低下(1/6)を呈示し、さらに鎖トランケーションの存在を指摘する。

#### 【0306】

結局、これらの実験は、ゲルフリー化学ルミネッセントアプローチを使用して、ガン関連タンパク質における鎖トランケート型突然変異を検出する能力を実証する。

#### [実施例 26] : 蛍光免疫沈降法

本実施例では、免疫沈降法におけるフルオロタグtRNAの使用を説明する。本実験では、標識tRNAの存在において、いったん新生タンパク質が合成されると、特異的抗体を使用して、それはプロテイン Gビーズ上に捕捉された。全てその他(非結合)物質は除去される。所望する結合タンパク質は、次にSDS-処理によってビーズから遊離され、さらにPAGEにより分析される。

#### 【0307】

p53タンパク質をコードするPCR DNA、または -ヘモリジンをコードするプラスミドDNA (以前の実施例に説明するように調製された)のいずれかを使用して、インピト翻訳が行われた。翻訳反応後、等量の10%SDS(重量/容量)を反応混合物に加え、試料を5分煮沸した。試料をIP緩衝液(1%Triton X-100を添加したトリス緩衝生理食塩水)で希釈し、2µgの抗p53抗体(SantaCruz Biotech, CA)または抗-HL抗体(Sigma, St. Louis, MO)のいずれかを加えて、混合しながら4で数時間インキュベートした。ネガティブ対照として、非特異的IgG抗体を使用して免疫沈降法を行った。抗体のインキュベーション後、プロテイン Gビーズ(Pierce, IL)を反応混合物に加えて、さらに定速混合を加えながら1時間インキュベートした。ビーズを次にペレット化して、0.1%SDSを加えたTBSで3回洗浄した。最後にビーズを、50µlのSDSゲル・ローディングバッファー中に懸濁して、5分煮沸した。SDS-PAGEは、Laemmli(Laemmli, U.K. 1970, Nature, 277, 680~685)に従って行った。

#### 【0308】

ゲルを、励起源としてアルゴンレーザーを備えるFluorImager 595(Molecular Dynamic s, Sunnyvale, CA)を使用してスキャンした。BODIPY-FL標識新生タンパク質の可視化には、最大励起及び発光に最も近値であるために励起源として488 nmを使用した(我々は50+/30フィルタを使用した)。ゲルは、PMT 電圧 1000 V、さらに100または200ミクロンピクセルサイズのいずれかを使用してスキャンした。

#### 【0309】

図34は結果を示す。レーンMは蛍光マーカースを含む。レーン1はDNA欠如対照(+抗HL抗体)である。レーン2は、HL DNA +マウスIgGについての結果を示す。レーン3は、HL DNA +抗HL抗体についての結果を示す。レーン4はDNA欠如対照(+抗P53抗体)である。レーン5は、p53 DNA +マウスIgGについての結果を示す。レーン6は、p53 DNA +抗p53抗体についての結果を示す。免疫沈降法は、特有な結果かつ実質的なバックグラウンドなしに極めて明晰なシグナルを供給する。

#### 【0310】

#### [実施例 27] : サプレッサーtRNA

BODIPY標識開始tRNAを使用する際、内在性開始tRNA(非標識)間に競合を生じ、標識の取り込み低下を起因する。この競合を克服するために、本発明は、アンバー終止コドン及び対応するサプレッサーtRNAの使用を考案する。

#### 1 . BODIPY-バリン-pdCpAの調製

第一ステップは、サブレッサー-tRNAへの付着用のBODIPY-アミノ酸抱合体の調製を含む。この合成は図35に示す。合成は、5-メチル-1(2-ニトロフェニル)エタノール(化合物2)の調製から始まる。まず、5-メチル-2-ニトロアミノアセトフェノン(Olejnik, J., S. Sonar, E. Krzymanska-Olejnik、及びK. J. Rothschild. 1995 Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 7590~4; Olejnik, J., E. Krzymanska-Olejnik、及びK. J. Rothschild. 1998. Methods Enzymol. 291: 135~54)を5 mlのエタノールに溶解した。この溶液に、分析TLCが5-メチル-1(2-ニトロフェニル)エタノールへの完全転化を示すまで、5 mgの水素化ホウ素ナトリウムを少量ずつ添加した。反応は、5 mlのアセトンを加えることにより停止し、1 N HClでpH=3.0に酸性化後、クロロホルムで抽出した。有機層を乾燥し、黄色様油としてターゲット化合物が得られるまで蒸発した。この化合物はさらに精製しないで使用された。

10

## 【0311】

合成機構を継続して、5-メチル-1(2-ニトロフェニル)エタノール(350 mg; 1.95 mM)(化合物2)を、10 mlのアセトニトリルに溶解した。この溶液に、407  $\mu$ lのトリエチルアミン(1.5当量)を加えた後、N,N'-ジスクシンイミド炭酸塩(750 mg、1.5当量)を加えた。反応混合物を分析TLC(シリカゲル、クロロホルム)が化合物3への定量的転化を示すまで、室温で攪拌した。結果生じる溶液を、バリンのトリエチルアンモニウム塩溶液に直接に添加した。

## 【0312】

バリン(218 mg; 1.86 mM)を、2 mlの水に懸濁して、これに260  $\mu$ lのトリエチルアミンを加えた。この溶液に、化合物3の溶液を15分間にxx加えて、この間に混合物のpH値を、必要に応じて、トリエチルアミンを添加することにより調整した。混合物を30分攪拌して、0.1 N HClを10 ml添加することにより酸性化した後、3 x 20 ml AcOEtで抽出した。有機層を合わせて、乾燥して、乾燥状態まで蒸発した。粗生成物を20 mlのクロロホルムに溶解し、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 4 x 30 mlで抽出し、水相を酸性化し、クロロホルムで再抽出して、純正ターゲットNpe-バリン(化合物4) 320 mgを得た。

20

## 【0313】

Npe-バリン(化合物4)(320 mg、1 mM)を320  $\mu$ lのアセトニトリルに溶解した。この溶液に、トリエチルアミン(280  $\mu$ l、2当量)及びクロロアセトニトリル(190  $\mu$ l、3当量)を加えた。混合物を室温で一晩攪拌した。20 mlの塩化メチレンを加えた後、20 mlの1N NaHSO<sub>4</sub>を加え、混合物を4 x 20 ml塩化メチレンで抽出した。有機物は乾燥するまで蒸発し、ヘキサン(10~50%)中の酢酸エチルのステップ勾配を使用して、シリカゲルラムで精製し、純正生成物(化合物5)を300 mg得た。

30

## 【0314】

テトラブチルアンモニウム対イオンの2.2当量を含むPdCPA(Annovis)の20 ODを、40  $\mu$ lの乾燥DMFに溶解した。この溶液に、10  $\mu$ l DMF中でNpe-バリン-COOCH<sub>2</sub>CN(0.66 mg)の2当量を含む溶液を加えた。反応を室温で2時間維持し、次に生成物を分離用HPLCを使用して分離し、15 ODの化合物6を得た。

15 OD<sub>260</sub>のNpe-バリン-pdCpAを、500  $\mu$ lの25 mM NaOAc(pH = 4.5)に溶解し、365 nm光線(BlakRay XX-15、UVP)を使用して20分照射した。166  $\mu$ lのBODIPY-FL-SE(@10mg/ml; 7当量、が添加された)後、140  $\mu$ lの1N NaHCO<sub>3</sub>を加えた。BODIPYFLSE溶液の他の部分(2 x 166  $\mu$ l、合計21当量)を5分、10分後にそれぞれ加え、さらに反応混合物を室温で45分渦を巻くように混合した。生成物(化合物7)を、分離用HPLC Novapak C18(10x100mm、50 mM TEAA中のアセトニトリルの直線勾配(ph 5.4)で90分、速度ml/min)を使用して分離し、260 及び505 nmにおける吸光によりキャラクタライズした。収率7.25 OD<sub>260</sub>。

40

## 【0315】

## 2. アンバー・サブレッサー-fMet-tRNAの発現及び精製

突然変異型tRNA<sup>fmet</sup>(遺伝子を含むnusAオペロンのPstIフラグメント(S. Ishi et al. PNAS v.81, pp409~413, 1984)を、pGEM4ベクター(Promega, Madison, WI)中にク

50

ローンした。E. coli XL-blue 2細胞の一晩培養液 (100 ml) から、フェノール抽出及びエタノール沈降により全tRNAを分離した。サブレッサー-tRNA<sup>met</sup>を、天然PAGE (Seong及びRajBhandary, PNAS v.84 pp.334~338, 1987) を使用して精製した。

#### 【0316】

3. ヘビ毒ホスホジエステラーゼ I (VPD I) によるtRNAトランケーション (図36)

1 OD<sub>260</sub> の精製開始サブレッサー-tRNAを、50 uLの50 mMトリス・塩酸 (pH 7.5) ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 100 mM NaClに溶解した。この溶液に、0.5ユニットのVPD Iを抑え、さらに混合物を0 で30分インキュベートした。フェノール抽出後、tRNAをEtOHで沈降、乾燥して、さらに100 uLの水に溶解した。3'末端からの選択的 (-CA) ジヌクレオチド除去を、8%、7Mの尿素PAGE分析で確認した。

10

#### 【0317】

4. トランケート型開始サブレッサー-tRNAを有するBODIPY-バリン-pdCpAによる連結

図36の機構に示すように、tRNAは、連結反応において、BODIPY-アミノ酸抱合体で電荷される。0.5 OD<sub>260</sub>のtRNAに、100 uLのリゲーションバッファー (50 mM トリス・塩酸 (pH 7.8) ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM DTT ; 1 mM ATP 30% の DMSO ) 中の0.5 OD<sub>260</sub> ユニットのpdCpA 及び200ユニットのT4 RNA リガーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA) を加えて、37 で1時間インキュベートした。インキュベーション後、tRNAを3~4容量のEtOHで沈降し、50uLの水に溶解して、G25 MicroSpinカラム (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) を使用して、スピン濾過を行った。結合tRNAをアリコートに分けて、-70 で保存した。生成物は、開始/アンバーサブレッサー-tRNAと言及される。

20

#### 【0318】

5. 翻訳及び分析

翻訳は、20 uL総量の無細胞E. coli S30抽出物 (Promega, Madison, WI) 中において行った。混合物は、特定のタンパク質 (1 ug) をコードするDNA及び化学的アミノアシル化によって調製された開始アンバーサブレッサー-tRNA (1 ug) を含んだ。混合物を37 で1時間インキュベートし、次に1 uLをローディングバッファーと混合して、加熱変性してから14% SDS-PAGE (150 V、1時間) にかけた。ゲルを次に簡単にリンスして、BODIPY標識の場合は、Fluoroimagerを使用して分析した。PC-ビオチンの場合は、ゲルをPVDF膜上にプロットして、ストレプトアビジン HRPを使用してビオチンを検出した。

30

#### 【0319】

図37は結果を示す。レーン1はDNA欠如対照 + BODIPY-バリン・開始/アンバーサブレッサー-tRNAである。レーン2は、ルシフェラーゼDNA + BODIPY-リジン・tRNAについての結果を示す。レーン3は、アンバー 1ルシフェラーゼDNA + BODIPY-リジン・tRNAを示し、レーン4は、アンバー 1ルシフェラーゼDNA + BODIPY-バリン・開始/アンバーサブレッサー-tRNAについての改良された結果を示す。

#### 【0320】

レーン5は、ヘモリジンDNA + BODIPY-リジン・tRNAについての結果を示す。レーン6は、アンバー 1ヘモリジンDNA + BODIPY-リジン・tRNAを示し、レーン7は、アンバー 1ヘモリジンDNA + BODIPY-バリン・開始/アンバーサブレッサー-tRNAについての改良された結果を示す。

40

レーン8は、DHFR DNA + BODIPY-リジン・tRNAについての結果を示す。レーン9は、アンバー 1 DHFR DNA + BODIPY-リジン・tRNAを示し、レーン10は、アンバー 1 DHFR DNA + BODIPY-バリン・開始/アンバーサブレッサー-tRNAについての改良された結果を示す。

#### 【0321】

[実施例 28] : 薬物 プロテオーム・スクリーニング

ヒトゲノムプロジェクトの完了は、創薬における新しい時代を開幕する。薬物ライブラリーが一つのタンパク質に対してスクリーンされる従来の方法とは対照的に、今では全プロテオームのスクリーニングが利用可能である。しかし、そのような薬物 プロテオームスクリーニングは、ゲノムのプロテオームへの迅速な転換、特別標識タンパク質の工作及び1時間あたりに何千もの試料のスクリーニングを必要とするために、従来のテクノロジー

50

ーを使って達成することは困難である。

【0322】

本発明は、無細胞発現標識タンパク質及び2Dマイクロアレイ法を使用して、薬物タンパク質の相互作用をスクリーニングすることにより、このような限界を排除することを目的とする方法及び組成物を供給する。本発明は、上記に説明する標識及びマーカ（例：蛍光及びアフィニティータグ）を、その無細胞発現中にタンパク質中に取り込むことを考案する。蛍光タグ（例えば、N末端部、C末端部、タンパク質内及び/あるいはタンパク質を通して）は、タンパク質発現をモニタし、さらに薬物候補化合物との相互作用を検出する手段を供給する。アフィニティータグは、無細胞発現タンパク質を、無細胞溶解質から迅速に分離する手段を供給する。ヒトプロテオームの全てあるいは一部を反映する、無細胞発現タンパク質の2Dマイクロアレイ上で行われる薬物スクリーンは、高感度検出、ハイスループット及び必要とする試料容量が低いシステムを供給する。

10

【0323】

本発明によるプロテオミックスクリーニングアッセイは、リード薬物化合物とスクリーニングを受ける全プロテオーム（あるいはプロテオームの一部）間の起こり得る相互作用を許すことにより、創薬プロセスを著しく加速する。そのような情報は、薬物作用の分子的基礎を探索し、薬物相互作用マップを構築することにより薬物の起こり得る副作用を同定するために価値がある。

【0324】

薬物相互作用マップは、特定化合物（例：リード薬物）のヒトプロテオームとの相互作用についての情報を供給する。薬物相互作用マップを確立するためには、一連のプラズミドcDNAプールから構成されるフォーマット化されたcDNAライブラリを使用して、系統的発現と全プロテオームの標識を可能とする方法が考案される。約50プラズミドまたはそれ以下（より好ましくは約40プラズミドまたはそれ以下、さらには約30プラズミドまたはそれ以下、さらに最も好ましくは25プラズミドまたはそれ以下）から成る各プールを、無細胞反応混合物（例：Promega TnTウサギ網状赤血球発現システム）中で同時発現する。タンパク質は、tRNAで翻訳中に取り込まれたPC-ビオチンのようなリンカーを使用して、混合物からアフィニティ精製される。発現タンパク質を次に、表面に不動化試験薬物化合物を有する表面（例：ビーズまたはスライド）に曝す。各プール由来の1またはそれ以上のタンパク質の相互作用を次に、取り込まれた蛍光標識を使用して検出する。薬物化合物と相互作用するプール由来の特定のタンパク質のアイデンティティを次に、プラズミドプールをサブグループに分割する手順または不動化タンパク質のマイクロ分析のいずれかを使用して決定する。他方、各プール中にある発現タンパク質を、取り込まれているアフィニティータグを使用して固体媒質中に移動する。タンパク質の各プールを2Dアレイ上に配列して、標識ビーズ上に不動化されている化合物で審問する。ハイスループットスクリーニングは、2DマイクロアレイとDNAベースマイクロチップと同様な蛍光イメージャーを使用して達成し得る。

20

30

【0325】

放射性標識による従来の方法と比較する、取り込まれた蛍光及び/またはアフィニティーマーカーのような非放射性マーカを有する無細胞発現タンパク質使用の重要な利点は、新生タンパク質の迅速な分離及びハイスループット分析に必要とされる感度を備える迅速な検出実行能力である。このアプローチは、放射性検出が予め含まれている2Dマイクロアレイの場合は特に好都合である。さらに、cDNAによりコードされている各タンパク質が、検出に十分なレベルで発現するために、各プール中のプラズミド数を限定すること（例えば、50以下）は重要である。プラズミドプールを発現するために、大量の反応混合物（例えば、1 ml）を常に利用し得るが、大量反応は実用的プロテオミックスクリーニングには法外に価格が高い。例えば、2000の1 ml反応量の利用には、2000プラズミドプールを発現する必要がある。TnTウサギ網状赤血球の現在の市販価格を使用すると、これは約\$800,000となる。対照的に、2Dマイクロアレイフォーマットと使用できる少量50マイクロリットル反応は、\$20,000のみですむ。米国特許第5,654,150号（本明細書に参考文献として編

40

50

入)に説明されるようなインビトロ発現クローニングの初期の方法は、約100の個別細菌コロニーから成るプールの収集及びプール中のcDNAによってコードされているタンパク質のインビトロにおける発現に基づいている。このアプローチは、米国特許第4,675,285号(参考文献として編入)に説明されるようなさらに初期(非インビトロ)の発現クローニング方法の改良を示すが、それでも、一般的には本発明によって供給されるような薬物プロテオミックスクリーニングを実施するための十分な感度を有する方法を供給しない。薬物プロテオミックスクリーニングの他に、本発明はさらにプロテオームとDNA及び他のバイオ分子との相互作用の迅速なスループットクリーニングを可能とする。

#### 【0326】

薬物プロテオミックスクリーニング用の2つの異なる関連アプローチが考案され、そのどちらも2Dアレイまたはマイクロアレイの利用、蛍光、ルミネッセンス、化学ルミネッセンス、吸光または電磁検出(直接的または間接的)による他の手段を使用する検出に基づく。図38に示すように、第一アプローチは、プラズミドのプールから生産された無細胞発現タンパク質を利用し、これはフォーマット化されたゲノムライブラリーを含む。反応混合物中に、発現タンパク質よりもはるかに高レベルで存在する既存のタンパク質からの妨害を排除するために、取り込まれたアフィニータグ及び表面上にコートされた相補性捕捉分子を使用する、プレ精製ステップが必要であり得る。発現タンパク質を含む個々のプールからの各試料を次に、不動化ターゲット薬物を含む表面上にスポット添加する。次に取り込まれている蛍光マーカーを使用して、タンパク質を含み、ターゲット薬物と相互作用をする試料を同定する。他方、取り込まれているアフィニティマーカーと相互作用する蛍光標識分子(例:抗体)を使用してもよい。一つの好ましい実施態様では、ビオチンがアフィニティマーカーとして使用され、これはストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)複合体と反応して、反応を触媒して、検出可能なシグナル(例:化学ルミネッセントまたは蛍光)を生じる。

#### 【0327】

特定のスポットからの蛍光検出により、ターゲット薬物との相互作用を呈示するタンパク質プールがいったん同定されたら、様々な手順を使用して、実際に相互作用するタンパク質を同定することができる。一つの方法は、プール内の個々のプラズミドの再形質転換後、蛍光タグまたはアフィニータグの存在において各個別プラズミド由来のタンパク質をインビトロ発現することに基づく。これに代わるアプローチは、陽性蛍光を示すスポット由来の実際の結合タンパク質を回収し、さらに質量分析または化学的手段のいずれかを使用して配列分析を行うことである。

#### 【0328】

薬剤プロテオームクリーニングのための第二の関連アプローチがさらに考案されている(図39)。この場合は、プラズミドプールから生産された無細胞発現タンパク質を含む試料をまず表面に結合し、次に蛍光部分と抱合されている特定のターゲット薬物で審問することである。取り込まれたアフィニータグは、インビトロ発現タンパク質を、アフィニータグと相互作用する捕捉分子を含む特別に調製された表面に結合するために使用される。取り込まれたフルオロフォアは、表面結合をモニタするために使用される。ターゲット薬物結合は、デュアル波長蛍光検出法、あるいはその代わりに、タンパク質と結合薬物が近隣位置にあることを確定する、蛍光共鳴エネルギー転移法を使用して検出される。薬物タンパク質複合体相互反応を確認するための下流分析、及びさらに薬物またはタンパク質のアイデンティティの質量分析のために、光開裂型ビオチンリンカーを使用して、薬物タンパク質複合体をさらに遊離し得る。

#### 【0329】

上記に説明するどちらのシナリオでも、各プール毎に約50プラズミドを含む2000の個別プラズミドプールを構成すると推定される、ゲノムライブラリーの平行発現は、迅速な薬物プロテオーム分析実施の基礎を提供する。例えば、反応ウェル(各50 $\mu$ l)の既定フォーマットセット及びプラズミドセットを使用して、全平行発現反応を1時間以内に達成することができた。各試料からの発現タンパク質の精製は、適切な装置(例えば、ロボッ

10

20

30

40

50

トーム操作による96ウェル・ピペッター)が利用される場合は、さらに極めて迅速であり得た。例えば、ピペットフィルターチップが、インビトロで取り込まれた光開裂型タグ(例えば、ビーズに結合されたストレプトアビジン)を介して、捕捉用のアフィニティー媒質を含むように調製することが可能であり、後続する遊離には光線が使用され得る。

#### 【0330】

どちらのシナリオでも、試料は、その後の薬物タンパク質蛍光アッセイのために、迅速に表面に移動され得る。例えば、ターゲット薬物でコートされたスライドの場合は、125 um 解像度スポットサイズを提供する、Affymetrix 417 アレイヤー (arrayer) のような市販のアレイヤーを使用して、個々の試料をスポットし得る。原則として、5倍の重複性を有する全プロテオームを10分以内で配列するために、一枚の顕微鏡用スライドで十分である。スポットサイズを大型にしたり、または重複性を増加するとスライド数が増えるが、それでもなお配列プロテオームの全調製は迅速であり、ハイスループットプロセッシングが可能である。「全プロテオームが一枚のスライドの上にある」コンセプトは、そのようなスライドの迅速な製造は、薬物ライブラリーに対する全プロテオームのスクリーニングを可能とするために、特に魅力的である。

10

#### 【0331】

上記に説明するフォーマットでは、蛍光2Dマイクロアレイリーダーを使用して、迅速なリードアウト(読み取り)を達成し得る。例えば、Affymetrix 418スキャナーは、約10分以内に全スライドをスキャンすることが可能であり、3色画像を実施し得る。さらには、アレイリーダーは高精度(10ミクロン)、速度(18 mm/min)及び感度(1平方ミクロン当たり1個以下のCy3色素分子>3.5 S/N)を提供する。

20

#### 【0332】

本発明によるスクリーニングアッセイを評価するために、試験タンパク質ジヒドロフォレートレダクターゼ(還元酵素)(DHFR)中へのPC-ビオチンまたはBODIPYの取り込みを含む実験を行った。実験は、インビトロ合成中にDHFR中に取り込まれたPC-ビオチンまたはBODIPYマーカが、正常リガンドがジヒドロフォレートであるDHFRの競合インヒビターである、小型リガンドのメトトレキセートとの相互作用をアッセイするために使用し得るか否かを評価することを目的とした。メトトレキセートは、細胞生長率を低下し得るために、化学療法における抗ガン薬として広く使用されている。

30

#### 【0333】

一つのアッセイでは、PC-ビオチンは、PC-ビオチン-リジン・tRNAの存在におけるS30でのインビトロ発現中に、DHFR中に取り込まれた。発現後、粗混合物をメトトレキセートでコートされたアガロースビーズに曝した。十分な洗浄後、DHFRのビーズへの特異的結合を、ストレプトアビジン-HRPを使用してアッセイした。図40に見られるように、PC-ビオチン-リジン・tRNAが発現系に含まれる場合にのみ、シグナルが得られた。結合前にUV光線に露光させると、対照レベルに関するシグナルが破壊され(データの表示なし)、自動化アッセイ中にバックグラウンドレベルを測定するための便利な方法を提供する。

#### 【0334】

二番目の実験では、均質溶液アッセイとして、DHFRとメトトレキセートとの相互作用を検出するために、毛管電気泳動(CE-LIF)を使用した。この場合は、BODIPY-fmet・tRNAを使用するインビトロ合成中に、BODIPYは、DHFRのN末端部に取り込まれた。遊離DHFRの電気泳動画像は、2.9分にピークを呈示した(データの表示なし)。比較として、室温で30分メトトレキセートとブレインキュベートされたDHFRの電気泳動画像は、2.8分に広幅ピークを呈示した(データの表示なし)。移動時間の変化は、DHFRとメトトレキセート間の複合体形成に帰因する。

40

#### 【0335】

実験の第三シリーズでは、抗体を使用して、インビトロ発現されたターゲットタンパク質を選択的に結合及び検出する能力を調査した。この目的では、PC-ビオチンが、プールされたヒトmRNA試料のRT-PCR後に、PC-ビオチン-リジン・tRNAを使用して、ウサギ網状赤血球溶解質中で発現されたp53中に取り込まれた。このタンパク質は、次に野生型及び突

50

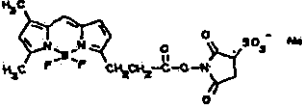
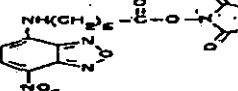
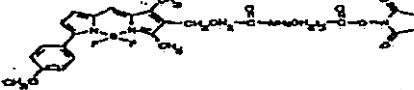
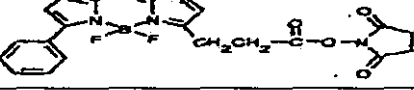
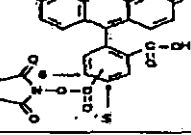
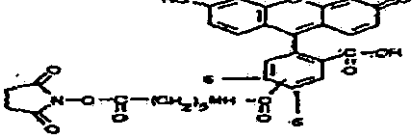
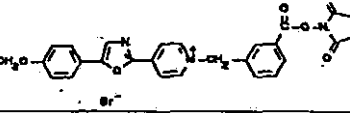
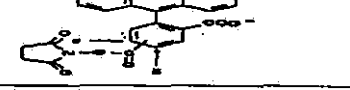
然変異型コンフォーメーションを認識する、モノクローナル抗体クローンBP53-12 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を使用して、ELISAプレート上で特異的に捕捉された。ネガティブ対照としては、p53特異的抗体の代わりに、同量の免疫前マウスIgGが捕捉用に使用された。ビオチンの検出は、標準ELISAアッセイにおいて、ペルオキシダーゼ標NeutrAvidinビオチン結合タンパク質 (Pierce, Rockford, IL) を使用して達成された。その結果 (表示なし) は、p53抗体との特異的結合のみが、有意なシグナルを生じること示した。これらのデータは、異なるp53突然変異体と特異的に反応する、コンフォーメーション特異性抗体のパネルを使用するp53結合の研究の可能性を実証する。

【0336】

本発明による他の実施態様及び用途は、本明細書に発表される発明に関する明細と実施を考慮することにより、当業者には明確であろう。明細及び実施例は典型としてのみ考察されることを意図し、本発明による特定の実施態様の範囲は、以下の請求により指示される。

【0337】

【表2】

名称及び分子量	化学式	蛍光特性
BODIPY-FL, SSE MW: 491		励起=502 nm 発光=510 nm 吸光度=75,000
NBD MW: 391		励起=466nm 発光=535 nm 吸光度=22,000
Bodipy-TMR-X, SE MW: 608		励起=544 nm 発光=570 nm 吸光度=56,000
Bodipy-R6G MW: 437		励起=528 nm 発光=547 nm 吸光度=70,000
フルオレセイン (FAM) MW: 473		励起=495 nm 発光=520 nm 吸光度=74,000
フルオレセイン (SFX) MW: 587		励起=494 nm 発光=520 nm 吸光度=73,000
PyMPO MW: 582		励起=415 nm 発光=570 nm 吸光度=26,000
5/6-TAMRA MW: 528		励起=546 nm 発光=576 nm 吸光度=95,000

【0338】

10

20

30

40

【表 3】

酵素/タンパク質	-FluoroTag <sup>TM</sup> tRNA 翻訳反応	+ FluoroTag <sup>TM</sup> tRNA 翻訳反応
α-ヘモリジン OD <sub>415nm</sub> /μl	0.085	0.083
ルシフェラーゼ RLU/μl	79052	78842
DHFR ΔOD <sub>332nm</sub> /μl	0.050	0.064

10

【 0 3 3 9 】

【表 4】

## 様々なエピトープ及びその配列

名称	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列 (5'→3')
His-6	HHHHHH	CATCACCATCACCATCAC
FLAG	DYKDDDDK	GACTACAAGGACGACGACGACAAG
c-Myc	EQKLISEEDL	GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG
Strep- Tag	WSHPQFEK	TGGAGCCACCCCAGTTCGAGAAG
Amber- 16	CSPFEVQVSPEA GAQK	TGCAGCCCTTCGAGGTGCAGGTGAGCCCGAGGCCGGCGCC CAGAAG
T7-Tag	MASMTGGQMG	ATGGCCAGCATGACCGGCGCCAGCAGATGGGC
VSV-G <sup>o</sup> - Tag	YTDIEMNRLGK	TACACCGACATCGAGATGAACCGCCTGGGCAAG
HA <sup>o</sup> -Tag	YPYDVPDYA	TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC
Protein- C Tag	EDQVDPRLIDGK	GAGGACCAGGTGGACCCCGCCTGATCGACGGCAAG
HSV <sup>o</sup> - Tag	QPELAPDPED	CAGCCCGAGCTGGCCCCGAGGACCCCGAGGAC

20

30

#: 水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus) 糖タンパク質

\*: 赤血球凝集素

\$: 単純疱疹ウイルス (Herpes Simplex Virus) 糖タンパク質

40

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 (A) アミノ酸及び (B) ペプチドの構造を示した図。

【図 2】 細胞または無細胞系におけるタンパク質合成中に生じる分子的ステップの説明を示した図。

【図 3】 (A) tRNA分子、及び (B) tRNAのアミノアシル化に含まれるアプローチの構造を示した図。

【図 4】 蛍光マーカーアミノ酸を使用する、新生タンパク質検出方法を示した図。

【図 5】 ゲル電気泳動及びUV照射を使用する新生タンパク質の検出に適切な蛍光特性を有する、2種類の異なるマーカーアミノ酸、ダンシルリジン (機構1) 及びクマリン (機構2) の合成及びtRNAへのミスアミノアシル化の機構を示した図。

50

【図6】 (A) 2-ニトロベンジル部分を含む化合物を示し、(B)ニトロベンジル結合からの基質の切断を示した図。

【図7】 光開裂型マーカーの実例を示した図。

【図8A】 CBの化学的変異を示した図。

【図8B】 可能なアミノ酸結合を示した図。

【図9】 PCBの光分解を示した図。

【図10】 タンパク質を分離することなく、無細胞タンパク質発現系において、新生タンパク質の生産をモニタする方法の概略表示。

【図11】 (A) レポーター特性を有する非天然アミノ酸の実例を提供し、(B)タンパク質合成におけるレポーターの関与を示し、(C)レポーターの合成を示した図。

10

【図12】 光開裂型ピオチンの構造成分を示した図。

【図13】 新生タンパク質のN末端でのマーカーの導入方法の概略表示した図。

【図14】 新生タンパク質におけるマーカーの検出及び分離方法の説明を提供した図。

【図15】 PCB リジン合成の一つの実施態様におけるステップを示した図。

【図16】 tRNAミスアミノアシル化の実験的ストラテジーを提供する。

【図17】 (i) デオキシシチジン保護、(ii) アデノシン保護、及び(iii) ジヌクレオチド合成を含む、ジヌクレオチド合成を例示した図。

【図18】 マーカーアミノ酸を使用するジヌクレオチドのアミノアシル化を示した図。

【図19】 ジピロメテンニフッ化ホウ素(4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)色素の構造を示した図

20

【図20】 翻訳中ヘモリジン中への様々な蛍光分子の取り込みを示すゲルの写真。

【図21A】 様々なタンパク質中へのBODIPY-FLの取り込みを示す。レーザーベースのMolecular Dynamics FluorImager 595を使用して可視化された結果を示す。

【図21B】 様々なタンパク質中へのBODIPY-FLの取り込みを示す。UVトランスイルミネーターを使用して可視化された結果を示す。

【図22A】 蛍光標識の経時変化を示す。

【図22B】 翻訳混合物の様々なアリコートのSDS-PAGE結果を示し、系の感度を実証する。

【図23A】 本発明による方法に従って、新生タンパク質中に導入されたN末端マーカーのゲルフリー定量法を示す棒グラフ。

30

【図23B】 本発明による方法に従って定量された、新生タンパク質のC末端マーカーのゲルフリー定量法を示す棒グラフ。

【図24】 プロテアーゼ処理及び未処理タンパク質のゲル結果を示した図。

【図25】 RBC処理及び未処理タンパク質のゲル結果を示した図。

【図26A】 ミスアミノアシル・リジン-tRNA<sup>lys</sup>を使用する、E. coli 翻訳系におけるヘモリジンへの様々な蛍光分子の取り込みを示すゲルである。

【図26B】 ミスアミノアシル・リジン-tRNA<sup>lys</sup>を使用する、TnTコムギ胚芽系におけるルシフェラーゼへの様々な蛍光分子の取り込みを示す。

【図27】 tRNAクマリン誘導体を含む、様々な蛍光tRNAの存在下で行われた-HLのインビトロ翻訳のゲル結果を示す。

40

【図28A】 毛管電気泳動による易動度シフト結果を示す。

【図28B】 毛管電気泳動による易動度シフト結果を示す。

【図29】 3つのマーカーが新生タンパク質中に導入された、インビトロ翻訳結果のゲル結果である。

【図30A】 インビトロ翻訳・トリプルエピトープタグ野生型p53(RT-PCR由来DNA)のウェスタンブロット分析を示す。総タンパク質染色を示す。

【図30B】 インビトロ翻訳・トリプルエピトープタグ野生型p53(RT-PCR由来DNA)のウェスタンブロット分析を示す。ウェスタンブロット分析を示す。

【図31】 APCエクソン15、セグメント2のゲルベースPTTの結果を示す。

50

【図3 2 A】 ウェスタンブロッティングによる、インビトロ翻訳・BODIPY標識タンパク質検出を示す。蛍光イメージング（画像法）による結果を示す。

【図3 2 B】 ウェスタンブロッティングによる、インビトロ翻訳・BODIPY標識タンパク質検出を示す。ウェスタンブロッティングによる結果を示す。

【図3 3 A】 p53とAPCのゲルフリー化学ルミネッセントタンパク質トランケーションアッセイの結果を示す3棒グラフを示す。N末端FLAGエピトープに対するマウスモノクローナル抗体を使用することにより、生成物が96ウェルELISAプレートフォーマット中に捕獲される、インビトロ翻訳によって生産されたp53の結果を示す。

【図3 3 B】 p53とAPCのゲルフリー化学ルミネッセントタンパク質トランケーションアッセイの結果を示す3棒グラフを示す。ニッケルキレートプレートを使用することにより、生成物が96ウェルELISAプレートフォーマット中に捕獲される、インビトロ翻訳によって生産されたp53の結果を示す。

【図3 3 C】 p53とAPCのゲルフリー化学ルミネッセントタンパク質トランケーションアッセイの結果を示す3棒グラフを示す。生成物がニッケル金属キレート96ウェルELISAプレート上に捕獲される、インビトロ翻訳によって生産されたAPCの結果を示す。全ての野生型N及びC末端シグナルは、突然変異型N末端シグナルと同様に100%に正規化された。

【図3 4】 p53とヘモリジンについての免疫沈降結果を示すゲル。

【図3 5】 BODIPY-バリン-pdCpAの調製についての合成機構を概略的に示した図。

【図3 6】 tRNAへの図3 5のBODIPY-バリン-pdCpA抱合体の付着についての合成機構を概略的に示した図。

【図3 7】 図36の電荷tRNAを使用する翻訳反応の結果を示した図。

【図3 8】 薬物/プロテオームスクリーニングアッセイの一つの実施態様を概略的に示す。

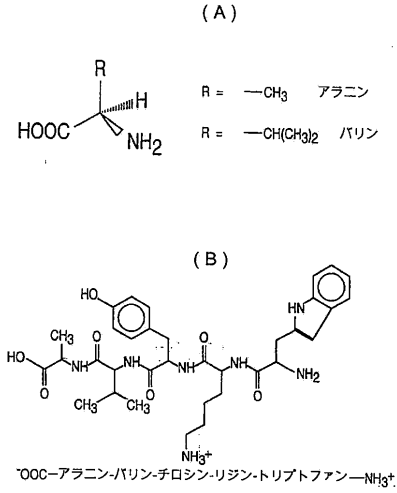
【図3 9】 薬物/プロテオームスクリーニングアッセイの一つの実施態様を概略的に示す。

【図4 0】 薬物/プロテオームスクリーニングアッセイの結果を示す棒グラフ。

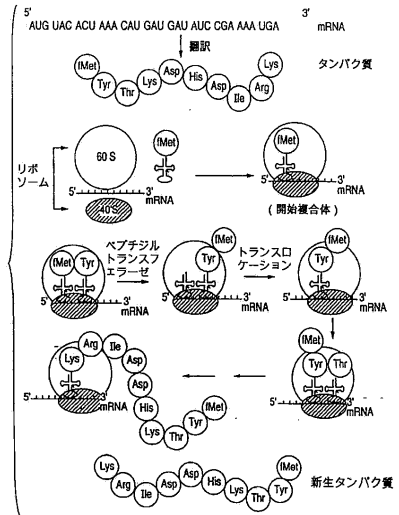
10

20

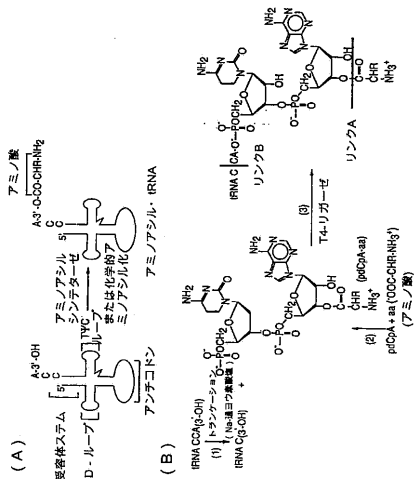
【 図 1 】



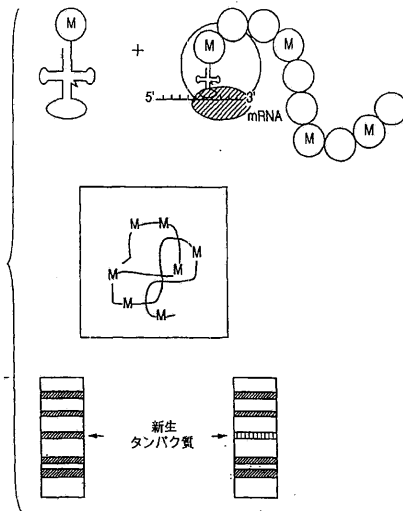
【 図 2 】



【 図 3 】

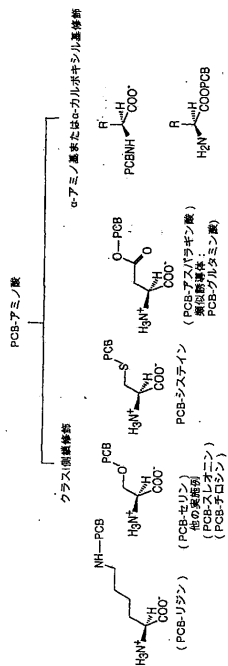


【 図 4 】

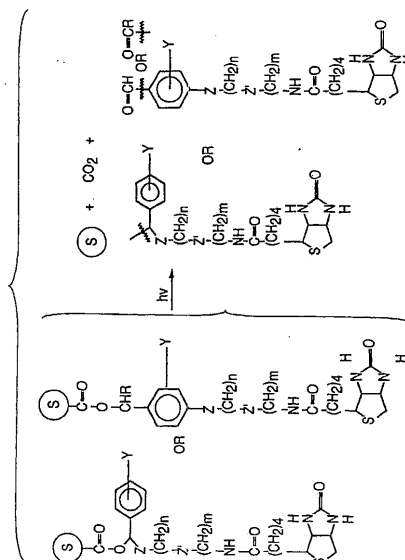




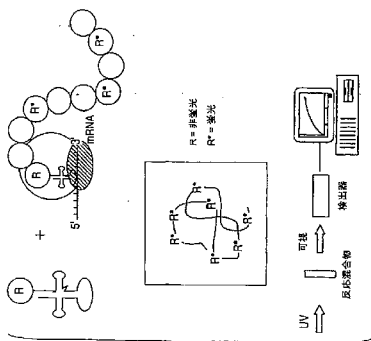
【 図 8 B 】



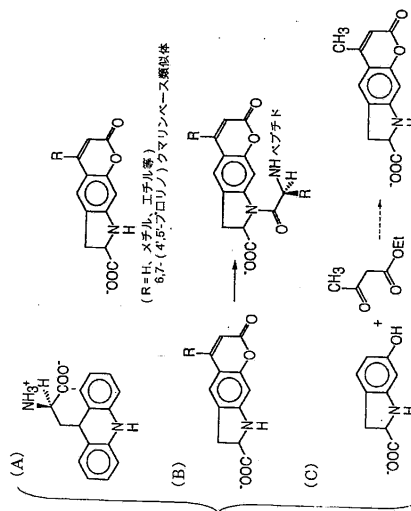
【 図 9 】



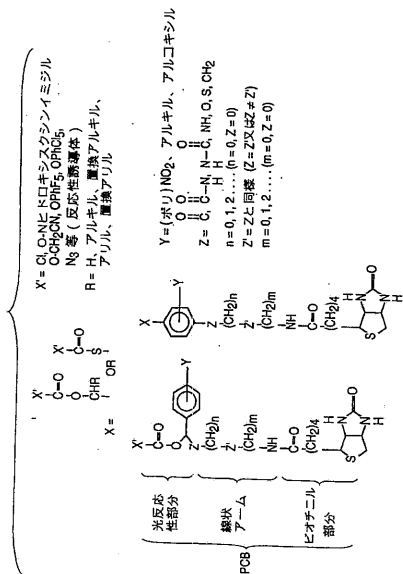
【 図 10 】



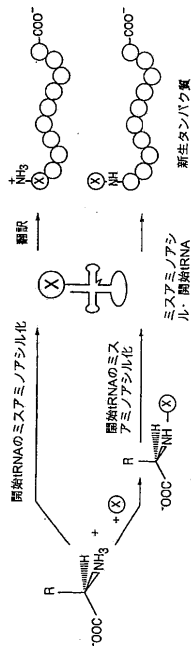
【 図 11 】



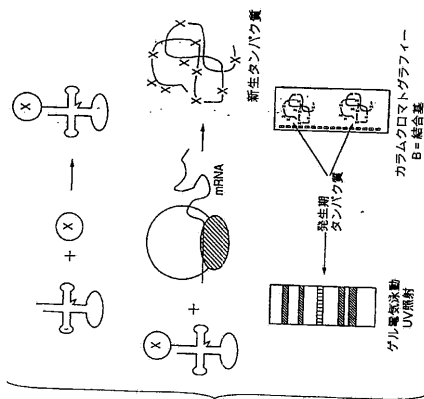
【 図 1 2 】



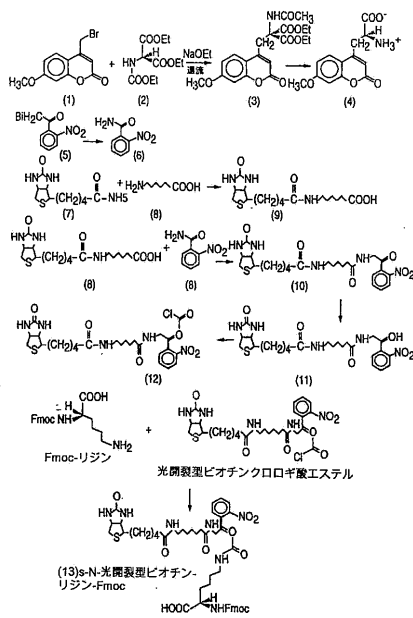
【 図 1 3 】



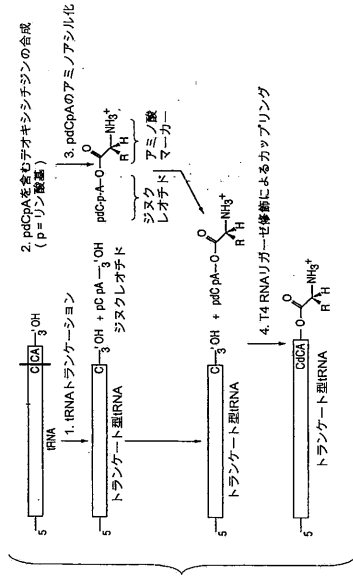
【 図 1 4 】



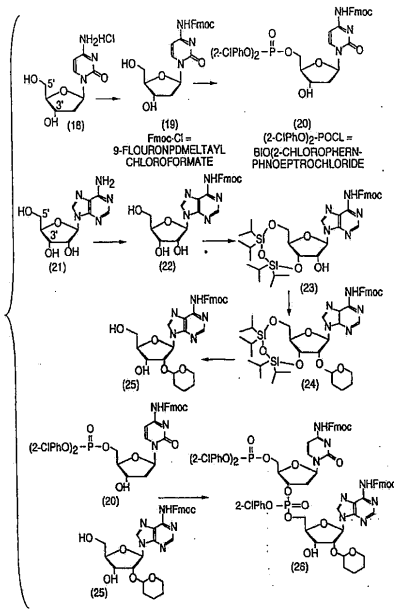
【 図 1 5 】



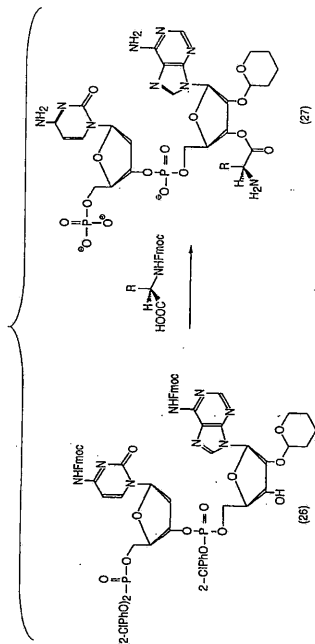
【 図 16 】



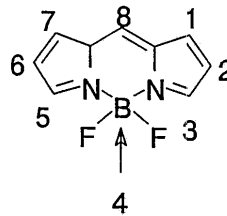
【 図 17 】



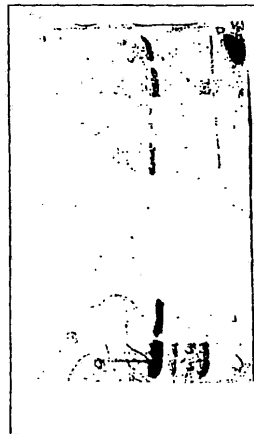
【 図 18 】



【 図 19 】

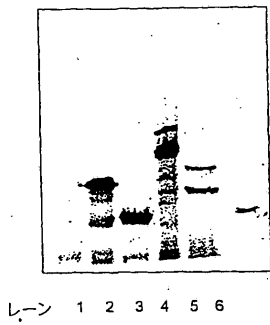


【 図 20 】

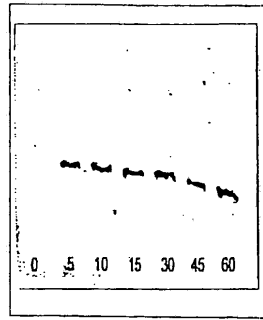


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

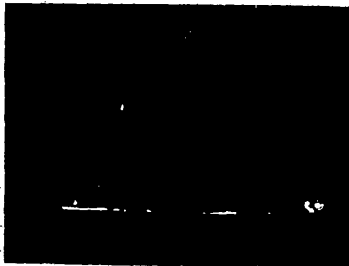
【図21A】



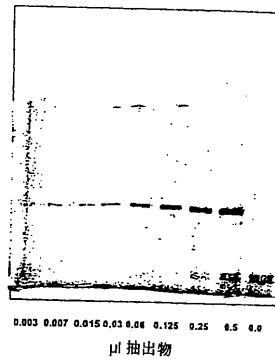
【図22A】



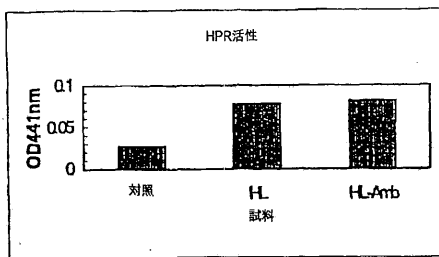
【図21B】



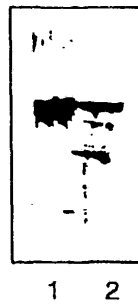
【図22B】



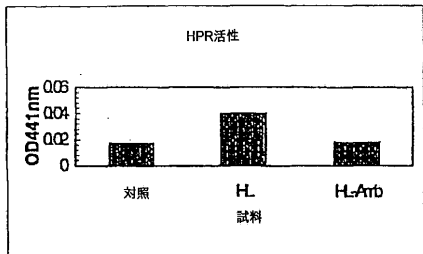
【図23A】



【図24】



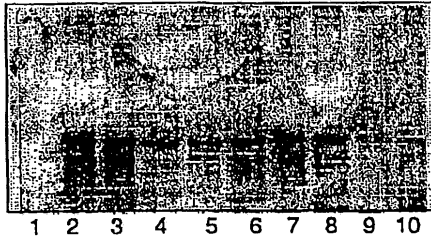
【図23B】



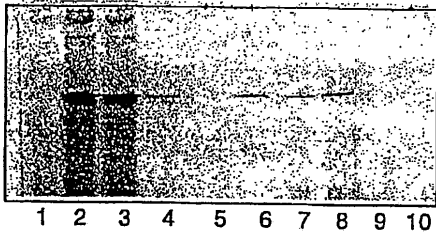
【図25】



【 26 A】



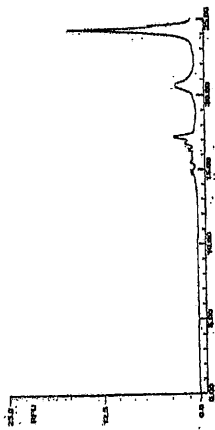
【 26 B】



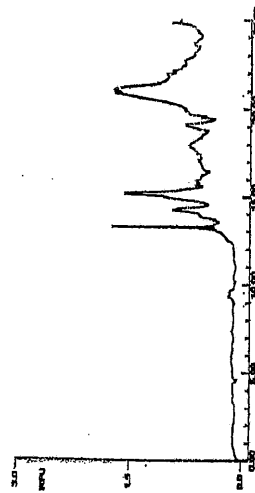
【 27】




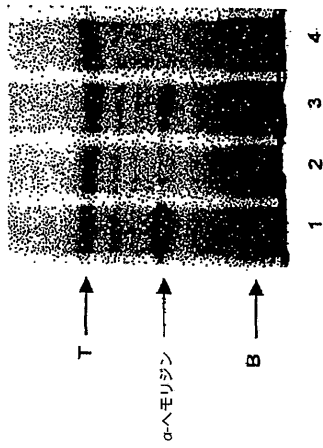
【 28 A】




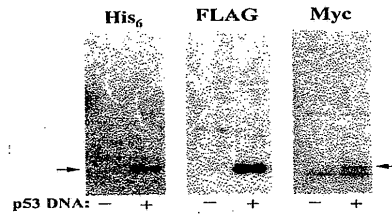
【 28 B】




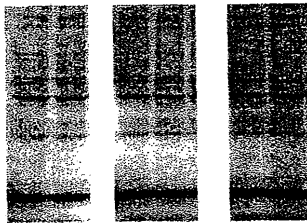
【 29】




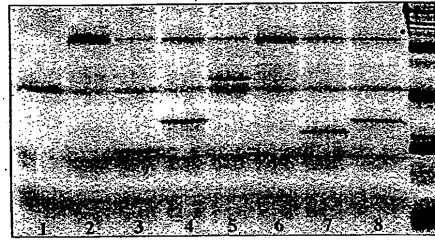
【 30 B】




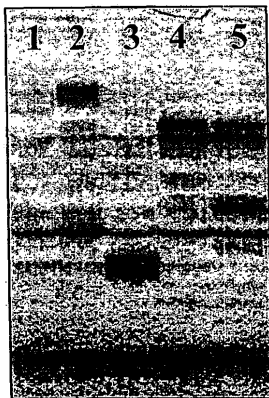
【 30 A】




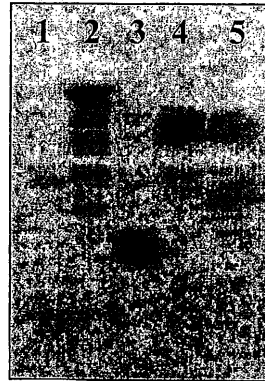
【 31】



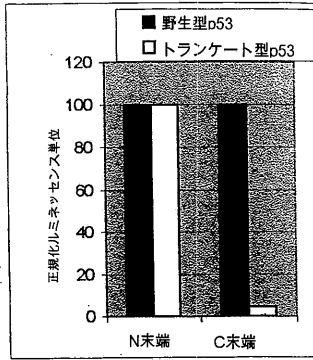
【 32 A】



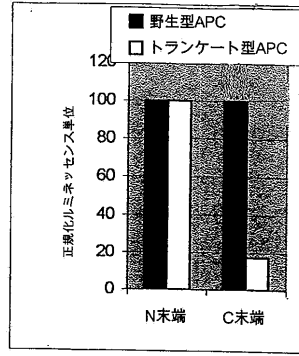
【 32 B】



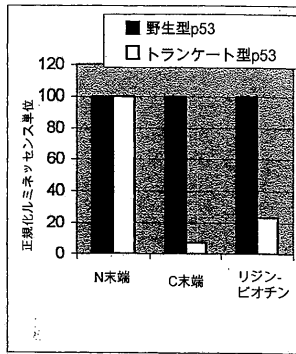
【図33A】



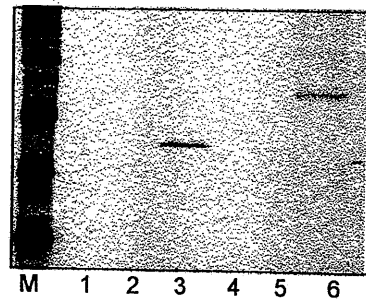
【図33C】



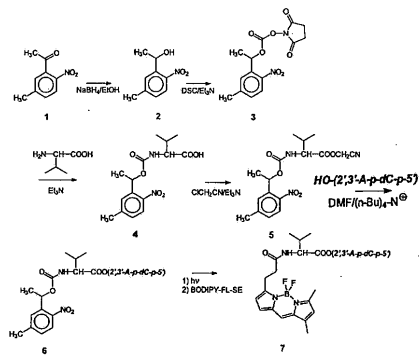
【図33B】



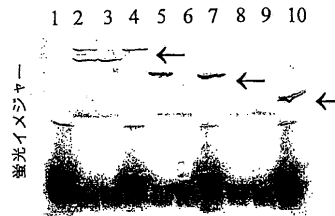
【図34】



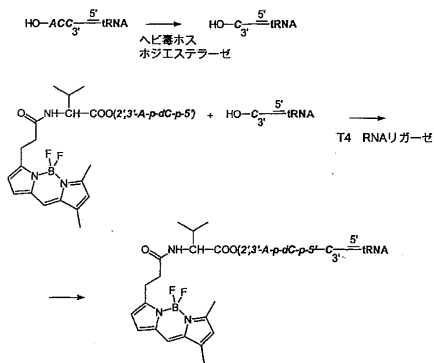
【図35】



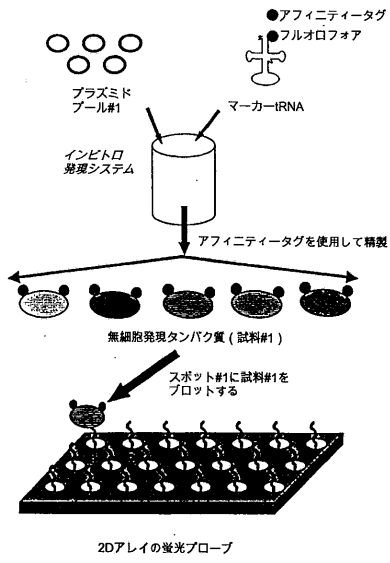
【図37】



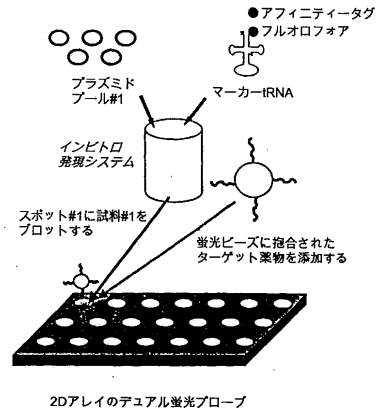
【図36】



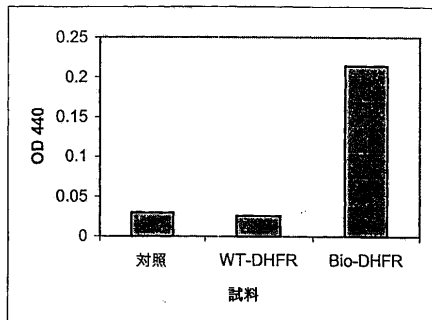
【図38】



【図39】



【図40】



## フロントページの続き

- (72)発明者 ガイト, サダナンド  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, 808 メモリアル ドライ  
ブ
- (72)発明者 オレジニック, ジャージー  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02134, オールストン, 1307 コモンウェルス  
アベニュー

## 合議体

審判長 鈴木 恵理子  
審判官 田中 晴絵  
審判官 富永 みどり

- (56)参考文献 特開平7-313169(JP,A)  
特表平10-500409(JP,A)  
HUMAN MUTATION(1997)Vol.9, p.172-176  
Neuromuscular Disorders(1999)Vol.9, p.247-250

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00  
CA  
MEDLINE  
BIOSIS  
PUBMED

专利名称(译)	检测，分析和分离新生蛋白质		
公开(公告)号	<a href="#">JP5565989B2</a>	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	JP2001518889	申请日	2000-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	安妮成立讨价还价		
申请(专利权)人(译)	安妮成立讨价还价		
当前申请(专利权)人(译)	安妮成立讨价还价		
[标]发明人	ロスチャイルドケニスジェイ ガイトサダナンド オレジニックジャージー		
发明人	ロスチャイルド,ケニス,ジェイ. ガイト,サダナンド オレジニック,ジャージー		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 C07K1/22 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/10 C12N15/67 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	C12N15/1062 C12N15/10 C12N15/67 C12P21/02 G01N33/6803		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C12P21/02.C		
审查员(译)	鈴木惠理子		
优先权	09/382950 1999-08-25 US 09/382736 1999-08-25 US		
其他公开文献	JP2004513604A JP2004513604A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及促进在细胞或无细胞翻译系统内翻译的新生蛋白的检测和分析的非放射性标记。包含这些标记的新生蛋白可以被快速和有效地检测，分离和分析，而没有与放射性试剂相关的处理和处埋问题。优选的标记物是二吡咯亚甲基二氟化硼(4,4-二氟-4-硼-3a, 4a-二氮杂-s-不对称-引达省)染料。

ヒト分子遺伝学におけるPTTの適用

参照疾患	%トランケート型突然変異	遺伝子
家族性腺腫性ポリポー症	95%	APC
遺伝性靱帯様疾患 (hereditary desmold disease)	100%	APC
毛細管拡張性失調症	90%	ATM
遺伝性乳がん及び卵巣がん	90% 90%	BRCA1 BRCA2
囊胞性線維症	15%	CFTR
デュシェンヌ筋ジストロフィ	95%	DMD
エメリ・デュライファス筋ジストロフィ	80%	EMD
ファンconi貧血症	80%	FAA
ハンター症候群	-50%	IDS
遺伝性非ポリープ性結腸・直腸がん	-80% -70%	hMSH2 hMLH1
神経線維腫症 1型	50%	NF1
神経線維腫症 2型	65%	NF2
多囊胞性腎臓疾患	95%	PKD1
ルビンスタイン・ティビ症候群	10%	RTS

PTTを使用して検出可能であるべき、報告済みトランケート型突然変異の比率