

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 500051

(P2003 - 500051A)

(43)公表日 平成15年1月7日(2003.1.7)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード (参考)
C 1 2 N 15/00	ZNA	C 1 2 N 1/15	2 G 0 4 5
1/15		1/19	4 B 0 2 4
1/19		1/21	4 B 0 6 3
1/21		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
5/10		1/34	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全116数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 620079(P2000 - 620079)

(86) (22)出願日 平成12年3月16日(2000.3.16)

(85) 翻訳文提出日 平成13年11月26日(2001.11.26)

(86) 国際出願番号 PCT/US00/07108

(87) 国際公開番号 W000/071702

(87) 国際公開日 平成12年11月30日(2000.11.30)

(31) 優先権主張番号 60/135,926

(32) 優先日 平成11年5月25日(1999.5.25)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/175,968

(32) 優先日 平成12年1月13日(2000.1.13)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 パノラマ リサーチ, インコーポレイティ
ド
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043, マ
ウンテン ビュー, ワイアンドット ストリ
ート 2462

(72)発明者 バリント, ロバート エフ.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94306, パ
ロ アルト, スクリップス アベニュー 400
3

(72)発明者 ハー, ジェン - ホーン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95130, サ
ンノゼ, ウェストン ドライブ 2378

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 相互作用活性化タンパク質

(57) 【要約】

クラスA ラクタマーゼ(E. coliのTEM-1)

断片対が、それらの親タンパク質への機能的再組み立てが断片対の切断点末端に遺伝工学的または化学的に接合させてある異種ポリペプチドまたは他の分子の相互作用に依存するものとして開示される。さらに、親機能タンパク質へと最適に組み立てられる断片対を検出する方法が提供される。分子相互作用依存性酵素を含む断片対の用途は(1)2以上の独立結合部位をもつ任意の検体を対象とする均質検定法およびバイオセンサー、(2)がん、慢性炎症、アテローム性動脈硬化症、アミロイド症、感染症、移植拒絶反応、およびその他病理の早期発見・治療のための治療用および造影用試薬の組織局在的な生体内活性化、(3)標的経路のアゴニスト/アンタゴニストの高効率高性能スクリーニングのための代謝またはシグナル伝達経路の活性化または阻害を検出する細胞系センサー、(4)細胞、組織および病原体のプロテオーム内および間の対単位のタンパク質-タンパク質相互作用の高性能マッピング、(5)目的タンパク質に特異的に結合する抗体断片または他の結合タンパク質の迅速な選択、(6)抗細胞および抗組織抗体に対応する抗原の迅速な検出、(7)抗体に対応するエピトープの迅速な検出、(8)任意のタンパク質-タンパク質相互作用



【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質中の機能的断片を検出する方法において、

マーカータンパク質の断片を、各断片が前記マーカータンパク質の溶媒暴露ループ内に切断点末端を有し各CまたはN末端のNまたはC末端残基がそれぞれ前記切断点末端を構成するように調製して、マーカー断片のライブラリーが得られるようにすること

前記マーカー断片ライブラリーの要素を非常に多数の宿主細胞中で発現させること

機能的に再構成された前記マーカータンパク質をすでに形成している断片対の第1要素と第2要素を含む細胞の指標として前記マーカータンパク質を発現する宿主細胞を単離し、もって前記の機能的断片対が検出されるようにすること

を含む方法。

【請求項2】 機能的に再構成されたマーカータンパク質が直接選択可能なシグナルを与える請求項1記載の方法。

【請求項3】 断片対の第1および第2要素が共にマーカータンパク質の不連続、連続または重複配列の1つを含み、また前記マーカータンパク質の全長の約90～110%を占める請求項1記載の方法。

【請求項4】 第1要素と第2要素がそれぞれさらに、切断点末端から5アミノ酸位置以内にシステイン残基を含み、前記第1要素と第2要素の間にジスルフィド結合が形成されうるようにした請求項1記載の方法。

【請求項5】 システイン残基が切断点末端にある請求項4記載の方法。

【請求項6】 タンパク質が酵素である請求項1記載の方法。

【請求項7】 酵素がラクタマーゼである請求項5記載の方法。

【請求項8】 マーカータンパク質の断片がそれぞれfosまたはjun転写因子との融合タンパク質として発現する請求項1記載の方法。

【請求項9】 第1オリゴペプチドの結合相手である第2オリゴペプチドを検出する方法において、

第1オリゴペプチドとライブラリー要素によってコードされる第2オリゴペプチドとをそれぞれ、請求項1記載の方法に従ってそれぞれ得られるマーカータンパ

ク質の断片対の第1要素と第2要素との融合タンパク質として非常に多数の宿主細胞中で同時発現させ、その過程で前記第1オリゴペプチドの前記第2オリゴペプチドへの結合により前記マーカートンパク質が機能的に再構成される結果となるようにすること

すでに相互作用した第1オリゴペプチドと第2オリゴペプチドを含んでいる細胞の指標となる前記マーカートンパク質を発現させる宿主細胞を単離すること

前記融合タンパク質をコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって第1オリゴペプチドの結合相手である第2ペプチドが検出されるようにすること

を含む方法。

【請求項10】 各融合タンパク質がさらにシグナルペプチドを含む請求項9記載の方法。

【請求項11】 シグナルペプチドが細菌細胞のペリプラズムへの転位を導く請求項10記載の方法。

【請求項12】 第1オリゴペプチドと第2オリゴペプチドが細胞外タンパク質である請求項11記載の方法。

【請求項13】 各融合タンパク質がさらに、切断点末端と第1または第2オリゴヌクレオチドの間にフレキシブルポリペプチドリンカーを含む請求項10記載の方法。

【請求項14】 融合タンパク質がさらに、次のもののうち少なくとも一つを含む請求項9記載の方法：

i) 切断点末端とフレキシブルポリペプチドリンカーの間の、アミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチド

ii) 切断点末端から5アミノ酸位置以内のシステイン残基、および

iii) 断片対の要素をコードするヌクレオチド配列の誤りがち(error-prone)の条件下でのPCR増幅によって導入された、再構成マーカートンパク質の折りたたみ安定性を強めるための前記断片対要素内の1~3個のコドン変更。

【請求項15】 チオレドキシンのN末端への融合体として別個に同時発現させたアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドをさらに含む請求項9記載の

方法。

【請求項16】 宿主細胞が大腸菌(E. coli)細胞である請求項9記載の方法。

【請求項17】 マーカータンパク質が酵素である請求項9記載の方法。

【請求項18】 酵素がラクタマーゼである請求項17記載の方法。

【請求項19】 第1オリゴペプチドが一本鎖抗体Fv断片、抗体軽鎖可変領域および細胞表面分子から成る群より選択され、また第2オリゴペプチドがチオレドキシンまたはリン酸化調節シグナル伝達タンパク質の活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドである請求項9記載の方法。

【請求項20】 細胞表面分子がCD40である請求項19記載の方法。

【請求項21】 リン酸化調節シグナル伝達タンパク質がチロシンキナーゼである請求項19記載の方法。

【請求項22】 C末端切断点をもつN末端断片を含む第1オリゴペプチドとN末端切断点をもつC末端断片を含む第2オリゴペプチドとを含む断片相補システムにおいて、前記N末端断片と前記C末端断片がそれぞれマーカータンパク質に由来し、かつ再び組み立てられて機能的に再構成されたマーカータンパク質を形成するような断片相補システム。

【請求項23】 第1オリゴペプチドと第2オリゴペプチドがそれぞれさらに、切断点から5アミノ酸位置以内にシステイン残基を含む請求項22記載の断片相補システム。

【請求項24】 システイン残基が切断点にある請求項23記載の方法。

【請求項25】 切断点を介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと融合されたN末端断片と第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび第2相互作用因子ドメインと切断点を介してC末端断片へと融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを含む断片相補システムにおいて、前記N末端断片と前記C末端断片がどちらも直接選択可能なシグナルを備えるマーカータンパク質に由来し、また前記N末端断片と前記C末端断片が請求項1記載の方法に従って得られ、また前記N末端断片と前記C末端断片は前記第1相互作用因子ドメインが前記第2相互作用因子ドメインと結合する場合に限って

前記マーカートンパク質を機能的に再構成するような断片相補システム。

【請求項26】 第1および第2オリゴペプチドがさらにシグナルペプチドを含む請求項25記載の断片相補システム。

【請求項27】 N末端およびC末端断片が共にマーカートンパク質の不連続、連続または重複配列の1つを含み、また前記マーカートンパク質の全長の約90~110%を占める請求項25記載の断片相補システム。

【請求項28】 マーカートンパク質の機能的再構成が、第1および第2オリゴペプチド配列の少なくとも1つに、次の修飾のうち少なくとも1つを導入することにより増進される請求項27記載の断片相補システム：

i) 断片とフレキシブルポリペプチドリナーの間にコードされたアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチド

ii) 別個に発現し、かつチオレドキシンのN末端へと作動可能に融合されたアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチド

iii) 断片とフレキシブルポリペプチドリナーの間にコードされたシステイン残基、または

iv) 断片をコードするヌクレオチド配列を誤りがちの条件下でPCR増幅することにより導入された、再構成マーカートンパク質のより安定した折りたたみを可能にするための断片分子当たり1~3個のコドン変更。

【請求項29】 直接選択可能なシグナルが明確な表現型変化または抗生物質耐性である請求項25記載の断片相補システム。

【請求項30】 直接選択可能なシグナルを備えるタンパク質が酵素である請求項25記載の断片相補システム。

【請求項31】 第1相互作用因子ドメインが一本鎖抗体Fv断片、抗体軽鎖可変領域および細胞表面分子から成る群より選択され、また第2相互作用因子ドメインがE. coliチオレドキシンまたはリン酸化調節シグナル伝達タンパク質の活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドを含む請求項28記載の断片相補システム。

【請求項32】 細胞表面分子がCD40である請求項31記載の断片相補システム。

【請求項33】 リン酸化調節シグナル伝達タンパク質がチロシンキナーゼである請求項31記載の断片相補システム。

【請求項34】 第1相互作用因子ドメインが第1ライブラリー由来のポリペプチドをコードし、また第2相互作用因子ドメインが第2ライブラリー由来のポリペプチドをコードする請求項25記載の断片相補システム。

【請求項35】 切断点を介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと融合されたラクタマーゼのN末端断片と第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび第2相互作用因子ドメインと切断点を介してラクタマーゼのC末端断片へと融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを含む断片相補システムにおいて、前記N末端断片と前記C末端断片が、前記第1相互作用因子ドメインが前記第2相互作用因子ドメインと結合する場合に前記ラクタマーゼを機能的に再構成するような断片相補システム。

【請求項36】 ラクタマーゼの機能的再構成が、第1および第2オリゴペプチド配列の少なくとも1つに、次の修飾のうち少なくとも1つを導入することにより増進される請求項35記載の断片相補システム：

- i) 断片とフレキシブルポリペプチドリンカーの間にコードされたアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチド、
- ii) 別個に発現し、かつチオレドキシンのN末端へと作動可能に融合されたアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチド、
- iii) 断片とフレキシブルポリペプチドリンカーの間にコードされたシステイン残基、または
- iv) 断片をコードするヌクレオチド配列を誤りがちの条件下でPCR増幅することにより導入された、再構成ラクタマーゼのより安定した折りたたみを可能にするための断片分子当たり1~3個のコドン変更。

【請求項37】 アミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドがトリペプチドであり、またN末端断片に融合されたトリペプチドがHSE、NGR、GREおよびEKRから成る群より選択され、かつC末端断片に融合されたトリペプチドがREQ、QGN、DGR、GRRおよびGNSから成る群より選択される請求項35記載の断片相補システム。

【請求項38】 N末端断片またはC末端断片の切断点がN52/S53、E63/E64、Q99/N100、P174/N175、E197/L198、K215/V216、A227/G228およびG253/K254からなる群より選択されるアミノ酸残基間の接合部からいずれかの方向で10残基以内にある請求項36記載の断片相補システム。

【請求項39】 N末端断片またはC末端断片の切断点がアミノ酸残基E197およびL198の接合部からいずれかの方向で10残基以内にある請求項36記載の断片相補システム。

【請求項40】 アミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドがトリペプチドGREを含む請求項39記載の断片相補システム。

【請求項41】 N末端断片が、K55E、P62SおよびM182Tから成る群より選択される少なくとも1つの突然変異を含む請求項35記載の断片相補システム。

【請求項42】 転写方向に作動可能に結合された構成要素として

- (i) 宿主細胞内で機能するプロモーター
- (ii) ポリペプチド相互作用因子ドメイン
- (iii) フレキシブルポリペプチドリンカー、および
- (iv) 選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む発現カセット。

【請求項43】 転写方向に作動可能に結合された構成要素として

- (i) 宿主細胞内で機能するプロモーター
- (ii) 選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質のN末端断片
- (iii) フレキシブルポリペプチドリンカー、および
- (iv) ポリペプチド相互作用因子ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む発現カセット。

【請求項44】 シグナルペプチドをコードする配列をさらに含む請求項42または43記載の発現カセット。

【請求項45】 シグナルペプチドが細菌ペリプラズムへの転位を誘導する請求項44記載の発現カセット。

【請求項46】 相互作用因子ドメインが細胞外タンパク質である請求項45記載の発現カセット。

【請求項47】 選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質がラクタマーゼである請求項42または43記載の発現カセット。

【請求項48】 アミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドまたはN末端断片をコードする配列とフレキシブルポリペプチドリンカーをコードする配列との間に作動可能に結合されたシステイン残基のうち少なくとも1つをコードする配列をさらに含む請求項42記載の発現カセット。

【請求項49】 アミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドまたはフレキシブルポリペプチドリンカーをコードする配列とC末端断片をコードする配列との間に作動可能に結合されたシステイン残基のうち少なくとも1つをコードする配列をさらに含む請求項43記載の発現カセット。

【請求項50】 請求項42記載の発現カセットである第1発現カセットおよび請求項43記載のカセットである第2発現カセットを含む宿主細胞。

【請求項51】 免疫グロブリン可変領域に結合するエピトープを検出する方法において、

枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと作動可能に融合されたラクタマーゼのN末端断片とチオレドキシンの活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドから成る第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび一本鎖Fv断片または抗体軽鎖可変領域から成る第2相互作用因子ドメインと枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してラクタマーゼのC末端断片へと作動可能に融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを、宿主細胞中に共に収めたプラスミドから同時発現させ、その過程で前記第1相互作用因子ドメインの前記第2相互作用因子ドメインとの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再構成されるようにすること

アンピシリン耐性の宿主細胞を単離すること、および

前記第1および第2オリゴペプチドをコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって前記免疫グロブリン可変領域に結合する前記エピトープが検出されるようにすること

を含んで成る方法。

【請求項52】 膜貫通タンパク質の細胞外ドメインとポリペプチドの間の相互作用を検出する方法において、

枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと作動可能に融合されたラクタマーゼのN末端断片とチオレドキシンの活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドから成る第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび膜貫通タンパク質から成る第2相互作用因子ドメインと枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してラクタマーゼのC末端断片へと作動可能に融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを、宿主細胞中に共に収めたプラスミドから個別に発現させ、その過程で前記第1相互作用因子ドメインの前記第2相互作用因子ドメインとの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再構成されるようにすること

アンピシリン耐性の宿主細胞を単離すること、および

前記第1および第2オリゴペプチドをコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって前記膜貫通タンパク質に結合する前記ポリペプチドが検出されるようにすること

を含んで成る方法。

【請求項53】 膜貫通タンパク質が免疫細胞タンパク質である請求項52記載の方法。

【請求項54】 前記細胞がCD40である請求項53記載の方法。

【請求項55】 試料中のタンパク質-タンパク質相互作用の発生を監視する方法において、

第1細胞ライブラリーの第1オリゴペプチド要素と第2細胞ライブラリーの第2オリゴペプチド要素をそれぞれ、請求項1記載の方法に従ってそれぞれ得られるマーカートンパク質の断片対の第1要素と第2要素との融合タンパク質として宿主細胞中で同時発現させ、その過程で前記第1オリゴペプチドの前記第2オリゴペプチドへの結合の結果として前記マーカートンパク質が機能的に再組み立てされるようにすること

すでに前記マーカートンパク質を機能的に再構成した断片対の第1要素と第2要

素を含む細胞の指標となる前記マーカートンパク質を発現する宿主細胞を単離すること、および

前記融合タンパク質をコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって前記タンパク質-タンパク質相互作用が監視されるようにすることを含む方法。

【請求項56】 2つの異なるプロテオーム間のオリゴペプチド相互作用を検出する方法において、

第1細胞ライブラリーの第1オリゴペプチド要素と第2細胞ライブラリーの第2オリゴペプチド要素をそれぞれ、請求項1記載の方法に従ってそれぞれ得られるラクタマーゼの断片対の第1要素と第2要素との融合タンパク質として宿主細胞中で同時発現させ、その過程で前記第1オリゴペプチドの前記第2オリゴペプチドへの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再組み立てされるようにすること

アンピシリン耐性の宿主細胞を単離すること、および

前記融合タンパク質をコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって2つの異なるプロテオーム間の前記オリゴペプチド相互作用が検出されるようにすること

を含む方法。

【請求項57】 細胞ライブラリーが腫瘍細胞または免疫細胞に由来する請求項55または56記載の方法。

【請求項58】 リン酸化調節細胞シグナル変換器を阻害する化合物のハイスループット検出方法において、

枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと作動可能に融合されたラクタマーゼのN末端断片とリン酸化調節細胞シグナル伝達因子の非リン酸化活性部位を結合する一本鎖Fv断片または抗体軽鎖可変領域から成る第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよびリン酸化調節細胞シグナル伝達タンパク質から成る第2相互作用因子ドメインと枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してラクタマーゼのC末端へと作動可能に融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む

む第2オリゴペプチドを、宿主細胞中に共に収めたプラスミドから同時発現させ、その過程で前記第1相互作用因子ドメインの前記第2相互作用因子ドメインとの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再構成されるようにすること

ラクタマーゼ色原基質の存在下で宿主細胞の色を変える結果となる前記化合物を検出すること

を含んで成る方法。

【請求項59】 リン酸化調節細胞シグナル伝達タンパク質がチロシンキナーゼである請求項58記載の方法。

【請求項60】 チロシンキナーゼがHer-2/neuである請求項59記載の方法。

【請求項61】 多重遺伝要素の宿主細胞への同時組み込み用の選択のための酵素相補システムにおいて、

抗生物質耐性タンパク質のN末端断片とC末端断片を宿主細胞中で同時発現させ、その過程で前記N末端断片が第1形質をもコードする第1組み換え配列から発現し、また前記C末端断片が第2形質をもコードする第2組み換え配列から発現するようにし、第1および第2組み換え配列の両方からポリペプチドを発現させる前記細胞が前記抗生物質耐性タンパク質を再構成するに足る量の前記N末端断片および前記C末端断片を産生するようにすること、および

前記抗生物質に対する耐性をもつ細胞を単離すること

を含んで成る酵素相補システム。

【請求項62】 抗腫瘍化合物のラクタム誘導体を、それを必要とする宿主中で活性化する方法において、

i) 前記宿主に対し、ラクタマーゼのN末端断片、フレキシブルポリペプチドリンカーおよび腫瘍タンパク質のエピトープに対する第1一本鎖Fv断片を含む第1オリゴペプチドと、前期腫瘍タンパク質の第2非重複エピトープに対する第2一本鎖Fv断片、フレキシブルポリペプチドリンカーおよびラクタマーゼのC末端断片を含む第2オリゴペプチドとを同時に投与して、前記一本鎖Fv断片の前記エピトープへの結合の結果としてラクタマーゼが機能的に再構成されるようにすること、および

ii) 前記抗腫瘍化合物の前記ラクタム誘導体を前記宿主に投与し、もって前記誘導体が腫瘍タンパク質の近くで前記再構成ラクタマーゼにより活性化されるようにすること
を含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

はじめに

技術分野

本発明はタンパク質間相互作用の検出に関連する。この検出は、直接検出可能なタンパク質へと再び組み立てられることになる断片対の一方の断片をもコードする融合体配列の一部として相互作用タンパク質を発現させることによって行われる。本発明の相互作用依存性酵素会合(IdEA)システムの代表例は細菌性ラクタマーゼ類である。これは構造的に関連し合う一大酵素群であり、構造相同性と基質特異性に応じて数群に細分される。

背景

ほとんどの生理プロセスは、細胞表面での多タンパク質複合体のリガンド依存性組み立てから複雑に入り組んだ細胞内シグナル伝達カスケードを経て特定遺伝子のプロモーター上での転写調節複合体の組み立てに至るまで、主としてタンパク質間の特異的認識を通じて互いにまたそれぞれの環境と相互作用する細胞の複雑なネットワークに依存する。したがって、ほとんどの病理状態にはタンパク質-タンパク質相互作用が役立ち、また診断治療のための多様な標的を提供してくれる。そこで、(1)疾病で果たす役割の研究を目的とした主要関係物質の天然リガンドを検出し(2)診断治療のための代用リガンドを開発するための、新方法や改良方法が絶えず求められている。多数の方法がこれまでに開発されてきた。目的タンパク質と相互作用する天然タンパク質を検出するために最も広く使用されている方法は一般にcDNA発現ライブラリーのスクリーニングに係る。目的タンパク質のリガンドに対応する少数の遺伝子は、抗体プロービングの場合のように、標識付けした目的タンパク質と結合させるためのフィルター上でcDNA発現ライブラリーを直接スクリーニングして単離されてきた(Blackwood and Eisenman, *Science*(1991) 251:1211; Defeo-Jones et al., *Nature*(1991) 352:251)。しかし、きわめて多数の重要なタンパク質相互作用は、相互作用条件が自然とは程遠いこうした方法の荒々しさに耐えうるほど堅固ではない。また、これらの方法は偽陽性頻度も高い。標的タンパク質をプローブと接触させるために固定化处理し

た細胞内には変性タンパク質が存在するためである。

【0002】

cDNAスクリーニングの方法論は、スクリーニング可能または選択可能な細胞表現型を生きた細胞内の所望のタンパク質相互作用に依存させるよう改変することを可能にしたシステムの開発に伴い大きく前進した(Fields and Song, Nature (1989) 340:245; Chien et al., Proc Natl Acad Sci (1991) 88:9578; Zervos et al., Cell(1993) 72:223; Vojtek et al., Cell(1993) 74:205; Luban et al., Cell (1993) 73:1067)。なかでも最も広く使用されているのは前掲Fields and Song (1989)の酵母「ツーハイブリッド」システムである。このシステムはタンパク質中の多数の機能的ドメインの「モジュール性」を利用して諸機能の連結を操作しうるようにしている。これは特に転写アクチベーターの場合に言えるが、そこではコア転写複合体と相互作用する活性化ドメインが配列特異的DNA結合ドメインにより特定の遺伝子へと「誘導」される。多数の転写アクチベーターの場合、これらのドメインは独立に機能することができるし、また実際にはしばしば別個の、相互作用サブユニットをなす。酵母ツーハイブリッドシステムでは、「餌」タンパク質はシスエレメント配列特異的DNA結合ドメインとの融合体として発現し、またcDNAは転写活性化ドメインとの融合体として発現する。これら2つのドメインがcDNA産物と「餌」タンパク質の相互作用により引き合わされると、またそのときに限って、レポーター遺伝子の発現が可能になる。というのは、その転写はシスエレメントからの転写活性化に依存するからである。レポーターはスクリーニング可能(色を指標とする ガラクトシダーゼなど)、選択可能(ヒスチジン不在下での増殖能を指標とするHIS3など)のいずれでもよい。

【0003】

このシステムの変種は多数の重要なタンパク質-タンパク質相互作用を検出するために首尾よく使用されてきた(Chien et al., 1991, supra; Zervos et al., 1993, supra; Vojtek et al., 1993, supra; Luban et al., 1993, supra; Bartel et al., Nature Genetics (1996) 2:72; Fromont-Racine et al., Nature Genetics (1997) 3:277; Xu et al., Proc Natl Acad Sci (1997) 94:12473)。しかしその成功にもかかわらず、原初のツーハイブリッドシステムには、ゲノミッ

クスからの製剤標的の回収を加速するためのハイスループット用途向けとしては重大な欠点がある。このシステムの根本的な限界は試験相互作用から選択可能表現型の生成までに多数のステップが必要とされる点にある。そうしたステップのたびに偽陽性バックグラウンドを生じさせる非特異的相互作用や真の相互作用因子の見落としを招く解離のリスクが生れる。転写機構の高度の組み合わせ性や、転写アクチベーター結合プロモーターを含む転写開始複合体の1以上の成分と相互作用しかねないcDNAライブラリー中にコード化されたタンパク質ドメインの多さなど、偽陽性問題を悪化させる要因もある(Bartel et al., *BioTechniques* (1993) 14:920)。原初のツーハイブリッドシステムには、一般に分泌または膜タンパク質には対応できず、細胞質タンパク質が酵母核内で安定的でなければならないという限界もある。

【0004】

最近、他タイプのタンパク質機能をもタンパク質-タンパク質相互作用レポートシステムとして使用する方向へとツーハイブリッドのコンセプトが拡張された。たとえば選択感染性ファージ(SIP)システムでは、線状ファージに感染力を付与する機能を果たすタンパク質を断片化して、断片が異種相互作用因子へと融合する場合に限ってそのタンパク質が機能するようにしてある(Krebber et al., *J Mol Biol* (1997) 268:607)。そこで、相互作用因子コード化ファージに選択可能表現型を感染によって受容細胞へと導入すること許す働きからこの相互作用をモニターする。しかし、この方法もまた標的相互作用から受容細胞による選択可能表現型の発現までの間に多数の低効率ステップを必要とするという難点がある。このシステムもツーハイブリッドシステムと同様に、大部分の天然タンパク質-タンパク質相互作用がmMレンジで親和性をもち、その半減期は秒単位であるという事実から、効率の低下に見舞われる。相互作用とシグナル生成のタイムラグがこの半減期を上回ると - このシステムでは現にそうであるが -、相互作用検出効率は急低下する。

【0005】

さらに最近になって、タンパク質-タンパク質相互作用から直接、標的相互作用とシグナル生成の間にほとんどまたはまったくステップを介在させずに、選択

可能表現型を付与しうるタンパク質に適合させたツーハイブリッドコンセプトが現れている。たとえば、相互作用因子を近づけると検出可能な蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を起こす*Aequorea victoria*のグリーン蛍光タンパク質(GFP)の変種に相互作用因子を融合させることができる(Cubitt et al., Trends Biochem (1995) 20:448)。選択可能またはスクリーニング可能な表現型を細胞に付与する一部の酵素もまたツーハイブリッド型のタンパク質-タンパク質相互作用検出に適合させることができる(Rossi et al., Proc Natl Acad Sci (1997) 94:8405; Pelletier et al., Proc Natl Acad Sci (1998) 95:12141)。この変法では相互作用タンパク質を酵素断片と融合させる。これらの酵素断片はそれ自体では不活性であるが、融合相手のタンパク質ドメインの相互作用によって引き合わされると会合し、酵素の選択可能活性を復活させることができる。これが相互作用依存性酵素活性化(IdEA)の一例であり、図解すると図1のようになる。IdEA、GFP FRET両システムには従来版のツーハイブリッドコンセプトに比していくつかの強みがある。たとえば、選択可能シグナルは所望の相互作用から直接、在来システムの非効率の主因となっているステップを一切介在させずに、生成される。こうした効率面、バックグラウンド面の改善はこれらの方法をハイスループット用途になじみやすくするはずである。しかし、IdEA、GFP FRETどちらのシステムも理論的には、相互作用を天然環境内でモニターできるように原核、真核両細胞で、また細胞質中でも分泌経路中でも構築しうるが、実際にはそうになっていない。今日までに報告されているIdEAシステムはどれも細胞質酵素を利用しているだけであり、また細胞質環境で有効であるにすぎない(Rossi et al., 1997, supra; Pelletier et al., 1998, supra; Karimova et al., Proc Natl Acad Sci (1998) 95:752)。実は、報告されているこれらのシステムはその設計のせいで、分泌経路内または細菌ペリプラズム内では機能しないと見込まれよう。したがって、分泌タンパク質の相互作用のモニタリングに有効であるとはみなされない。

【0006】

細胞外タンパク質-タンパク質相互作用検出用の最も広く使用されている現行システム、すなわちウィルスまたは細胞ディスプレイシステムは本質的に、高ストリンジェンシー選択および/または高バックグラウンドの*in vitro*法である。し

たがって、ハイスループット用途にはあまり向かない。これらのシステムはまた通常、既知の精製済み異種相互作用因子ドメインまたは「餌タンパク質」の使用を必要とし、したがってタンパク質結合対のいずれの異種相互作用因子ドメインも先験的に知られていないような多重用途、すなわちすべてのタンパク質結合対の相互作用の同時検出を目的とした2タンパク質ライブラリー相互の組み合わせ相互反応には向かない。細胞外相互作用の検出に餌の精製を必要としないシステムの1つにE. coli二量体検出システム(EDDS; Small Molecule Therapeutics, Inc., Monmouth Junction, NJ)がある。このシステムのための餌タンパク質は、単一の膜貫通領域をもちシグナル生成に単純二量体化を必要とするI型膜受容体に限られる。餌受容体のエクトドメインは膜貫通領域とE. coliのエンドドメインに融合している。この融合タンパク質が細菌ペリプラズム内で発現ベクターと同時に発現するとき、受容体に対応するリガンドを、受容体を二量体化し選択可能表現型の発現を誘発するその能力によって検出することができる。しかしこのシステムには酵母ツーハイブリッドシステムやSIPシステムと同じ限界、すなわち相互作用と表現型間の多数のステップが高い偽陽性および偽陰性率のために重大な効率低下を招くという限界がある。

【0007】

したがって、ハイスループット用途で細胞外および細胞内タンパク質間の多重相互作用の同時検出を可能にするようなIdEAシステムを開発することが重要である。

関連文献

USPN 5,585,245は、結合対の二つの既定タンパク質の結合がユビキチナーゼによるユビキチンの特異的タンパク質分解として検出されるユビキチン系タンパク質センサー相補システムについて開示している。PCT公開WO 98/44350はガラクトシダーゼサブユニットの融合タンパク質を使用するレポーターサブユニット相補システムについて開示している。PCT公開WO 98/34120はジヒドロ葉酸を使用するタンパク質断片相補システムについて開示している。

要約

相互作用依存性タンパク質会合システムを使用してポリペプチド間の相互作用

を検出するための組成物と方法を提供する。このシステムは、直接検出可能なシグナル、たとえば明確な表現型の変化または抗生物質耐性などを備えるマーカートンパク質へと機能的に再組み立てされる第1および第2要素から成る断片対の使用を特徴とする。本発明の断片対相補システムは第1および第2オリゴペプチドの宿主細胞内での同時発現を伴うが、各オリゴペプチドはマーカートンパク質断片対の一方の要素との、フレキシブルポリペプチドリンカーで隔てられた融合タンパク質である。第1オリゴペプチドと第2オリゴペプチドが結合すると断片対がマーカートンパク質へと機能的に再構成される結果となり、また第1および第2オリゴペプチドの相互作用は、マーカートンパク質の存在のしるしとなる直接検出可能シグナルを示すプラスミドを宿主細胞から単離し配列決定することにより検出される。マーカートンパク質への断片対の機能的再構成は、断片対要素の切断点末端またはその近傍の3~12個のアミノ酸から成るシステイン残基またはランダムコード化ペプチドなどのようなエレメントを加えて、または断片対要素をコードする核酸配列内に1~3個のコドン変更を導入して、増進することができる。本発明はまた、三次または二次構造情報を用いたフレキシブルループ内の機能的切断点の特定に関するマーカートンパク質の機能的断片対を見つけ出す効率的な方法を提供する。本発明の相互作用依存性タンパク質活性化システムは免疫グロブリンエピトープ、細胞外タンパク質に結合するポリペプチド配列、およびリン酸化調節シグナル伝達タンパク質の検出に使用できる。このシステムはまた、多様な形質に対応する遺伝子や、誘導抗腫瘍プロドラッグの標的化、局在化された活性化に対応する遺伝子などを発現するよう形質転換した細胞の単一抗生物質による選択を可能にする方法にも使用できる。

個別実施態様の簡単な説明

第1タンパク質と第2標的タンパク質の相互作用の検出に有効な相互作用依存性タンパク質活性化システムのための方法および組成物が提供される。この方法は第1の既知または未知相互作用因子ドメインと第2の未知相互作用因子ドメインの相互作用を、マーカートンパク質の断片対の両要素を引き合わせて、この親マーカートンパク質が、異種相互作用因子ドメインの事前の相互作用を前提に再び組み立てられて元の機能を回復するようにすることにより検出する。このシステム

は、直接検出可能な、下流ステップでの認識を必要としないシグナルを提供するようなマーカートンパク質に由来し、またそうしたマーカートンパク質へと再び機能的に組み立てることができる断片対を構成する要素としてのN末端断片およびC末端断片を特徴とする。たとえば、本発明にとって関心の的になるマーカートンパク質は自ら、明確な表現型の変化または抗生物質耐性などのような選択可能シグナルを生み出す機能を果たす。

【0008】

断片対は、第1および第2オリゴペプチド配列の同時発現を伴う方法に使用されるが、この場合、第1オリゴペプチド配列は翻訳方向に、切断点末端を介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと融合されたN末端断片と第1相互作用因子ドメインから成り、また第2オリゴペプチド配列は翻訳方向に、第2相互作用因子ドメインと切断点末端を介してC末端断片へと融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーから成る。フレキシブルポリペプチドリンカーは相互作用因子ドメインから断片ドメインを分け隔て、それらの独立した折りたたみを可能にする。リンカーは最適には長さがアミノ酸数で15または60（残基当たり～4）であり、長いほうではアミノ酸数30でもよいが、好ましくはアミノ酸数20以下とし、短いほうではアミノ酸数3ほど少なくともよいが、好ましくはアミノ酸数6以上とする。フレキシビリティを確保するために、また断片ドメインと相互作用因子ドメインの独立した折りたたみを妨げかねない立体障害の導入を防ぐためにも、リンカーはGly、Ala、Valなどのような小さな、好ましくは中性の残基から成るのがよいが、SerやMetなどのようなヘテロ原子を持つ極性残基を含んでも、また電荷型残基を含んでもよい。

【0009】

第1相互作用因子ドメインは、未知のタンパク質またはタンパク質断片である第2標的相互作用因子ドメインと直接または間接に結合する既知または未知のタンパク質またはタンパク質断片であり、また第1および第2相互作用因子ドメインの一方または両方はあるライブラリーの要素でありうる。相互作用因子ドメインライブラリーは好ましくはcDNAから構築するが、たとえば合成DNA、RNAおよびゲノムDNAから構築してもよい。第1および第2オリゴペプチド配列を結合する場合、N

末端およびC末端断片のマーカータンパク質への再構成は、第1および第2相互作用因子ドメインの事前の相互作用を必要とする。結合相互作用因子ドメインは機能的に再構成されたマーカータンパク質を発現することによって検出され、次いで結合相互作用因子ドメインをコードするヌクレオチド配列または結合相互作用因子ドメイン自体が電気泳動、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列決定などのような方法によって特性を解明される。

【0010】

本発明の先行断片相補システムと比べた場合の利点は、再組み立てに際して直接検出可能なシグナルをもたらすレポータータンパク質および 1×10^{-6} 以下のバックグラウンドレベルなどである。さらに本発明は、融合オリゴペプチドに対する合理的に組み込まれた増進的改変を提供して、断片の折りたたみと親タンパク質への再組み立てを改善する一方で再組み立て面での相互作用因子ドメインへの依存性は維持することにより再構成タンパク質の機能活性を野生型レベルにまで高めるようにする。

【0011】

本発明の相互作用依存性酵素活性化システムを使用すれば、*in vitro*タンパク質相互作用(細胞溶解物中のタンパク質相互作用など)または宿主細胞の細胞内または細胞外タンパク質の相互作用を検出することができる。細胞外タンパク質の相互作用を評価するには、第1および第2オリゴペプチドをシグナルペプチドと共に発現させることができる。たとえば細菌宿主細胞では、N末端シグナルペプチドは融合オリゴペプチドのペリプラズムへの転位を導くことができる。結合後のN末端断片とC末端断片は削除切断点の周辺残基と不連続であっても、隣接的であっても、また反復切断点の周辺残基と重複していてもよく、結果的に親タンパク質の全長の90%~110%を含むことになる。切断点末端は本書ではN末端断片のC末端およびC末端断片のN末端として定義される。

【0012】

本発明は再組み立て後の親タンパク質の性能の増進を、次の改変を含む改変のうち少なくとも1つを導入することによってもたらす。i)各断片の切断点末端とフレキシブルポリペプチドリンカーの間のアミノ酸数3~12のランダムコード化

ペプチド、ii)介在型フレキシブルリンカーをもつチオレドキシニンN末端への融合体として別個に発現するアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチド、iii)断片対要素間にジスルフィド結合が形成されうるよう、5アミノ酸位置または位置内に、および各断片の切断点末端とフレキシブルポリペプチドリナーの間に、コード化されるシステイン残基、およびvi)機能的に再構成されたマーカートンパク質の折りたたみ安定性を向上させるために、たとえば断片対要素をコードするヌクレオチド配列の、誤りがちの条件下でのPCR増幅によって導入される、断片対要素内の1~3個のコドン変更。

【0013】

本発明はまた、断片ドメインと相互作用因子ドメインからなる融合オリゴペプチドを発現させるように構築した発現カセットを収めたプラスミドに関連する。N末端およびC末端断片対要素用の発現カセットはその構成要素と共に異なる順序で切断する。C末端断片対要素用の発現カセットは作動可能に連結された構成要素として、転写方向に、(i)宿主細胞内で機能するプロモーター、(ii)ポリペプチド相互作用因子ドメイン、(iii)フレキシブルポリペプチドリナーおよび(iv)直接選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質のC末端断片、をそれぞれコードするヌクレオチド配列を含むことになる。N末端断片対要素用の発現カセットは作動可能に連結された構成要素として、転写方向に、(i)宿主細胞内で機能するプロモーター、(ii)ポリペプチド相互作用因子ドメイン、(iii)フレキシブルポリペプチドリナーおよび(iv)直接選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質のN末端断片、をそれぞれコードするヌクレオチド配列を含むことになる。本発明はまた、前述の発現カセットの配列をもつプラスミド入れた宿主細胞に関連する。

【0014】

本発明の実施に適した宿主細胞には、真核細胞(哺乳類、酵母および植物細胞など)と原核細胞(細菌細胞など)の両方が含まれる。本発明の融合オリゴペプチドを発現させるには種々の原核生物発現系を使用することができる。転写調節用のプロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結因子を収めた発現ベクターの構築が可能である。この目的のために適したE.coliの調節領域の例は、Yano

fsky (1984) J. Bacteriol., 158:1018-1024が記述しているようなE. coliトリプトファン生合成経路のプロモーターおよびオペレーター領域、それにHerskowitz and Hagen (1980) Ann. Rev. Genet., 14:399-445が記述しているようなファージ (P) の左方プロモーターなどである。細菌宿主内での外来遺伝子の発現に使用されるベクターは一般に、宿主細胞内で機能するプロモーターに対応する配列を含むであろう。細菌の形質転換に有効なプラスミドはpBR322 (Bolivar et al. (1977) Gene 2:95-113)、pUC (Messing (1983) Meth. Enzymol. 101:20-77; Vieira and Messing (1982) Gene 19:259-268)、pCQV2 (Queen, ibid.)およびそれらの派生体などである。プラスミドはウィルスと細菌の両要素を収めることができる。生物活性形態のタンパク質を回収する方法はU.S. Patent Nos. 4,966,963および4,999,422に記載されており、これらの文献は参照指示により本書に組み込まれる。他の原核生物発現系の詳細はSambrook et al. (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)を参照。

【0015】

真核生物での発現の場合には、本発明の実施に使用される宿主細胞は哺乳類、鳥類、植物、昆虫および菌類などの細胞である。たとえば植物の場合、プロモーターの選択は一つには、構成的発現または誘導的発現のどちらが望ましいか、また植物発育の特定段階および/または特定組織での発現が望ましいかどうかによって左右される。発現は特定の調節配列、たとえばUSPN 5,463,174; 4,943,674; 5,106,739; 5,175,095; 5,420,034; 5,188,958および5,589,379に記載されている調節配列を用いて、宿主植物内の特定の場所、たとえば種子、葉、果実、花および根などを標的にすることができる。

【0016】

宿主細胞が酵母細胞である場合には、酵母細胞内で機能しうるような、特に宿主種由来の転写および翻訳領域が準備される。転写開始調節領域は、たとえばアルコール脱水素酵素、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GDP)、ホスホグルコイソメラーゼなどのような解糖経路内の遺伝子または酸ホスファターゼ、ラクターゼ、メタルチオネイン、グルコアミラーゼなどのような調節可能遺伝子が

ら得られる。多数の調節配列のうち任意のものを特定の状況化で、構成的発現と誘導的発現のいずれが望ましいか、関心の的になる読み取り枠との関連で見た特定のプロモーター効率、強いプロモーターを誘導転写を許容する別のプロモーターに由来する制御領域と結合させる能力、構築のしやすさなどに応じて使用することができる。特に重要なのはガラクトースの存在下で活性化されるプロモーターである。ガラクトース誘導プロモーター(GAL1、GAL7およびGAL10)は酵母中での高レベルのタンパク質の調節発現に広く利用されてきた(Lue et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:3446; Johnston (1987) *Microbiol. Rev.* 51: 458)。

【0017】

本発明はまた、断片対ライブラリーの獲得を目的に溶媒暴露ループ内または三次または二次構造解析によって定義されるフレキシブルループ内に切断点末端をもつきわめて多数の断片対要素を作製することにより、目的マーカートンパク質の機能的断片対を検出する効率的な方法を提供する。断片対要素をきわめて多数の宿主細胞内で発現させ、マーカートンパク質に付随する直接検出可能シグナルを示す宿主細胞を、マーカートンパク質を機能的に再構成する断片対要素を含むものとして単離する。次いで、断片対要素をコードする発現カセットを収めたプラスミドを配列解析にかけて機能的断片対を検出する。マーカートンパク質の機能的断片対の検出を容易にするには、断片対要素を、ロイシンジッパー相互作用を通じて会合するfosおよびjun転写因子などのような互いに結合し合うことがわかっている相互作用因子ドメインをもつ融合タンパク質として発現させることができる。この目的のためには、fosおよびjun転写因子の異種二量体化ヘリックスをコードする配列が有効な相互作用因子ドメインとして十分に使用できる。

【0018】

本発明のシステムおよび方法は特に、免疫グロブリン分子によって認識されるエピトープ、膜貫通タンパク質の細胞外ドメインに結合するポリペプチド配列、リン酸化調節シグナル伝達タンパク質の阻害物質、および2つの異なるプロテオームのオリゴペプチド間の相互作用の検出に使用できる。エピトープの検出では断片ドメインと相互作用因子ドメインからなる第1および第2融合オリゴペプチドを宿主細胞内で発現させるが、その場合、第1融合オリゴペプチドの相互作用因

子ドメインはチオレドキシタンパク質の活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドから成り、また第2融合オリゴペプチドの相互作用因子ドメインは一本鎖可変領域(scFv)または抗体L鎖可変領域(VL)から成る。膜貫通タンパク質の細胞外ドメインと相互作用するポリペプチド配列の検出でも同様の戦略が用いられるが、その場合、第1相互作用因子ドメインはチオレドキシタンパク質の活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドから成り、また第2融合オリゴペプチドの相互作用因子ドメインは膜貫通タンパク質から成る。リン酸化調節シグナル伝達タンパク質の阻害物質の特定は、Her-2/neuなどのようなリン酸化調節シグナル伝達タンパク質から成る第1相互作用因子ドメインをもつ第1融合オリゴペプチド、および非リン酸化シグナル伝達タンパク質とだけ結合するscFvまたはLVから成る第2相互作用因子ドメインをもつ第2融合オリゴペプチドの発現を必要とする。阻害化合物はラクタマーゼ色原基質の存在下で色を変える宿主細胞から検出する。2つの異なるプロテオームの要素間のポリペプチド-ポリペプチド相互作用の検出またはモニタリングでは、第1および第2細胞性発現ライブラリーの要素はそれぞれ、融合オリゴペプチドの第1および第2相互作用因子ドメインを含む。この発現ライブラリーは好ましくはcDNAライブラリーであるが、ランダム生成ポリペプチドのスクリーニングを目的に合成ヌクレオチドから構築してもよい。本発明向けの特定用途ライブラリーは目的プロテオームの全タンパク質要素を示すのがよい。ヌクレオチド配列に由来するライブラリーでは、目的とする全タンパク質集合(すなわちプロテオーム)の全要素が原核または真核細胞などのような宿主細胞から、またはウィルス宿主からも、単離されよう。腫瘍遺伝子をコードするウィルス宿主は特に興味深い。哺乳類の腫瘍細胞、免疫細胞および内皮細胞もまた本発明にとって特に興味深いプロテオームを提供する。

【0019】

本発明はまた、宿主細胞への多重遺伝形質の導入の単一マーカーによる検出にも応用できる。この場合、機能的に再組み立てされたマーカータンパク質の検出可能な発現が個別形質をコードする多重遺伝子の宿主内同時発現のしるしとなる。最後に、本発明は宿主内の標的器官の近傍において誘導プロドラッグを特異的に活性化させるための方法に治療上の効用をもたらすが、その場合、マーカータ

ンパク質断片対の各要素は、標的タンパク質上の隣接(ただし非重複)エピトープを認識する個別免疫グロブリン分子との融合タンパク質として発現する。標的タンパク質に対する両抗体の結合はマーカータンパク質の機能的再構成を可能にし、再構成されたマーカータンパク質は後に投与されるプロドラッグを標的器官の近傍でだけ活性化する。

【0020】

本発明の代表例は抗生物質耐性酵素のTEM-1 ラクタマーゼであるが、抗生物質耐性をもたらす他酵素、たとえばアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ類、特にネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、およびBackman and Boyer (Gene (1983) 26:197)が記述しているテトラサイクリン耐性タンパク質などの断片対もまた本発明に包摂される。色の変化または蛍光放出などのような明確な表現型の変化を直接誘発することができる他のタンパク質もまた本発明に適用可能である。そうしたタンパク質の例は ガラクトシダーゼやグリーン蛍光タンパク質(GFP)、または他の関連蛍光タンパク質などである。

【0021】

E. coliのTEM-1 ラクタマーゼはプラスミドpBR322 (Sutcliffe, 1978, supra)のアンピシリン耐性遺伝子の264アミノ酸産物であり、そのヌクレオチド配列およびコード化アミノ酸配列は図2に示すとおりである。TEM-1は同属クラスA ラクタマーゼ類、すなわちペニシリナーゼ類の典型的なメンバーである。その三次元構造は図3に示すとおりである(Jelsch et al., Proteins Struct Funct (1993) 16: 364ff)。クラスA ラクタマーゼは2ドメインから成る。1つのドメインはN末端およびC末端配列から成り、ストランド5本の平板シートに対してパッケージされた逆平行2ヘリックスバンドルを形成する。シートの内面は他ドメイン(μ)、すなわち2本の延長ループと2つの小構造を備えた7ヘリックスバンドルにパッケージされている。シートの外側ストランドは触媒求核試薬Ser70の反対の位置にある基質結合ポケットに隣接し、また基質結合残基に寄与している。活性部位残基の残りはSer70を含めて、 μ ドメインの寄与を受けている。これら2ドメインは2本のループ、すなわちR61-R65とD214-W229で結合されている。

【0022】

本発明はまた、直接検出可能シグナルをもたらす親タンパク質中の最適切断点を検出する方法を提供する。両断片の切断点末端がAP-1転写因子のc-fosおよびc-junサブユニットに由来する異種二量体化ヘリックスへと遺伝子的に融合されたときに限って相補して活性を示すことができる断片対を検出するために、TEM-1

ラクタマーゼの「断片スペース」の調査が行われた(Karin et al., Curr Opin Cell Biol (1997) 9: 240)。調査のために、この酵素の可能なN末端およびC末端断片を網羅する一連のライブラリーが、完全コード化配列の両末端からの漸進的ヌクレオチド鎖分解性消化によって生成された。アミノ酸数25未満の断片は有望でないと考えられた。これらのライブラリーを相性の良いベクターで構築したときは、断片配列を同じE. coli細胞内で同時発現させて、各細胞がN末端およびC末端断片の単一对を発現し、可能な対がごとごとく代表されるようにした。たとえば100 kDa酵素では可能なN末端およびC末端断片対は 10^6 に限られるため、大部分の酵素の断片スペースについて取り扱いやすい大きさのライブラリーで包括的な調査を行うことができよう。この方法により、E. coli TEM-1 ラクタマーゼの2つのヘリックスの間に(ヘリックス7と8の間のおよそThr195~Ala202の)露出ループが検出されたが、ここでは鎖を切断することにより、fosおよびjunヘリックスと融合した場合に限り相補して活性を示すことができる断片を作り出せる。Glu197とLeu198に隣接切断点末端をもつ代表的な断片は197(N末端断片)および198(C末端断片)と命名され、後に、切断点末端に融合された多様な異種ドメイン[たとえば一本鎖抗体FV断片(scFv)、抗体L鎖(LC)、活性部位に12量体ペプチドを挿入したチオレドキシン、およびB細胞活性化抗原CD40の細胞外ドメイン(CD40ED)など]間の相互作用に伴いE. coliペリプラズム中で選択可能活性を生み出すことが証明された。197と198の相補による活性化はまた、受容体などのような第3のポリペプチドをもつ異種ドメインの相互作用に依存させることもできる。目的E. coli TEM-1 ラクタマーゼの隣接切断点末端にはE197/L198に加えて、アミノ酸残基N52/S53、E63/E64、Q99/N100、P174/N175、K215/V216、A227/G228およびG253/K254の間のアミド結合による結合部などもある。結合後の断片対は不連続や重複があってもよいが、親タンパク質の全長の90%~110%を含むもの

とし、また実際の切断点は検出された機能的隣接切断点結合部からいずれの方向にも10アミノ酸残基以内とすることができよう。再構成された酵素の特異的活性は、天然ポリペプチド骨格の完全な状態を回復することになる切断点末端での相互作用依存性ジスルフィド形成によって野生型に近いレベルまで高めることができる。

【0023】

ラクタマーゼ 197および 198断片は細菌ペリプラズム内で選択活性を協調的に生み出す。それは両断片の切断点末端に融合した異種ドメイン間の特異的相互作用に厳密に依存するという形をとるが、細胞膜を通過して細胞外区画内へと分泌転位を起こし、したがって細胞外タンパク質間の相互作用を正確に検出することができる酵素系分子相互作用センサーの例に見られるものである。

【0024】

本発明の相互作用依存性酵素会合システムは、人間の疾病治療、診断および予知分野の様々な用途や製剤標的および製剤の発見・検証のためのハイスループットスクリーニングシステムに使用できる。

【0025】

一特定用途は不活性または低活性化合物の局所的な、制御された活性化に関連する。たとえば薬剤、発色団、蛍光団などのような多数の有用化合物は、ヒドロキシル基またはアミノ基などのような化合物上の必須成分をエステル、アミド、カルバミン酸塩、リン酸塩、グリコシドまたはグルクロニドなどのような酵素加水分解基質と接合させることによって不活性化することができる(Jungheim and Shepherd, Chem Rev (1994) 94:1553)。この種の接合体は次いでエステラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、アルカリホスファターゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、ラクタマーゼおよびペニシリンアミダーゼなどのような適当な加水分解酵素によって活性化することができる。特に用途が広いシステムでは、セファロsporin類を3'位置で多種多様な離脱基を介してニトロジェンマスタード、メトトレキサート、アントラサイクリンおよびビンカアルカロイドなどのような様々な抗がん剤と接合させてもよい(Svensson et al., J Med Chem (1998) 41:1507; Vrudhula et al., J Med Chem (1995) 38:1380; Jungheim and Shephe

rd,1994, supra; Alexander et al., Tetrahedron Lett (1991) 32:3269; 図5も参照)。これらはみな広域ラクタマーゼ類の優れた基質であり、また大部分がその親ドラッグよりもずっと低活性である。したがって、これらのプロドラッグは抗体指定酵素プロドラッグ療法(ADEPT; Bagshawe, Drug Devel Res (1995) 34:220)への使用が見込まれる有力候補である。これらの化合物に加えて、広範囲の抗生物質(Holbrook and Lowy, Cancer Invest (1998) 16:405)や多様な色原基質、蛍光原基質もラクタマーゼ用に開発され(Jones et al., J Clin Microbiol (1982) 15:677; Jones et al., J Clin Microbiol (1982) 15:954; Zlokarnik et al., Science (1998) 279:84)、最も用途の広い既知酵素群に加えられるに至っている。

【0026】

それにもかかわらず、この種の酵素はその触媒活性を選り抜きのリガンドとのアロステリック相互作用によって積極的に調節しうるように加工できるとすれば、効用が飛躍的に増すであろう。そうすると、これらの酵素の触媒作用は様々な新用途に利用できるようになる。たとえば、(1)生物試料または食品中の微量分析物および病原体の迅速な超高感度検出、(2)人体の特定部位に的を絞った診断治療試薬の活性化、(3)自律折りたたみドメイン(AFD)用の発現配列ライブラリーの迅速な充実、(4)細胞、組織および病原体のプロテオーム内および間の、対単位のタンパク質-タンパク質相互作用の大規模パラレルマッピング、(5)全プロテオームに対応する抗体断片または他の結合タンパク質の迅速な選択、(6)抗細胞および抗組織抗体に対応する抗原の迅速な検出、(7)抗体に対応するエピトープの迅速な検出、(8)任意のタンパク質-タンパク質相互作用の阻害物質のハイスループットスクリーニングなどである。

【0027】

たとえば、色原基質を加水分解するために、標的分析物との結合時に限って活性化させることができる酵素は、これらの分析物に関する比類ない感度と便利さを備えた検定法の土台となりうる。その種の検定法は均質的であり、2成分すなわち酵素と基質を生物試料と混合する以外の操作をまったく必要とせず、分析物の存在は急速な発色によって定性的に示されることになる。現行の均質的酵素

検定法は、酵素表面に固定化された分析物またはその類似物に対する抗分析物抗体の結合による酵素の阻害に依存する(Coty et al., J Clin Immunoassay (1994) 17:144; Legendre et al., Nature Biotech (1999) 17:67)。遊離分析物の拮抗的抗体排除能、したがって酵素活性可能が評価される。この種の酵素はそれゆえ、アロステリックにではなく拮抗的に活性化される。この種の酵素を用いる検定法では最大シグナル増分はほぼ K_d の試薬濃度との平衡点で見られるため、一般に分析物分子のほんの一部がシグナル生成に参与するだけであり、また平衡に時間がかかるし平衡が完了しない場合さえある。しかし、分析物との直接的なアロステリック相互作用により活性化される酵素は過剰量を使用することができるため、平衡は迅速であり分析物濃度にも依存しないし、また分析物を飽和させてすべての分子からシグナルを生成させることもできる。細菌性またはウィルス性病原体の場合には、固有の表面マーカーが細胞または粒子当たり数百ないし数千の単位で存在するであろうが、マーカーとの結合によって活性化されることになるこの種の酵素では単一細胞または粒子でさえも迅速に検出できるようになるのに対して、そうした分析物を対象とする平衡検定法の感度は一般にずっと低いであろう。

【0028】

別種の用途では、相互作用活性化酵素を特異的細胞表面分子への結合によって活性化されるよう改作することができよう。これによって、酵素は体内の特定部位で局在化、活性化され、治療用または造影用試薬の標的指定活性化が実現されることになる。抗体指定酵素プロドラッグ療法(ADEPT; Bagshawe, 1995, *supra*)はがん治療のための有望な化学療法戦略であり、そこではプロドラッグ活性化酵素のラクタマーゼなどがそれと化学的または遺伝子工学的に接合させた腫瘍特異的抗体によって標的腫瘍に送り込まれる。未結合の接合体が循環系から排出された後に、アントラサイクリンセファロスポリンなどのような不活性プロドラッグが投与されるが、これは腫瘍部位で腫瘍に結合した残留酵素により腫瘍破壊性細胞毒素へと転化される。ADEPTの最大の問題は、全身細胞傷害性をできるだけ少なくするために、未結合の接合体が循環系から排出されてからプロドラッグを投与しなければならないという点にある。しかし、接合体が循環系から排出さ

れる頃には90%超の腫瘍結合酵素が失われてしまう(Bagshawe, 1995, supra; Springer and Niculescu-Duvaz, *Anti-Cancer Drug Design* (1995) 10:361)。それにもかかわらず、ADEPTは他のいかなる方法よりも腫瘍中の活性薬物濃度を高くすることができたし(Contributions to Oncology, Huber H and Queisser V, eds. pp. 208ff (Karger, Basel)所収のSedlacek et al., 1992)、臨床場面で将来性を示してきた(Bagshawe et al., *Dis Markers* (1991) 9:233; Springer and Niculescu-Duvaz, 1995, supra; Martin et al., *Cancer Chemother Pharmacol* (1997) 40:189)。未結合接合体の問題は腫瘍に結合した場合に限って活性化されるようなプロドラッグ活性化酵素により完全に予防しうるであろうから、プロドラッグは酵素と同時に、またはピーク腫瘍負荷時点で不活性のままの酵素にかまわず、投与することができるようになる。

【0029】

同様に、相互作用活性化酵素は炎症またはアテローム発生部位などのような他タイプの病変組織の、さらには健全組織の、細胞上の表面マーカーによって活性化の標的とすることもできる。次いでこの標的局在化・活性化酵素を用いて、細胞毒素だけでなく、生物反応修飾物質の低分子アゴニストまたはアンタゴニストなどのような他タイプの治療薬や目的の病変表現型等をもつ組織の精密定位のための造影用試薬をも活性化することができる。たとえば、標的活性化型酵素は(1)免疫促進剤を腫瘍に、(2)免疫抑制剤を慢性炎症部位または移植臓器に、(3)抗生物質を特定病原体に、(4)細胞毒素や抗ウイルス薬をウイルス感染細胞に、(5)ホルモンや他の多面作用剤を特定細胞/組織に、または(6)神経伝達物質や他の神経修飾物質を特定の神経または組織に、それぞれ送り込むために使用することができる。要するに相互作用活性化酵素を使用すれば、適当な基質との接合によって不活性化させうる任意の低分子細胞毒素、ホルモン、ステロイド、プロスタグランジン、神経伝達物質、またはペプチドホルモン、サイトカイン、ケモカインなどアゴニスト/アンタゴニストなどを任意の組織に送達することができる。

【0030】

さらに別種の用途では、相互作用活性化酵素を、発現配列ライブラリー、一本

鎖抗体断片(scFv)ライブラリー、および足場付きペプチドライブラリーを含めた、細胞内タンパク質間のきわめて多数の相互作用の効率的な同時検出が行えるよう改作することができる。たとえば酵素系相互作用トラップは、新しい薬剤標的の迅速な検出と検証を目的とした、ヒト細胞、組織および病原体のプロテオーム内および間の、対単位のタンパク質-タンパク質相互作用の総合的なマッピングを可能にしよう。これはまた、一本鎖抗体断片(scFv)ライブラリーからの、または足場付きペプチドライブラリーからの結合分子の迅速な選択を可能にし、そうした結合分子を機能的ゲノミクス研究における試薬として、または天然リガンドおよびエピトープの相同性による検出のために、使用できるようにしよう。相互作用依存性ラクタマーゼ類を使用して検出される標的相互作用はそのまま、これらの酵素の大きな基質多様性を利用して極性を逆転させることにより相互作用阻害物質のスクリーニングに使用することができよう。ラクタマーゼの相互作用依存性活性化はラクタム系抗生物質の存在下で宿主細胞に選択増殖性を付与するために使用できるが、ラクタム前駆抗生物質の存在下で宿主細胞に選択細胞傷害性を付与するためにも使用できる。後者の場合、基質は相互作用活性化酵素によるラクタム部分の加水分解があって初めて細胞傷害性を帯びるので、選択増殖性を宿主細胞に付与するその能力によって相互作用阻害物質を選択するのに役立てられる。

【0031】

最後に、酵素系相互作用センサーを使用してシグナル伝達経路における主要分子相互作用の活性化または阻害を迅速に検出することもできるが、それはこれらの経路の阻害物質または活性化物質のハイスループット細胞スクリーニングを可能にする。たとえば、レセプターチロシンキナーゼのアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするには通常、レセプター連結反応を、新規の遺伝子発現に由来する選択可能表現型に結びつける必要がある。そうした複数ステップのシグナル生成機構は酵母ツーハイブリッドシステムと同様に高頻度の偽陽性または偽陰性選択を招きやすく、したがってハイスループットスクリーニングにはあまり適さない。しかし、相互作用依存性ラクタマーゼ類をホスホチロシン感受性相互作用によって活性化されるように用意して、受容体連結反応のすぐ下流で

選択可能表現型が生成されるようにすることができる。受容体チロシンキナーゼ基質と結合ペプチドの間の相互作用はリン酸化に依存するかまたは阻害されるように設計して、受容体アゴニストかまたは受容体アンタゴニストが選択されるようにすることができる。

高性能酵素断片相補システムを作製するための一般戦略

本発明は、触媒として堅牢な複合体の形成を可能にする安定した酵素断片を得ることを目的とした異種相互作用因子、切断点ジスルフィド、ランダムトリペプチドライブラリーおよび突然変異誘発の一般的な使用戦略を提供する。任意の酵素についてその種の断片対を検出することは、問題の酵素に関する可能な断片対をことごとく調べるだけで可能なのではないかと示唆されたことがある(Ostermeier et al., Proc Natl Acad Sci (1999) 96:3562)。しかし実際には、そうした試みの成否は選択の厳密さに、すなわち効率的に選択可能な表現型を出現させるには発現断片によってどれだけ多くの機能的酵素を産生させなければならないかに、強く依存する。効率的に選択可能な表現型とは、バックグラウンド頻度または偽陽性率が断片ライブラリー中の所望断片の頻度よりもあまり高くないような表現型である。

【0032】

実際には、任意の酵素に対して最も有用な断片相補システムは、無支援型の相補を最ももたらしやすい野生型配列の断片であるとは必ずしも限らず、むしろ最も有用な断片相補システムは、前述のような遺伝子工学的手法を用いた場合に、より個別的な性能要件を満たすように作製することができる断片を含む。たとえば、天然型タンパク質は一般に断片安定性と複合体安定性の間にほぼ逆の相関関係を示すものと見込まれる。これは相互転換のエネルギーコストのためである。断片安定性が高ければ高いほど複合体の形成に要するエネルギーはますます多くなるし、その逆もまた真である。その結果、最高の比活性を生み出しうる断片は見逃されるか棄却されるというおそれがある。というのは、その種の断片は断片不安定性のために選択可能なレベルの活性を生み出すのを妨げられかねないからである。こうした落とし穴を回避するためには、断片対ライブラリーをランダムトリペプチドライブラリーと同時に発現させて、すべての断片対が断片安定化ト

リペプチドの存在下で機能する機会を与えられるようにし、もって断片安定性に対する表現型の依存を最小限に抑えるようにすることができる。この戦略は、断片対に融合された異種ドメインの相互作用に対する活性化の依存が望ましい場合には、特に有効である。構成的活性化が望ましい場合には、断片ライブラリーを誤りがちのPCRで増幅して、断片不安定性と複合体不安定性の両方を緩和しうることがラクタマーゼの例で判明している折りたたみ加速突然変異の導入を図ることができる。

【0033】

均質検定法、バイオセンサーおよび標的活性化試薬などのようなin vitro用途では断片安定性が特に重要であるが、断片安定性と複合体安定性の逆相関関係から予測されるように、最も安定した断片でも安定した複合体を支援なしに生み出せなければ選択不能かもしれない。そこで、切断点にジスルフィドを備え切断点末端に異種相互作用因子を融合させた断片ライブラリーをE. coliペリプラズム内に発現させることができよう。これらの手段は断片を結合させ、折りたたみを加速し、また活性複合体を安定させるための機構を提供する。ラクタマーゼで示したように、断片対の相当な部分はこの種の分子補欠によって細菌ペリプラズム内に堅牢な選択可能活性を生み出すように製作することができる。

【0034】

断片対の親タンパク質への機能的再構成を増進する手段として説明した以上の4手段、すなわち異種相互作用因子、切断点ジスルフィド、安定化トリペプチドおよび突然変異誘発はいずれも、単独でまた他は組み合わせて使用して、所望用途に最適の断片が確実に選択されるように、また所望用途用として選択された断片対の性能が改善され最適化されるようにすることができる。例示するように、各手段は異なる機構で性能を増進するので、複数手段の効果は一般に相加的である。異種相互作用因子は断片を引き合わせて活性複合体への再折りたたみを促す。切断点ジスルフィドは切断点でポリペプチド骨格の完全な状態を復旧させることにより活性折りたたみを安定化することができる。係留または遊離トリペプチドは断片の凝集を、活性複合体への折りたたみを妨害することなく防止する。突然変異誘発は活性複合体への折りたたみを加速することによって断片を保護する

ことができる。

【0035】

高性能酵素断片相補システム開発の第1ステップは、断片対ライブラリーに各断片を発現させるためのベクターの構築である。好都合な選択的断片ライブラリー発現系を図6に示す発現系から誘導することができる。目的とする用途とは無関係に、すべての断片対は、切断点末端に融合された fos および jun ヘリックスなどのような相互作用因子によってもたらされる結合機能から潜在的に利益をうることができるし、またそうした結合機能によって害されることはないであろう。こうしてC末端、または断片ライブラリーはファスミドベクター pA01 中の lac プロモーター(上流シストロンはもし望むなら除去できる)に由来する fos ヘリックス(図6の相互作用因子2)に対する (Gly₄Ser)₃ リンカーなどのようなフレキシブルポリペプチドリンカーを介したN末端融合体として発現しよう。フレキシブルポリペプチドリンカーのアミノ酸配列は重要ではないが、断片ドメインと異種相互作用因子ドメインが独立に、支障なく折りたたまれるよう十分な長さでフレキシビリティを備えていなければならない。N末端、または断片ライブラリーは相性が良い pAE1 ベクター中の trc プロモーターに由来する jun ヘリックス(図6の Interactor 1)に対する (Gly₄Ser)₃ リンカーなどのようなフレキシブルポリペプチドリンカーを介したC末端融合体として発現しよう。ペリプラズムへの転位が望ましい場合には、シグナルペプチドのコード配列を含めることになる。

【0036】

前述のように、目的の用途が *in vitro* か *in vivo* かによって、またそれが *in vivo* であれば細胞質内か被分泌かによって、目的の用途に合った最適の断片対が選択される確率を極大化するために発現ベクターに1以上の性能増進手段を組み込んでよい。ペリプラズム発現が望ましい場合には、ジスルフィド形成を許容するために切断点末端にシステインをコード化するのがよい。酵素が他のシステインを含む場合には、混合ジスルフィドの形成を阻害するために、1 mM以上5 mM未満の還元剤たとえばGSHまたはDTTを増殖培地を含めるのがよい。選択における特異活性の比重を高める意味で断片安定化が望ましい場合には、切断点末端とフレキシブルポリペプチドリンカーの間に各断片融合体をはさんだランダムまたはVR

Kトリペプチドライブラリーを枠内にコード化してもよい。50断片対のライブラリーの各断片にVRKライブラリーを使用する場合にはトリペプチド-断片の可能なすべての組み合わせが $< 10^8$ の併合ライブラリーに収まろう。あるいは前述の要領でトランス形の各断片対に単一トリペプチドライブラリーを使用することもできよう。トリペプチドライブラリーは枠内でフレキシブルポリペプチドリンカーを介してチオレドキシンのN末端に作動可能に融合し、pA01ファスミドベクターの上流シストロンから発現させることになる(図6参照)。

【0037】

高性能酵素断片相補システム開発の第2ステップは候補酵素断片対の発現ライブラリーの構築である。ランダム断片対のライブラリーを生成する方法はすでに記述されている(Ostermeier et al., 1999, supra)。しかし、大多数の断片対は機能しないであろうから、そうしたライブラリーはきわめて非効率的である。断片対ライブラリーの突然変異誘導またはランダムトリペプチドライブラリーとの組み合わせスクリーニングでは、もっとずっと効率的な断片対ライブラリーが必要であろう。様々な理由から、最も機能的な断片対は二次構造エレメント間の露出領域におけるポリペプチド鎖の切断に対応すると想定されよう。係留異種相互作用因子およびトリペプチドの使用には露出切断点が必要とされようし、また二次構造エレメント内の切断はそうしたエレメントを不可逆的に不安定化する可能性がある。目的酵素または同族体について三次元構造が得られる場合には、それを使用して露出ループを鎖切断の候補部位として識別することができる。代表的な球状タンパク質では、両端から十分遠い、したがってより大きな断片が独立には活性を帯びないような位置にあるそうした部位は20~25を超えないであろう。これは、各断片対のコード配列をPCRで構築するには取り扱いやすい数である。各切断点に対応する頭-頭プライマー対のほかに2つの末端特異的プライマーが必要とされようが、それは露出ループのほぼ中央に位置するのがよい。三次元構造が得られない場合は二次構造とヒドロパシーのコンピューター予測用の信頼性の高いアルゴリズム、たとえばRost and Sander (J Mol Biol (1993) 232:584; Proteins (1994) 19:55; Proteins (1994) 20:216) がインターネットで入手できる。そうしたプログラムにより、大部分の露出ループを二次構造エレメント間

の親水性領域として識別することができる。この場合もまた、50断片対までならPCRでコード配列を調製するのはそれほどの負担にはならないであろう。

【0038】

断片相補が、切断点末端に融合された異種相互作用因子ドメインの直接的なまたはリガンドを介した相互作用に依存する必要がある場合には、折りたたみ加速突然変異もまた断片コード配列の最初の増幅に誤りがちなPCRを使用して選択することができる。突然変異誘発は、 Mg^{++} 、 Mn^{++} およびヌクレオシド三リン酸の濃度、それにサイクル数の適当な条件下で、分子当たり1~3個の偏りのないコード変化に限定することができる(PCR Primer - A Laboratory Manual, C. Dieffenbach and G. Dveksler, eds., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 583-590所収の Cadwell and Joyce, 1995)。ほとんどの突然変異は非表現型変異なので、これは最適断片-トリペプチド組み合わせの選択適性を犠牲にすることなく、他の性能増進手段と楽に組み合わせることができる。断片コード配列の増幅、ゲル精製、およびベクターへの連結がすんだら、連結反応生成物を脱塩、濃縮して、高電圧エレクトロポレーションによるE. coli細胞の効率的な同時形質転換ができるようにする。トリペプチドライブラリーと突然変異誘発の両方を使用する場合には、少なくとも 10^8 個の、また好ましくは少なくとも 10^{10} 個の形質転換細胞を集めてライブラリーの多様性が確実に丸ごと総合的に代表されるようにする。次いでフルライブラリーを様々な非許容条件のそれぞれでプレートするが、最も低い厳密さ条件では宿主細胞をライブラリーサイズの逆数の10倍以下の効率でプレートする。これにより、偽陽性中の真陽性の頻度が確実に扱いやすいものとなろう。最高の選択の厳密さ条件は、それを超えるとライブラリーから何も回収されないような条件であろう。

【0039】

断片相補が切断点末端に融合された異種相互作用因子ドメインの直接的なまたはリガンドを介した相互作用に依存する場合には、突然変異誘発は使用しないほうがよい。というのは折りたたみの加速は通常、連結支援の必要を一掃するからである。この場合には、選択した断片対をカウンタースクリーニングにかけてfos-jun相互作用の存在下での活性の喪失を調べなければならないし、また活性化

指数を相互作用依存性活性の相互作用非依存性活性に対する比として求めなければならない。プロテームライブラリー内または間の相互作用マッピングでは、少なくともほぼ 10^6 程度の活性化指数が好ましい。というのは、まれな遺伝子はその程度の頻度を示すと見込まれるからである。リガンド特異的または相互作用特異的バイオセンサーでは、通常、もっと低い活性化指数が許容される。たとえば、それに対する断片-バインダー融合体親和性(K_d)が10 nMレンジであるリガンドのナノモル濃度を検出するには、断片-バインダー融合体を10 nM濃度で使用するだけでリガンドを飽和させることができる。これらの条件下では、~90%の断片対-バインダー融合体が未結合であろう。活性化指数が >100 であれば、バックグラウンドはシグナルの $<10\%$ であろう。

【0040】

選択された断片対は最大活性および/または最大活性化指数を示すように最適化することができる。われわれの経験では、切断点ジスルフィドが断片複合体中に最大量の本来構造を許容するため、最高の特異活性を生み出す。しかし、それらの活性はバックグラウンドにもあって、そのために活性化指数がしばしば低くなるかもしれない。切断点ジスルフィドの特異活性の利点を保持しながらバックグラウンドを低下させるには、ジスルフィド形成の速度を遅くして、無支援断片の折りたたみ未遂時には十分な時間を与えずに起こりにくくするが、折りたたみが異種相互作用因子相互作用で触媒されたときには効率的に起こるようにする必要があろう。切断点ジスルフィドの形成を制御するには次のように2つのパラメーターを調節することになる。 (1)ジスルフィド形成システインの切断点に対する近接性を調節してジスルフィド形成に対する配向性の厳密さを強める。 (2) 培地の還元剤濃度を高めて、ペリプラズム中の主ジスルフィド形成酸化酵素DsbAの有効濃度を低下させる。

【0041】

TEM-1 ラクタマーゼを使用して、安定した複合体を形成する能力に関する選択可能な表現型をE. coli中で生み出さない他タンパク質の断片対を選択することが可能である。というのは、そうした複合体は通常、天然のコンホメーションをとるであろうし、また機能的に活性であるはずだからである。天然に生じるタ

ンパク質はそこにおいて安定かつ活性であるような独特の最小エネルギーコンホメーションもつことはすでに十分に立証されている(Li et al., Science (1996) 273:666)。それ例外のコンホメーションはすべて不安定である。ゆえに、非表現型タンパク質の断片対が相互作用依存性TEM-1 ラクタマーゼ断片に対する融合体として発現する場合には、会合し天然コンホメーションへと折りたたまれる断片対だけが選択可能な ラクタマーゼ活性化を助長する十分な連結機能を発揮するものと期待される。この場合、従属断片は ラクタマーゼ断片の相補を助長するという異種相互作用因子の目的に奉仕する。しかし、断片/異種相互作用因子融合体配列には ラクタマーゼ断片の機能的再会合を強化するため追加の変更を、たとえば切断点ジスルフィド、3~12個のアミノ酸から成るランダムコード化ペプチド、および断片ドメイン内のアミノ酸数個の突然変異誘発などをコード化することができよう。これらの手段はすべて、断片の安定化、折りたたみの加速、および/または活性断片複合体の安定化などにより従属断片の相補にだけ特異的に影響を及ぼすであろう。選択された断片対は次いで、酵素活性の再生または親タンパク質の他機能を個別に試験することができる。こうして、真核細胞中で活性をもつタンパク質、たとえばキナーゼまたは除草剤耐性タンパク質などに関して多数の有用な断片相補システムを開発することができよう。

【0042】

本発明の相互作用活性化酵素会合システムは、原核生物の ラクタマーゼで例証されているように、以下に要約するような多数の用途に使用できる。

【0043】

(1) 単一および多重タンパク質-タンパク質相互作用マッピング。単一とは発現配列ライブラリーから天然相互作用因子を釣り上げることを目的とした単一餌タンパク質の使用をいう。多重とは可能な限り多数の天然型相互作用を同時に単離することを目的とした2つの発現配列ライブラリーの組み合わせ対単位相互作用をいう。個別相互作用因子は核酸ハイブリダイゼーションにより容易に検出できる。

【0044】

(2) 相互作用依存性 ラクタマーゼシステムはまた、自律折りたたみドメイ

ン(AFD)をコードする断片のランダムプライミング発現配列ライブラリーでの濃縮に使用できる。融合パートナーによる折りたたみの妨害は、発現ライブラリーのN末端とC末端だけにエピトープタグと異種二量体化ヘリックスをそれぞれ使用することにより防止される。前記断片はN末端およびC末端抗タグ・バインダー、およびパートナー異種二量体化ヘリックスを備えることになる。ジスルフィドスイッチは多様な相互作用ジオメトリーに対応できる。

【0045】

(3) 一本鎖抗体断片(scFv)や抗体L鎖可変領域(VL)などのような結合分子の単一および多重選択。非免疫ヒトscFvレパートリーライブラリーをTEM-1 ラクタマーゼ相互作用依存性活性化システムと併用すれば、scFvを単一餌用に、または同時に発現配列ライブラリー用に、単離することができる。後者の場合、個別標的に特異的なscFvを核酸ハイブリダイゼーションによって容易に検出できる。

【0046】

(4) ミモトープ相同性によるインタフェースマッピングおよびリガンド検出。担体または「足場」タンパク質の表面にディスプレイされた拘束ペプチドライブラリーをラクタマーゼ相互作用依存性活性化システムと併用すれば、目的タンパク質またはAFD用に代理リガンドを単離することができる。次に、任意のポリペプチドに対応するそうした代理リガンド群に由来するコンセンサス配列を使用して、そのポリペプチドの天然リガンドを、またはそのポリペプチドの天然リガンド上の相互作用表面を、検出することができよう。インタフェースマッピングの一般的な用途は抗体用のエピトープマッピングであり、抗体が結合するその抗原表面上の特異的領域がそれによって同定される。

【0047】

(5) 対生物作用センサー。シグナル伝達アゴニストおよびアンタゴニスト用の大部分のスクリーニングシステムの効率は、受容体への連結と普通は新規遺伝子発現を必要とする選択可能表現型の生成との間に多数のステップを介在させる必要性によって犠牲にされる。相互作用活性化ラクタマーゼは、標的シグナル伝達経路の任意の構成要素による活性化または阻害に合わせてあつらえることにより、選択可能な表現型を生成させるために遺伝子の発現を待つ必要もなく任意

の適当な細胞型の経路のアゴニストまたはアンタゴニストの選択を可能にする。

【0048】

(6) 均質検定。標的分子上に非重複エピトープを結合させる2個のscFvまたは他の結合分子に相互作用依存性相補断片を融合させることにより、ラクタマーゼの活性化が標的リガンドへの結合に依存するよう仕向けることができる。タンパク質から病原体に至るまでの2-エピトープ分析物を対象とする均質検定へのリガンド依存性ラクタマーゼの使用は無類の感度をもたらす。これはほとんどの検定法で要求される平衡速度論の代わりに飽和速度論が使用できるためである。結合分子は、標的病原体のゲノムに見られる隣接配列へとアニールするようなオリゴヌクレオチドでもよい。こうした配列活性化ラクタマーゼは個別PCR産物のゲル電気泳動によらない迅速な定量化にも使用できる。

【0049】

(7) 標的活性化酵素プロドラッグ療法(TAcEPT)および標的活性化酵素造影(TAcEI)。抗体指定酵素プロドラッグ療法は、患者を腫瘍標的化抗体に接合させたラクタマーゼなどのようなプロドラッグ活性化酵素で治療する有望な化学療法戦略である(Bagshawe, 1995, supra)。未結合の抗体-酵素接合体が循環系から排出されたら腫瘍部位で優先的に活性化されるプロドラッグを投与することができる。この療法の有効性は、過度の傷害性を回避するために未結合接合体が循環系から排出されてからプロドラッグを投与する必要があるが、その間に大部分の結合済み酵素は腫瘍から失われてしまうという事情により、厳しく制限される。腫瘍活性化ラクタマーゼを使用すれば、酵素のピーク腫瘍負荷時にプロドラッグを投与することができる。これは、酵素が循環系内では不活性であり、腫瘍と結合したときにだけプロドラッグを活性化しうるからである。同じ戦略は腫瘍または他の病変組織造影用の、または炎症や移植拒絶反応などのような治療指標用の試薬の抗体指定型、部位特異的活性化にも使用できる。

【0050】

以下の実施例は本発明の限定ではなく説明のために示す。

実験

実施例1

197と 198の相互作用依存性相補による ラクタマーゼ活性化:

scFvと trxpepの相互作用

この実施例では、一本鎖抗体Fv断片(scFv)とE. coliチオレドキシンの活性部位に挿入されたアミノ酸数12のペプチド(trxpep; Colas et al., Nature (1996) 380:548)との特異的相互作用を検出し識別するシステムの能力を明示する。scFvは抗体H鎖およびL鎖可変領域(VHおよびVL)を含み、両者は最も一般的には(Gly₄Ser)₃リンカーにより連続ポリペプチド中に係留されており、このリンカーは最も一般的にはVHのC末端とVLのN末端の間にコード化されている。

【0051】

ヒト非免疫抗体レパートリーに由来するscFvをコンセンサプライマーミックス使用のPCRで増幅し(Marks et al., Eur J Immunol (1991) 21:985)、pUC119系ファスミドベクター(pA01; 図6A参照)にサブクローニングし(Sambrook et al., supra)、介在(Gly₄Ser)₃リンカーを介した 198断片N末端への融合体としてscFvを発現させるようにした。N末端シグナルペプチドを用意して、細菌ペリプラズムへの転位を図るようにした。市販のtrxpepライブラリーを入手し、E. coliチオレドキシンのNおよびC末端に対し特異的なプライマーを使用してPCR増幅した(Genbank登録no. M54881)。p15Aレプリコン(Rose, Nuc Acids Res (1988) 16:355)にこの産物をサブクローニングし、trp-lac融合プロモーターから 197断片C末端への融合体として発現させるようにした(pAE1; 図6B参照)。この場合もまた、N末端シグナルペプチドを用意して、ペリプラズムへの転位を図るようにした。図7は、scFvとtrxpepの相互作用に依存した 197と 198の相補によるTEM-1の活性化を示している。

【0052】

浸透圧衝撃(Neu and Heppel, J Biol Chem (1965) 240:3685)によって得られたペリプラズム抽出物の免疫プロット解析(Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor所収のHarlow and Lane (1988))では、元のscFvライブラリークローンの約20%が可溶性の完全長scFvを生み出すと推定された。そこで、機能的scFvを発現する12クローンを得るには約60クローンをスクリーニングしなければならなかった。scFv- 198構築体の

これら12クローンを代表するプラスミドDNAを 197-trxpep構築体の約 5×10^6 クローンを代表するDNAと、E. coli株のDH5 およびTG1に同時導入し(Sambrook et al., 1989, supra)、カナマイシンとクロラムフェニコールを含む固形LB培地上にプレートして同時形質転換体の総数を求めた。分取量を25 μ g/mlアンピシリン(amp25)上にもプレートした。合計約 1×10^7 個の同時形質転換体から40個のアンピシリン耐性クローンを回収し、うち36クローンをamp25上に再プレートした。単一無作為抽出 197-trxpep構築体の、20個のscFv- 198構築体とのほぼ同数の同時形質転換体はamp25上ではコロニーをまったく作らなかった。12個のscFvはすべて36個のアンピシリン耐性クローンに包摂され、それぞれ1~5種のtrxpepをもっていた。12個のscFvはいずれも、もともと別のscFvによって選択されたどのtrxpepとも交差反応しなかった。これは、各scFv- 198構築体を別のscFvによって選択された 197-trxpep群と同時形質転換させることによって判定した。したがって、36個の選択クローンはみな真陽性であり、独特の特異的scFv-trxpep相互作用を示した。いかなるscFvもそのペプチドモチーフの存在下でチオレドキシシンと結合しなかったし、また選択されたいかなるtrxpepもscFv上の共通決定基と結合しなかった。選択はE. coli宿主株TG1中でlacプロモーターの無償性抑制解除物質すなわちイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)を用いずに、転写が最小限になるようにして行った。1 mM IPTGの存在によって転写が強められると、さらに多数のコロニーが得られた。そのうちのいくつかは、真正の相互作用であることが証明されたが、弱すぎて低発現レベルでは選択可能なアンピシリン耐性を与えることができなかった。したがって、相互作用因子の発現レベルを調節することにより選択の厳密さを調整することができる。

【0053】

これらの結果はいくつかの重要な意味をもつ。第1に、偽陽性率が非常に低くなり、酵母ツーハイブリッドシステムなどのような他の細胞内相互作用センサーの場合の報告値を大幅に下回った(Bartel et al., 1993, supra; Bartel et al., 1996, supra)。この特性はハイスループット用途ではきわめて重要である。第2に、すべての機能的scFvに対応するtrxpepが回収されるため、scFvに関する偽陰性率が非常に低くなった。これもまたハイスループット用途ではきわめて重要

である。すべてのscFvでミモトープが回収されるという事実は、このシステムをscFvのハイスループット多重エピトープマッピングに使用することを可能にする。最後に、このシステムは多様な2タンパク質集合間の多様な相互作用物質の同時的、効率的回収を可能にする。結局、このシステムの高効率、すなわち低偽陽性率と低偽陰性率からすれば、システムの処理能力を制限するものは相互作用ライブラリーのサイズおよび/または手際よく扱える同時形質転換体の数だけであろう。たとえばscFv、trxpepまたはcDNAでは $10^9 \sim 10^{10}$ 単位の組み換えタンパク質ライブラリーの構築がごく普通に可能である(Hoogenboom et al., Immunotech (1998) 4:1)。任意の2つのこうしたライブラリーを対象にした組み合わせ対単位相互作用トラッピングには少なくとも $10^{18} \sim 10^{20}$ クローンが必要となるが、定量的ファスミド感染法(Sambrook et al., 1989, supra)や自動発酵プレーティング法を用いれば、この程度の処理能力は現実的に実現可能であろう。

実施例2

197と 198の相互作用依存性相補による ラクタマーゼ活性化:

抗体L鎖V領域(VL)とtrxpepの相互作用

この実施例では、VLプラス第1H鎖定常領域を含むFd断片にジスルフィド結合された完全長L鎖から成るFabなどのような、より大きな抗体断片にも対応しうるこのシステムの能力を例示する。ヒト・レパートリーライブラリーに由来するFabのサブセットをpA01ベクターにサブクローニングしlacプロモーター由来のジシストロン転写産物からC末端 198融合体として発現させるようにした(図6A参照)。第1シストロンはペリプラズムへの転位のためのシグナルペプチドをもつL鎖をコードしていた。L鎖終止コドンには短いスペーサー配列が、次いでFd断片のシグナルペプチドに対応する翻訳開始点から約10 bp上流のリボソーム結合部位が続く、さらに次いで介在(Gly₄Ser)₃リンカーをもつ 198が続いた。次にE. coli株DH5 およびTG1を用いてこの構築体をpAE1ベクター内の 197-trxpepライブラリーと同時発現させた。L鎖とペリプラズム内のFd- 198融合タンパク質との自然会合が機能的Fab断片を生成させるものと期待された。次いで、これが 197-trxpep融合体上のペプチドと結合することにより、宿主細胞に選択可能なアンピシリン耐性を付与するに足る量の機能的TEM-1 ラクタマーゼの組み立てを助長

するものと期待された。

【0054】

事実、多数のクローンが25 µg/mlアンピシリン上で回収された。そのうちの一部を表1に掲げる。いくつかは最高100 µg/mlで耐性を示したし、1つは最高600 µg/mlで耐性を示した。意外にも回収されたFabはどれもVH領域を欠失していた。つまり、第1H鎖定常領域(CH1)だけが付いた完全長L鎖(LC)を含んでいた。その理由は次のとおりであった。元のFabライブラリーは次のような方法で構築された。まず、発現の準備が整った状態の定常領域をすでに収めたベクターにVLレパートリーを挿入した。この中間構築体はL鎖と 198に融合させた第1H鎖との複合体を発現させることができた。次にこのL鎖ライブラリーからプラスミドDNAを精製し、VHレパートリー挿入の受容DNAとして使用し、Fabライブラリーを完成させた。得られたライブラリーは、中間ベクターを含む約15%のクローンで汚染されていた。これらのLC-CH1複合体だけが、VL結合部位を適当なtrxpep上のペプチドと結合させることにより 197- 198相補を促進することができた。完全長Fabが選択されなかった理由は不明であるが、Fab-trxpep複合体(~67 kDa)のより大きなサイズと剛直性が断片相補を立体的に阻害する一方で、LC-CH1のより小さなサイズと柔軟性はそのような働きをしなかったという可能性がある。

表1

選択複合対の抗体LC-CH1複合体とtrxpepの相互作用により
促進されたTEM-1 ラクタマーゼ 197 / 198断片相補の
アンピシリン耐性効果

【0055】

【表1】

<u>LC-CH1</u>	<u>Trxpep</u>	<u>Amp^r</u>
P44-2-2B1	P44-2-2A1	+++++
P44-2-3B1	P44-2-3A1	++
P44-1-6B1	P44-2-6A1	+
P64-17B1	P64-17A1	++
P65-1-10B1	P65-1-10A1	+++
P66-3-2B1	P66-3-2A1	++
P66-3-10B1	P66-3-10A1	+
P66-3-14B1	P66-3-14A1	++
P75-7-7	?	≥+
P75-7-13	?	≥+
P75-7-30	?	≥+

【0056】

^a +, ++, +++, +++++は25、50、100、600 μg/mlアンピシリン上での>10%プレートのティング効率

以上の結果は、サイズが~12 kDaにすぎないL鎖V領域だけが、断片相補によるラクタマーゼの抗原依存性活性化に好都合なハイアフィニティー結合分子を作りうることを示している。これを検定するために、いくつかの被選択LC-CH1に由来するVLをサブクローニングして198に対するC末端融合体としてだけ発現させるようにした。各VLをそのパートナーの197-trxpepと同時発現させると、約3分の1のVLが親LC-CH1並みの選択可能なアンピシリン耐性を付与した。

実施例3

197と198の相互作用依存性相補によるラクタマーゼ活性化:

CD40とtrxpepの相互作用

この実施例では、目的とする任意のタンパク質に結合し、またタンパク質上の相互作用表面のマッピングに使用しうるうえに相同性による新リガンドの同定にも役立つようなtrxpep群を単離するこのシステムの能力を例示する。ヒトB細胞活性化抗原CD40の細胞外ドメインはE. coliペリプラズム内で確実に発現することが知られている(Noelle et al., Immunol Today (1992) 13:431; Bajorat

h and Aruffo, Proteins: Struct, Funct, Genet (1997) 27:59)。T細胞表面分子のCD40リガンド(CD40L)はCD40へと連結することによりB細胞のコアクチベーターとして機能することが知られているが、他のリガンドも存在するかもしれない。そこで、TEM-1 197/ 198断片相補を利用して一群のCD40結合trxpepを選択し、次いでこれらのペプチドの配列について既知リガンドや他の潜在的リガンドとの相同性を調べることにした。成熟型細胞外ドメイン(CD40ED)のコード配列を、この成熟タンパク質のN末端および~190残基細胞外ドメインのC末端と相同のプライマーを使用するPCRによって増幅した(Genbank登録no.X60592)。次いでpA01ファスミドベクターにPCR産物をサブクローニングし(図6A参照)、介在(Gly₄Ser)₃リンカーを介したTEM-1 198断片との融合体としてlacプロモーターから発現させるようにした。正しい産物の発現をPAGEで確認し、次いでCD40融合ベクターをファージとして再利用し、前述と同じtrxpepライブラリー構築体を入れたTG1細胞に導入した。カナマイシン上とクロラムフェニコール上の二重選択により約10⁷個の同時形質転換体が収集されたので、それを次に25 µg/mlアンピシリン上にプレートした。図8は 197と 198のtrxpep- CD40相互作用依存性相補によるTEM-1の活性化の模式図である。

【0057】

13個の固有のtrxpepをコードするアンピシリン耐性クローンが回収された。いずれの場合にも、amp耐性はCD40EDとtrxpepのペプチド部分の存在に厳密に依存した。CD40EDを無関係のタンパク質と置き換えると、またはtrxpepを野生型チオレドキシニンに置き換えると、活性は見られなかった。選択されたCD40結合タンパク質の配列を表2に、それらの相互間の、およびCD40Lとの相同性を含めて示す。13個のペプチドは8つの相同群にまとめられる。すなわち、各3ペプチドから成る2群、2ペプチドから成る1群、それに各1ペプチドから成る5群である。群1および2はCD40Lの同じ領域に対する各群3個のペプチドの相同性によって規定される。群1はCD40のPro217からGly234間での領域と相同的であり、群2はGly158からLeu168までの領域と相同的である。群3はペプチド間相同性だけによって規定され、CD40との検出可能な相同性はもたない。群4はCD40のSer110からPro120間での領域と相同的であり群5はPro244からGly257間での領域と相同的である。群6~8は識

別可能な相同性をもたない。しかし、多数のペプチドが他のヒト細胞外タンパク質、たとえばCTLA-2A、マトリックスメタロプロテナーゼ、受容体Tyrホスファターゼ、血管内皮細胞増殖阻害物質(VEGF)、トランスフェリン受容体、CD3、および骨形成タンパク質3B (BMP-3B)などとの顕著な相同性をもっている。これらは、細胞外タンパク質-タンパク質相互作用のためにすでに繰り返し使用されてきた単数または複数の相互作用モチーフを規定しているかもしれない。また、CD40上の多重相互作用部位を示してもいるかもしれない。

【0058】

選択された5つのCD40結合trxpepのそれぞれをpA01ファスミドベクター内の第2シストロンから、CD40-198複合体の下流に発現させることにより、trxpep間競合を試験した。次に、TG1株を使用して、これらの構築体のそれぞれを、同じ5つの構築体、プラス追加の3つの被選択197-trxpep融合構築体のそれぞれと同時発現させ、25 µg/mlアンピシリン上での増殖を評価した。その結果を表3に示す。8つのtrxpepは5群に分類された。BW10-1は群2および3と中程度に競合する。p56-12-9A1、BW10-4およびBW10-8は互いに強く競合し、競合ぶりも類似している。それらは、群3およびBW10-9と若干競合するBW10-8を別にすれば群3とは競合しない。それらの3つはみなBW10-1と競合するし、またp58-12-9A1もBW10-9と若干競合する。p44-4-2A1とp45-7-2A3は強く競合するし、競合ぶりも似ている。それらはBW10-1と競合するが、他とはBW10-8と若干競合する以外、まったく競合しない。BW10-9はBW10-8およびp58-12-9A1と若干競合する。p65-2-9A1は何ものにも阻害されない。

【0059】

【表2】

表2
代表的なCD40-結合Trxpepの相同性

グループ	TrxPen	配列 ^a	Amp ^b
1	BW10-1	<u>CGPKELRIGGRRRPGPC</u>	+
	P58-12-9A1	CGPEGQGGVAVGGVGGPC	+
	P65-2-4A2	CGPAKRAADV <u>EFSE</u> LEPG	+
2	CD40L	215-AKPCGQOSIHLGGVFELQPGA-235	
	BW10-9	CGPKSAGKGRKDRK <u>RGPC</u>	++
	P65-2-1A3	CGPRTRVNHQGGKTRG <u>PC</u>	+
3	P65-2-2A5	CGPAGAIRHEHRQGLG <u>PC</u>	+
	CD40L	152-LVTLENGKQLTVKRQGLYIYAQ-174	
	P44-4-2A1	CGPDTGLETD <u>AAAD</u> ASG <u>PC</u>	+
4	P45-7-2A3	CGPRRVRET <u>VAVE</u> SSG <u>PC</u>	+
	BW10-4	CGPPC <u>ATFEEAKSNQ</u> GPC	+
	CD40L	104-ETKENSFEMQKGDQNPQ-121	
5	P65-2-8A3	CGPGR <u>ESRGR</u> CYTPSG <u>PC</u>	+
	CD40L	242-TDPSQVSHGTGTFSGLL-259	
6	BW10-8	CGPNTPEEMAPQAPG <u>PC</u>	++
	P65-2-5A4	CGPVVHIKTNEQAAPG <u>PC</u>	+
8	P65-2-9A1	CGPVAEEPAGGAGRP <u>GPC</u>	+

【0060】

^a 配列相同性については、下線は一致を、太字は同類置換をそれぞれ表す。群1、2、4および5は、CD40Lとの相同性だけを示す。

^b 25 µg/mlアンピシリン上でCD40-198融合体と同時発現させた場合のプレイング効率。+、>10%；++、>50%。

【0061】

【表3】

表3
CD40 Trx-ペプチド競合

	B10-1	B10-4	B10-8	B10-9	P44-4-2A1	P45-7-2A3	P58-12-9A1	P65-2-9A1
B10-1	+	+/+	±/+	-/	+/+	+/	-/+	-/
B10-4	+/+	+	+/+	-/	-/+	-/	+/+	-/
B10-8	±/+	+/+	+	±/	-/+	±/	+/+	-/
B10-9	-/	-/	±/	(+)	-/	+/	+/	-/
P44-4-2A1	+/±	-/+	-/+	-/	+	+/	-/	-/
P45-7-2A3	+/	-/	±/		+/	(+)		
P58-12-9A1	-/+	+/+	+/+	+/	-/		+	-/
P65-2-9A1	-/	-/	-/	-/	-/		-/	(+)

グループ1: B10-1
 グループ2: P58-12-9A1, B10-8, B10-4
 グループ3: P44-4-2A1, P45-7-2A3
 グループ4: B10-9
 グループ5: P65-2-9A1

【0062】

1. “+”=阻害、“-”=非阻害。読み方は縦/横。

【0063】

2. “+”斜線の右側のすべてのセルについて、読み方は縦=遊離/横=融合

体

3. “+”斜線の左側のすべてのセルについて、読み方は縦= 融合体 / 横=遊離

4. (+)自己対照は実際には行われなかった。

【0064】

一般に競合データは相同性データと合致するが、ただし非重複エピトープとの同時結合は許されない場合がある。これは、p58-12-9A1とBW10-8のような非関連配列が互いに強く競合し合い、似たような競合ぶりを示すことを可能にする。これはおそらく酵素組み立ての立体障害によるものであろうし、特にBW-10-1とp58-12-9A1に関する相同性データと競合データの不一致を説明してくれるかもしれない。これらの2つはおそらく同じCD40相互作用エピトープの近くに結合し、それが他の(すべてのではないが)多数のtrxpepについて断片相補を立体的に阻害するのであろう。

【0065】

用途によっては、ラクタマーゼの活性化を、遊離リガンドかまたは細胞表面受容体か、別個の分子上の非重複エピトープへの 197と 198の同時結合に依存させるのが有効であろう。競合試験で非競合的であることがすでに判明している2つのCD40結合trxpepを使用してこの効用を試験した。一方のtrxpepはpA01ベクターからC末端 198融合体として発現させるためにサブクローニングした(図6参照)。他方のtrxpepは前のようにpAE1ベクターから 197融合体として発現させた。これら2構築体の同時発現を陰性対照として用いた。CD40依存性活性化を試験するために、CD40EDコード配列を(シグナルペプチドを含めて)trxpep- 198発現カセットのプロモーターとtrxpep- 198配列の間にサブクローニングした。リボソーム結合部位を収めた追加の20 bpをCD40終止コドンから下流に含めて、前述のFabの場合と同じ要領で、同じジシストロン転写産物からCD40とtrxpep- 198の両方を発現させるようにした。表4に示すように、CD40の発現は50 µg/mlアンピシリンに対する耐性を誘発したが、CD40なしでは対照構築体を発現する細胞は25 µg/mlアンピシリン上でも細胞当たり 10^6 未満のコロニーしか生み出さなかった。このように、ラクタマーゼ断片相補は三分子のタンパク質-タンパク質-タ

ンパク質相互作用によって効率的に誘発することができる。

表4

非競合的なCD40結合trxpepとCD40EDの使用による

TEM-1 / 断片相補のリガンド活性化

【0066】

【表4】

<u>分子#1</u>	<u>分子#2</u>	<u>分子#3</u>	<u>Amp^r</u>
α -p44-4-2	CD40- ω	-	++
α -p44-4-2	CD40	BW10-1- ω	++
α -p44-4-2	-	BW10-1- ω	-

【0067】

^a 細胞当たりコロニー数で見た25 μ g/mlアンピシリン上のプレーティング効率。
- , <10⁻⁶; +, >10%; ++, >25%; +++, >50%。

実施例4

197と 198の相互作用依存性相補による ラクタマーゼ活性化:

CD40特異的scFvとCD40の相互作用

197と 198の相互作用依存性相補による ラクタマーゼの活性化はscFvとtrxpepの相互作用により効率的に促進することができたので、scFvと真のタンパク質抗原、好ましくは細胞表面受容体の相互作用でもそれを促進しうることを立証することが重要であった。これが特に重要なのは、I型膜貫通受容体のリガンド結合ドメインはN末端であり、したがってC末端融合体としてのその発現が好ましいためであった。しかし、scFv発現の好ましい方向性もまたN末端である。scFvと抗原の両方をC末端融合体として発現させようようにするために、scFvの 198とのC末端融合体、CD40のfosヘリックスとのC末端融合体および 197のjunヘリックスとのC末端融合体などを含む三分子相互作用による ラクタマーゼ活性化を試験した。これらの発現構築体はtrxpep-断片融合体のCD40連結反応に使用さ

れたもの類似していた。CD40-fos融合体とscFv-198融合体をpA01ベクター中のジシストロン転写産物から発現させ、197-jun融合体をpAE1ベクターから発現させた。fos-jun相互作用は K_d が 10^{-8} Mレンジにあるので、CD40を、ペリプラズム内にこれよりももっとずっと豊富に存在する197に定量的に連結させるはずである。scFvのCD40への結合は次いで198をこの複合体に合体させ、断片相補を促進するはずである。表4に示すように、CD40-fosの発現は最高の $100\ \mu\text{g/ml}$ アンピシリンに対する耐性を誘発したが、この場合もまたCD40-fosを欠く対照構築体だけを発現する細胞は $25\ \mu\text{g/ml}$ アンピシリンでも細胞当たり 10^6 未満のコロニーを発現させたにすぎない。こうして、好ましいC末端融合体内の2つの細胞外タンパク質の三分子相互作用はラクタマーゼ断片相補を効率的に誘発することができる。

実施例5

ジスルフィド増進断片相補

197および198断片の相互作用依存性相補によって生み出されるラクタマーゼ活性は同じ発現条件下での野生型酵素のそれよりもずっと低い。こうした活性の喪失は両断片には天然のコンホメーションへと折りたたまれていないときは凝集または反転する傾向があるためと考えられるが、これはまたゆるく係留された異種相互作用の、本来状態のコンホメーションを安定化させる能力の低下に起因する比活性の喪失を反映すると考えられる。切断点へのジスルフィドの導入により折りたたみの反応速度と安定性の双方を改善しうるし、またこれは相互作用依存性活性の大幅な向上にもつながりうることを推論された。両断片対が異種相互作用でドッキングされると、切断点に付加されたシステイン間のジスルフィド結合の形成によりポリペプチド骨格の完全な状態が折りたたみ経路のどこかで回復され、それが折りたたみを加速したり活性コンホメーションを安定化したりすると期待された。細菌ペリプラズムの高酸化性環境ではジスルフィドはきわめて急速に形成されよう。しかし、もしも断片対がドッキングされ折りたたまれるまでは不安定であるが、いったん折りたたまれると活性が安定になるのであれば、切断点ジスルフィドは折りたたみ経路の遅い段階まで形成されない場合には活性にほとんど効果を及ぼさないという可能性がある。

【0068】

システインは切断点末端と異種相互作用因子に至るリンカーとの間で 197と 198の配列に付加した。fosおよびjunヘリックスを相互作用因子とすると、定量的アンピシリン耐性(>10%プレーティング効率)は50 $\mu\text{g/ml}$ から100 $\mu\text{g/ml}$ 超へと強まったし、25 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上でのプレーティング効率は少なくとも2倍上昇した。したがって、ジスルフィド形成は折りたたみを加速したり活性コンホメーションを安定化したりするに違いない。しかし、ジスルフィドは相互作用因子なしでもほぼ同程度の活性を生み出した。これはジスルフィドまたは相互作用因子の不在下での断片活性とは大違いであり、この場合のプレーティング効率は25 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上で 10^{-6} 未満であった。これは、両断片がおそらくこれらの細胞内濃度では自力で容易に会合し折りたたまれるが、異種相互作用または切断点ジスルフィドを欠くと、折りたたみが活性コンホメーションまで進行できないか、または活性コンホメーションが選択可能な活性を生み出すに足るほど安定的でないことを示唆する。無支援の折りたたみ時にチオールが近接している場合には、ジスルフィド形成のための有限のタイミング幅が存在するに違いない。この幅は相互作用支援折りたたみ時にはずっと広くなるはずである。したがって、ジスルフィド形成を遅らせ、それによって異種相互作用への依存性を強めさせることは可能なはずである。

【0069】

ジスルフィド形成の異種相互作用への依存性を強めさせるために2つの修飾を加えた。第1に、増殖培地に還元剤を混ぜることによってジスルフィド形成を阻害することができた。10 mMのジチオスレイトール(DTT)はジスルフィド支援断片の100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上のプレーティング効率を相互作用の不在下で細胞当たり $<10^{-4}$ コロニーへと低下させた。ちなみに、fos-jun相互作用の存在下では同じ断片の活性はDTTの影響をほとんど受けなかった。そのため、活性化指数は>100倍にも上昇した。第2に、システインをそれぞれ1残基だけ切断点からラクタマーゼ配列側へずらして、本来の折りたたみ状態でさらに~8 だけ隔てられるようにした。これは活性を相互作用がない場合で50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上のプレーティング効率 $<10^{-6}$ へと低下させ、またfos-jun相互作用がある場合の50 $\mu\text{g/ml}$

アンピシリン上のプレーティング効率を $\sim 10\%$ へと低下させ、対応する活性化指数を $>10^5$ にした。したがって、還元剤とチオール分離を組み合わせれば、バックグラウンドに対する相互作用依存性活性化の増分はおそらく $>10^6$ へとさらに大きくなるものと期待されよう。ジスルフィドによってもたらされる相互作用依存性の比活性の増進は弱い相互作用や貧弱なエクスペッサーでも細胞当たり10分子未満の活性化酵素で選択可能なラクタマーゼ活性を生み出せるようになるはずである。

【0070】

TEM-1 197/ 198断片相補の活性化作用を増進する切断点ジスルフィドの能力は、異種相互作用だけでは選択可能な活性をわずかに生み出すだけの(またはまったく生み出さない)多数の酵素断片対を切断点ジスルフィドで活性化しうるかもしれないことを示唆する。異種相互作用は断片のドッキングに不可欠であろうが、それは ~ 60 リンカーで係留されるため、切断点でポリペプチド骨格の堅固な結合を回復させることはできない。しかし、切断点をまたぐジスルフィドの形成は骨格の完全性を回復させるはずであり、またそれによって複合体の活性部位を安定化させるのに役立つはずである。このアイデアを試験するために、ポリペプチド鎖の9本の露出ループの切断に対応するさらに9個のTEM-1 ラクタマーゼ断片対をスクリーニングした。9断片対のスクリーニングは切断点ジスルフィドだけの場合、fos-jun相互作用だけの場合、および両者を併用した場合について、選択可能な活性を指標にして行った。その結果をまとめると表5のようになる。

【0071】

fos-jun相互作用に切断点ジスルフィドを加えると、9断片対のうち7断片対の活性が大幅に強まったが、これは 197/ 198断片対を加えれば10断片対中8断片対となる。この10断片対は3群に分類されよう。第1群は2個の陰性対を含む。第2群はジスルフィドとfos-jun相互作用を合わせた場合に限って活性化される3個の対を含む。いずれの場合でも、プレーティング効率は $25 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン上で少なくとも 10% 、活性化指数は少なくとも1000である。第3群はいずれも分子のC末端側3分の1内の切断点に由来する5個の対を含み、fos-junだけでも中程度 \sim 強

度の活性を生み出すが、fos-junとジスルフィドの両方を合わせると強力な活性を生み出す。何よりも重要なのは、5対中4対がジスルフィドだけでは選択可能な活性を示さない、したがってそれらの活性化指数はきわめて大きいという点にある。最大活性化指数を示すのはP145/N175で、その値は100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上で $\sim 10^7$ である。最大活性を示すのはG253/K254で、プレーティング効率は400 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上で $>25\%$ ある。興味深いことに、切断点ジスルフィドだけで強い選択可能活性を生み出す対は、相互作用依存性の活性化を示すことが最初に判明した断片対、すなわち 197/ 198にとどまっている。何対かの活性化は切断点システインと内部システインの間での混合ジスルフィド形成によって阻害されている可能性があるし、またそうした阻害は外来還元剤によって緩和されうるという可能性もある。しかし、これらの場合には無支援の再折りたたみは切断点ジスルフィドの効率的形成を可能にするところまで進行する前に中断されるという可能性も少なくとも同程度に考えられる。

【0072】

【表5】

表5

ジスルフィド補助Fos-Jun相互作用によるTEM-1 β -ラクタマゼフラグメントの活性化^a

切断点	+S ₁ +Fos/Jun		+S-S		+Fos/Jun		バックグランド	
	Amp25 ^b	Hi Amp ^c	Amp25	Hi Amp	Amp25	Hi Amp	Amp25	Hi Amp
N52/S53	+	25	-	-	-	-	-	-
E63/E64	+	25	-	-	-	-	-	-
L91/G92	-	-	-	-	-	-	-	-
Q99/N100	+	25	-	-	-	-	-	-
H158/V159	-	-	-	-	-	-	-	-
P174/N175	+++	200	-	-	+++	50	-	-
E197/L198	+++	100	+++	50	+++	50	-	-
K215/V216	+++	100	-	-	+	25	-	-
A227/G228	+++	200	-	-	+++	50	-	-
G253/K254	+++	400	-	-	+++	50	-	-

【0073】

^a 断片対はTG1細胞中で発現させ、1 mM IPTGの存在下、アンピシリン上にプレートした。断片対の発現では切断点末端チオール(S-S)を付ける場合と付けない場合があり、また切断点末端fos()またはjun()ヘリックスを付ける場合と付けない場合があった。

° 活性は25 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン(25amp)上のプレーティング効率(細胞当たりコロニー数)で表示している。-, <10⁻⁴; +/-, 0.01; +, 0.1; ++, 0.25; +++, 0.50; +++, >0.90.

° HiAmpは、断片対発現細胞が>10%効率でプレートする場合の最高アンピシリン濃度($\mu\text{g/ml}$)を表す。

【0074】

最高の活性を生み出した断片対が最高の活性化指数を示した断片対と同じではなくその逆もまた真であったという事実は、用途が異なればそれに最も適した断片対も異なることを示唆する。たとえば、10⁶以上の非相互作用断片対をバックグラウンドに天然相互作用を検出しなければならない細胞内相互作用マッピングでは活性化指数のほうが最大活性よりも重要である。したがって細胞内相互作用マッピングにはP174/N175が最適の断片対であろう。他方、in vitro用途では活性化標的リガンドがつねに律速因子であろうから、活性化指数よりも最大活性のほうが重要である。活性を最大化するには、リガンド用として断片をそのK_d値の10倍過剰量使用すればすむので、活性化指数はSN比100に対して1000で十分である。したがって、バイオセンサーや均質検定などのようなin vitro用途にはG253/K254が最適の断片対であろう。

【0075】

切断点ジスルフィドは相互作用依存性酵素断片対相補システムの重大な欠点を克服する。そうしたシステムが広範囲にわたるタンパク質-タンパク質相互作用により効率的に活性化されうることは、ハイスループット用途にはきわめて重要である。言い換えると、偽陰性率を極力低く抑えるには、単一の、天然に形成されるタンパク質ドメインのサイズ範囲内の、すなわちアミノ酸数~100ないし300の長さ範囲の2タンパク質または断片間の相互作用によってシステムを活性化しうるものでなければならない。このサイズ範囲内の球状タンパク質は半径が~30ないし50 \AA である。これはリンカー結合点の間隔が最大で100 \AA になりうることを意味するが、断片の切断点が一つになりうるためにはこの距離をリンカーで橋渡ししなければならない。(Gly₄Ser)₃リンカーが選ばれたのはこうした理由による。これは、十分な延長性と柔軟性を備え、また~60 \AA の長さを持ち、したがって

折りたたみ時に切断点末端の十分な接近を可能にする最高120 の結合長さをもたらしものと期待される。それにもかかわらず、活性コンホメーションの安定性はきわめて微妙であり、一般に異種相互作用の立体的な大きさに反比例すると見るのが相当である。したがって、今日までに記載されているこの種のあらゆるシステムに関しては、リンカーが長ければ長いほど、再折りたたみに対応する相互作用の比率は高まりうるが、活性コンホメーションの安定化に対する相互作用の寄与は低下しうると想定されよう。

【0076】

切断点ジスルフィドはこの限界を克服する。というのは、もしもリンカーが十分に長ければ切断点ジスルフィドは再折りたたみ時に容易に形成され、これがいったん形成されてしまえば、再構成された酵素の比活性は異種相互作用の立体的な大きさには依存せず、そればかりか相互作用の継続的な完全性を必要ともしなくなるはずだからである。したがって、切断点ジスルフィドは一方向スイッチとして働き、活性化エネルギーを広範囲の異種相互作用から受け取り、相互作用因子の適正折りたたみ能と切断点システインの十分な接近を可能にするリンカーの長さだけに制限される。これには、天然相互作用のより大きな部分による選択可能活性の生成を可能にする2つの重要な帰結が伴う。すなわち、より長いリンカーが使えるうえに、それ自体では弱すぎて選択可能な酵素活性を支えきれないような相互作用でも「ジスルフィドスイッチを入れて」選択可能な活性を生じさせるようにすることができる。

実施例6

ペプチド増進断片相補

相互作用依存性酵素断片相補を増進する別の方法は、短いランダムペプチド配列を切断点に導入し、次いでモデル相互作用を用いて活性の上昇を指標に選択するというものである。こうしたペプチド依存型の増進にはいくつかの機構が考えられる。たとえば、ペプチドは互いのまたは酵素自体との相互作用により、再構成された酵素の活性コンホメーションを安定化させるという可能性があるし、あるいはペプチドは断片対の一方または両方を安定化させ、それによって断片濃度を高めて定常活性を増進させるという可能性がある。

【0077】

合成オリゴヌクレオチドを使用して、3つのランダム化残基を各断片の切断点残基と異種ドメイン用リンカーの間に付加した。モデル相互作用として、198のN末端のc-fosヘリックスと197のC末端のc-junヘリックスを使用した。各ランダム化位置には、最強の電荷-電荷相互作用を助長する荷電残基に偏ったアミノ酸の部分集合をコードする縮重コドンを使用した。VRKコドンでは第1文字位置にc、aまたはgが、第2文字位置にaまたはgが、第3文字位置にtまたはgがそれぞれ入る。コード化されているアミノ酸はHis、Gln、Arg、Asn、Lys、Ser、Asp、GluおよびGlyである。両断片中の3つのランダム化位置には合計 $12^6=3 \times 10^6$ の可能なコドンの組み合わせが、また $9^6=5.3 \times 10^5$ の可能な異なるアミノ酸配列が対応する。まず、1万クローンのライブラリーをアンピシリン上に、その濃度を順次高めながら、コロニーがまったく回収されなくなるまでプレートしていった。DH5 株で800 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンから6つのクローンが回収され、6つともfos-jun相互作用に対する厳密な増殖依存性を示した。実際、同じ出発 10^4 クローンのライブラリーで197からjunヘリックスを除去し、これらのクローンを同濃度のアンピシリン上にプレートしていても200 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上で数コロニーが出現しただけで、それより高い濃度ではコロニーがまったく出現しなかった。この程度のアンピシリン耐性はfos-jun相互作用だけで生み出される耐性に相当する。

【0078】

意外にも、DH5 から回収された6つの選択クローンはみな同じトリペプチド、Gly-Arg-Glu(GRE)をもち、またそれぞれが異なるトリペプチドをもっていた。

トリペプチドを除去しても、著しい活性の低下は見られなかった。これは断片相補を増進するGRE配列の能力がトリペプチドの存在に依存しないことを示唆した。したがって、GREトリペプチドが相互作用依存活性の著しい増進をもたらしたことになるが、それは相互作用に取って代わりうるものではない。実際、相互作用がなければGREトリペプチドはバックグラウンドを高めるようにはまったく見受けられないので、それ自体は再折りたたみを加速したり折りたたまれた複合体を安定化したりはしない。GREトリペプチドの効果として最もありそうな

のは、無構造の凝集に伴う断片の喪失を妨げて 197断片を安定化させる効果である。198断片はきわめて安定であるが、197は安定性にやや劣るため、後者が断片相補を制限すると見込まれる。したがって、197の安定化とそれに伴う濃度の上昇は相互作用依存酵素の定常活性を高めることになる。GREトリペプチドは197の凝集を阻害する可能性があるものの、断片複合体の再折りたたみを妨げなかったように見受けられる。凝集体の形成は急激に進むため、分子間会合速度定数の小幅なシフトに対しこの上なく敏感である(Dobson, Trends Biochem Sci (1999) 24:329)。したがって、係留トリペプチドの相互作用表面に対する弱い結合でさえも、分子間凝集をうまく克服することができよう。しかし、相補断片が協調的な折りたたみによって活性複合体を形成すると、弱く結合したトリペプチドはその結合部位から簡単に引き剥がされよう。これは出現途上の本来のコンホメーション内で双方が隔てられるようになり、立体歪みを起こすからである。係留小ペプチドがより大きなタンパク質をタンパク質の折りたたみを妨げることなく安定化させうる訳はこのように理解されよう。

【0079】

同じランダムトリペプチドライブラリーをTG1株内のfos/jun依存性アンピシリン耐性を指標にしてスクリーニングすると、400 µg/mlアンピシリン上で5クローンが回収された。fos-jun相互作用だけだとTG1細胞は50 µg/ml長のアンピシリン濃度ではプレートしないであろう。こうして前と同様、fos-jun相互作用だけで生み出されるアンピシリン耐性を大幅に向上させるトリペプチドが選択された。今回は4種類のトリペプチドが回収されたが、それぞれが異なるトリペプチドを伴った。

対

FHT400-1A1, -1B1	HSE(cat agt gag)	REQ(cgg gag cag)
FHT400-2A1, -2B1	NGR(aat egg cgg)	QGN(cag ggt aat)
FHT400-4A1, -4B1	GER(ggt cgg gag)	DGR(gat ggg agg)
FHT400-9A1, -9B1	EKR(gag aag cgt)	GRR(ggt agg agg)
FHT400-10A2, -10B1	NGR(aat ggg cgg)	GNS(ggt aat agt)

GREはやはりトリペプチドライブラリーから選択された。NGRはトリペプチ

ライブラリーから2回選択され、2つの異なるトリペプチドを伴った。いずれの場合にも、活性化はfos-jun相互作用に依存し続けた。しかし、元のGREトリペプチドとは異なり、いずれの場合も、両トリペプチドの存在下で活性が増進された。GREトリペプチドの活性さえも断片上のDGRトリペプチドによって増進された。また、断片はある程度の互換性があった。種々のトリペプチドを種々のトリペプチドと対にすることができた。増進され活性がなお異種相互作用に依存していたという事実は、ペプチドの主要な効果が、最終断片複合体の生成よりもむしろ結合相手の断片の凝集からの保護であったことを示唆する。前者は異種相互作用とは無関係に、構成的活性を付与するものと見込まれよう。

【0080】

GREトリペプチドはまた、トランス形197を安定化させることも判明した。197-fosおよびjun-198の各融合体をE. coliペリプラズム内で、Gly₄Serリンカーを介してチオレドキシンのN末端に融合させたGREトリペプチドと同時発現させると細胞は50 μg/mlアンピシリン上で100%の効率でプレートしたが、197-fosおよびjun-198融合体を単独でGRE-trxA融合体なしで、または異なるトリペプチド-trxA融合体と共に発現する細胞は50 μg/mlアンピシリン上で~1%の効率でプレートしたにすぎない。GRE-trxA融合体は相互作用ヘリックスの存在下ではアンピシリン耐性をまったく付与しなかったため、それは再折りたたみ後の断片複合体を安定化させるのではなく、むしろ197断片を安定化させるに違いない。というのは、活性は可溶性197の量によって制限されるからである。GREトリペプチドは異なる担体を使用した場合でも同じ安定化効果を197に及ぼすので、その活性はコンテキスト独立であるに違いない。したがって、ランダム配列ライブラリーから選択されたトリペプチドで18kDaの酵素断片を少なくとも100倍安定化させることが可能であろう。係留トリペプチドの場合と同様に、この遊離GREトリペプチドは断片複合体の再折りたたみを妨げる風もなく197の凝集を阻害することができたであろう。しかしこの場合、トリペプチドの置換は、構造エレメントの互いに対する相対的な有効分子内濃度がトリペプチド濃度よりもずっと高かったであろうという事情によって大いに助長されたであろう。このようにして、トランス形の大きなタンパク質を安定化させるという小さなペプチドの一般

的な能力が理解されよう。この現象は広く理解されているわけではなく、実際これは、トリペプチドほどの小さなものによって機能タンパク質が巧みに安定化されうることの最初の例示かもしれない。

実施例7

突然変異増進断片相補

ラクタマーゼ断片を安定化し、もってTEM-1 197/ 198複合体の相互作用依存性の活性および活性化指数の両方を高めるという能力は、断片の不安定性が大きなネックとなる。ラクタマーゼ断片相補のin vitro用途には大いに役立つはずである。したがって、ランダム突然変異誘発および選択によって同等の197断片安定化が実現可能かどうかを見極めることがきわめて重要であった。これを検定するために、誤りがちのPCR (Cadwell and Joyce, 1995, supra)によって197コード配列に突然変異を誘発した。CadwellとJoyceのPCR条件は鋳型とのミスマッチを偏りなく引き起こすことにより~150ヌクレオチドごとに1回の割合で突然変異を誘発する。197コード配列は実際には長さが約520ヌクレオチドであり、~75%の突然変異がコード化されたアミノ酸に変化をもたらすので、生成されるコード変化は分子当たり3未満となるはずである。197突然変異体ライブラリーの約 10^8 クローンを収集し、junヘリックス融合体として野生型198のfosヘリックスと同時発現させた。突然変異を誘発させた197-jun融合体はpAE1ベクターから発現させ、またfos-198融合体はpA01ファスミドベクターから誘発させた(図6参照)。DH5株を用いて両構築体を同時発現させ、600 μ g/mlアンピシリンの存在下でコロニーを回収した。回収した3クローンのうち2クローン(FI600-1および-3)は配列決定してみると、2つのコード突然変異K55E (aag gag)およびM182T (atg acg)をもつ同じ配列であった。第3のクローン(FI600-4)もまた2つのコード突然変異をもち、うち1つは他の2クローンと共有されており(M182T)、もう1つのP62S(ccc tcc)は他クローンのもう一方の突然変異に最も近かった。

【0081】

いずれの突然変異を発現する細胞も100 μ g/mlアンピシリン上で>30%の効率でプレートしたが、野生型197を発現する細胞は100 μ g/mlアンピシリン上では細胞当たり $<10^{-6}$ コロニー/細胞で、また25 μ g/mlアンピシリン上では~30%で

プレートした。しかし、どちらの突然変異体でもプレーティング効率は異種相互作用の不在下、すなわちjunヘリックスを除去した場合とまったく同じであるか、それを上回った。さらに多くの突然変異を徹底的に調べても、相互作用依存活性をもつ突然変異体は現れなかった。したがって、ランダムトリペプチドで得られた、活性化が相互作用依存性を保ち続けるという結果とは大違いで、197の適応的突然変異は必ず相互作用依存性を解消していた。これは次のように理解されよう。トリペプチドは凝集を不可逆的に妨げることにより断片を安定化した。こうした不可逆性のゆえに、トリペプチドは折りたたみを妨げることなく凝集を阻害することができる。しかし、突然変異はこの意味では不可逆的でない。凝集が主に本来の折りたたみ接点の分子間形成に起因するとすれば、突然変異によるこれらの接点の混乱は折りたたみを妨げると予想されるかもしれない。実際、活性断片複合体の形成に必要とされる再折りたたみ過程を阻害することなしに突然変異によって断片を安定させることは熱力学的に不可能であろう。というのは、断片の本来状態の折りたたみは露出疎水性表面が大きすぎて安定し得ないからである。したがって、突然変異は露出疎水性表面を最小限にするような代替折りたたみを安定化させることによって断片を安定化させうるにすぎない。しかし、これらの代替折りたたみは本来の折りたたみの経路が活性複合体へと進行する前にほどけなければならないが、この過程に要するエネルギーがけた外れに大きいのであろう。

【0082】

ほとんどの凝集は折りたたみ経路内の、凝集を起こしやすい中間体によって促進されるため、凝集速度はそうした化学種の寿命に比例する。前述の切断点ジスルフィドの効果は、断片が異種相互作用の不在下で会合と折りたたみの開始をなしうるが、断片が何らかの理由で、たとえば異種相互作用によって、または切断点ジスルフィドの形成によって、引き合わされないと、折りたたみ過程が中断されることを示唆した。こうした条件を欠く場合には、折りたたみ完了前に断片が解離する確率は折りたたみ速度に比例し、折りたたみ速度のほうは折りたたみ中間体の寿命に比例する。したがって、突然変異による凝集阻害の機構として最もありうるのは折りたたみ中間体を不安定化させるような機構であるとすれば、こ

れは折りたたみを加速し、それによって折りたたみ完了前に断片解離が起こる確率を小さくすることにもなろう。こうして、折りたたまれた複合体を安定させる突然変異は断片を安定化させる突然変異よりも選択される可能性が大きいという理由、および後者ではなく前者が構成的な相互作用依存活性を生じさせると見られる理由が理解されよう。

【0083】

クラスAペニシリナーゼ類の典型的なメンバーであるE. coli TEM-1ラクタマーゼに関して、相補して活性酵素を形成しうるような断片をすでに特定したが、それらの断片が相補して活性酵素を形成しうるのは、断片の「切断点」末端が、互いに直接または好ましくは第2の分子を介して相互作用するようなタンパク質または他の分子へと融合される場合であり、かつその場合に限られる。さらに、本発明は新しい方法を、すなわち相互作用依存性相補をなしうる酵素断片を同定し、切断点末端に融合された異種ドメインの相互作用に対する酵素断片活性の依存性を付与するよう特に修飾するための方法を提供する。リガンド活性化または相互作用活性化 ラクタマーゼ類は、細菌のペリプラズム、細菌の細胞質、真核細胞の細胞質またはin vitroなどを含む多数の場所で活性化することができる。それらは、抗生物質、色原体、蛍光原体などのような多様な基質、さらにはラクタムプロドラッグ、前駆抗生物質、前駆栄養素などに対し高活性であり、したがって生死や発色の判別による陽性、陰性両方の選択に使用することができる。

ラクタマーゼ断片相補システムの効用は細胞表面受容体、抗体、および天然タンパク質表面にディスプレイされるランダムペプチドの間の相互作用のモニタリングですでに実証されている。

実施例8

ヒト末梢血リンパ球プロテオーム相互作用ライブラリー

循環免疫細胞の膜結合、分泌両タンパク質間の機能的相互作用は未発見のものも含めるときわめて多数にのぼる。たとえば、これまでに発見された150ほどのCD抗原には機能やリガンドが未知のままのものもかなり多い(Ager et al., in Immunology Today Immune Receptor Supplement, 2nd Ed. 1997)。さらに、組み合わせの多いシグナル特異性の生成機構は、多数のシグナルタンパク質が多様な機

能的相互作用にかかわっていること、またそのうちの最もよく知られているタンパク質にしてモリガンドや機能が未発見のままであることを示唆する。したがって、免疫系循環細胞の細胞外プロテオームの機能的相互作用は、既存の相互作用マッピング技術では容易に接近し得ない薬理的標的の潜在的宝庫となっている。このプロテオームは相互作用マッピング面での相互作用依存性ラクタマーゼ断片相補システムの威力を実証するための比類ない機会を提供してくれる。多数の重要な相互作用が未発見のままであるとはいえ、既知のものも多く、それによってシステムの効率を測定することができるからである。

【0084】

前述のように、真の相互作用を膨大な数の非相互作用タンパク質対から明確に識別するうえでは活性化指数が相互作用依存性断片相補システムの最重要パラメーターである。したがってこの用途には、切断点ジスルフィドを有するために $\sim 10^7$ という最高の活性化指数を示すTEM-1ラクタマーゼのP174/N175断片対(174と175)が使用されよう。それはまた比活性も堅固であるが、これは何らかの断片安定化トリペプチドによりさらに向上させることがおそらく可能であろうから、まずVRKまたはNNKトリペプチドライブラリーを発現ベクターの切断点システムとリンカーの間に挿入し(図6参照)、300~800 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン上での増殖を指標に選択するとよい。活性化指数が犠牲にならない限り、断片安定化トリペプチドにより付与される、より高い比活性は発現配列ライブラリー内の比較的弱い、真の相互作用が選択可能な活性を付与することを可能にするはずである。発現配列ライブラリーの質を最大限に高めるためには、完全長cDNAライブラリーをまず正規化プロトコールにかけて、まれな配列と豊富な配列の頻度を正規化するとよい。次にこの正規化されたcDNAから、ランダムプライミングによるcDNAをPCR法で調製し、 >200 塩基対の断片をサイズ選択して単一タンパク質ドメインのサイズ以上の断片をコードする配列へとライブラリーを濃縮する。最後に、このライブラリーを折りたたみ選択プロトコールにかけて、正しい読み枠内に、かつ自律折りたたみタンパク質ドメイン(AFD)と見当が合うように発現するコード配列の側へと濃縮する。

【0085】

粗面小胞体膜に由来し、したがって分泌および膜タンパク質に対応するmRNAを豊富に含む粗面ミクロソームを、ヒト血液プールに由来する非分画リンパ球からシヨ糖密度勾配沈降速度法で単離することになる(Gaetani et al., *Methods in Enzymology* (1983) 96:3; Natzle et al., *J Biol Chem* (1986) 261:5575; Kocpczynski et al., *Proc Natl Acad Sci* (1998) 95:9973)。次いで、mRNAを粗面ミクロソームから市販キット(たとえばPoly(A) Select; Promega, Inc., Madison, WI)を用いて精製する。次いで、ランダムプライミングによるcDNAライブラリーをRNA鋳型から作製し、一方向にクローニングする。第1鎖cDNAをAMV逆転写酵素(RT)とランダム六量体プライマーで作製する(Sambrook et al., 1989, pp. 8.11-8.21)。このプライマーは ラクタマーゼ および 融合体発現ベクターへの連結に好都合な制限部位をもつユニーク5'末端付加基が収めてある。鋳型はAMV RTのRNAseHで破壊し、また未使用プライマーはスパンカラムを使用して除去する。次に第2鎖を、DNAポリメラーゼIのKlenow断片および発現ベクターへの挿入に好都合な制限部位をもつ別のユニーク5'末端付加基を収めたランダム六量体プライマーで作製する。除プライマー後、cDNAを、各オリジナルプライマー上のユニーク配列だけに相当するプライマーを用いたPCRで増幅して(Dieffenbach and Dveksler, in *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1995)、大多数の増幅断片がE. coli内で正しい発現方向をもつようにする。次に産物を、磁気ビーズ上に固定化した限定量のヒト・ゲノムDNAとの完全ハイブリダイゼーションにより標準化する(Kocpczynski et al., 1988, supra)。コード配列はゲノムDNA内で自然に標準化されるため、ゲノムDNAハイブリッドから回収されるcDNAを標準化するのがよい。最終増幅後、PCR産物をSephacryl S-400による遠心ゲルろ過でサイズ選択し、>~200 bp断片を得る。次いでcDNAを制限酵素で消化し、相互作用依存性 ラクタマーゼ 174および 175融合体発現ベクター(折りたたみ選択のために必要とされる若干の変更を除けば、図6に示したものと本質的に同じ)へと連結させる。cDNAライブラリーの折りたたみ選択および相互作用マッピングのためのベクターとプロトコールは図9に示すとおりである。

折りたたみ選択の都合上、 および 融合体としてのライブラリー発現用両ベクターは相性の良いファスミドである。さらに、c-myc腫瘍遺伝子に由来する周知の12量体(Hoogenboom et al, 1998, supra)などのようなペプチドエピトープタグが 融合体ベクター内のcDNAまたは発現配列(ES)ライブラリーのC末端に、また 融合体ベクター内のESライブラリーのN末端にもコードされている。各融合体ライブラリーは、他方の ラクタマーゼ断片に融合された抗myc 9E10 scFv(Hoogenboom et al, 1998, supra)などのような抗タグscFvと同時発現させると、正しい読み枠内に自律折りたたみドメイン(AFD)を発現するクローンの側へと濃縮することができる。この選択の原理は、本来のコンホメーションへの折たたみが可能な断片に限りタグ-抗タグ相互作用によって促進される選択可能なレベルの ラクタマーゼ断片相補を支えきれだけの安定性を備えるというものである。

【0087】

標準化されたcDNAライブラリーとベクターの連結産物は高電圧エレクトロポレーションによりE. coli株TG1に導入し(Dower et al., Nucleic Acids Res (1988) 16:6127)、さらにこれを、ライブラリーには少なくとも100倍過剰量の非AFDコード化断片が見込まれるためノン相互作用因子は 10^{-3} の効率でプレートすることが判明している最低アンピシリン濃度上にプレートする。174/175システムでは、推奨アンピシリン濃度は $\sim 25 \mu\text{g/ml}$ であろう。PBL中で発現する分泌または膜タンパク質遺伝子が 10^4 を超える見込みは薄いし、発現可能なAFDの頻度は遺伝子当たり 10^{-2} 程度であろうから、発現可能なすべての細胞外AFDを確実に代表させるためには、各ライブラリー 10^7 以上のクローンを収集するのがよい。

【0088】

標準化ESライブラリーをAFDコード化クローンの側へと濃縮し終えたら、ライブラリーはヘルパーファージM13K07を用いて各ライブラリー 10^8 以上の細胞の高多重度スーパー感染により糸状ファージとして再利用することができる(Sambrook et al., 1989, pp. 4.17- 4.19)。このライブラリーファージは浮遊培養で一晩増殖させた後、培養液上清からポリエチレングリコール沈降法で回収し、リン酸緩衝生理食塩水中で還元する。ライブラリーファージストックは15%グリセロール

ル中に冷凍保存することができる。次いで、新鮮なE. coli TG1細胞を高多重度の各ファージライブラリーで同時感染させ、システムの活性化指数が最大となることが判明している濃度のアンピシリン上にプレートする。174/175システムでは、100 µg/mlアンピシリンが最適である。活性化指数が 10^7 以上、fos-jun相互作用依存性プレーティング効率が50%以上となるからである。少なくとも 10^{14} 形質転換単位の各融合ライブラリーファージを使用して、少なくとも 10^{12} 対数増殖期TG1細胞に感染させて、各AFDライブラリーの 10^6 クローンの可能な対単位組み合わせの大部分が選択前の二重感染細胞集合中に確実に存在するようにする。 10^9 細胞/mlで1時間吸着後、細胞を洗浄し、新鮮培地に再懸濁させ、さらに1時間静かに攪拌しながらインキュベートしてファスミド遺伝子を発現させるようにする。次いで細胞を濃縮し、1 mM IPTGと100 µg/mlアンピシリンを加えた固形LB培地入りの大型(150 mm径)ペトリ皿100個にプレートする。小分取量をクロラムフェニコールおよびカナマイシン上にまき、同時形質転換体の数を求める。

【0089】

各プレートには $\sim 10^{10}$ 個の細胞がまかれるので、相互作用の頻度は十分に高くプレートが過剰増殖になることもありうる。するとプレート当たりクローン数は 10^4 以上となろう。この場合には選択されたクローンをすべて掻きとって回収し、低密度に再プレートする必要がある。大量のクローンが回収されるときは、少なくとも100クローンをとにかく再プレートして、アンピシリンの散逸に起因するバックグラウンド頻度を求めるのがよい。真の増殖クローンから各候補相互作用因子を回収し、非選択パートナーとの相互作用を検定する。選択された対は配列を決定し、BLAST検索により既知遺伝子との相同性を調べる(Altschul et al., J Mol Biol (1990) 215: 403; Altschul et al., Nucleic Acids Res (1997) 25:3389)。B細胞コアクチベーション抗原、CD40とそのT細胞リガンド、CD40L、およびT細胞活性化抗原B7.1とB7.2およびそれらのリガンドCD28とCTLA4など、免疫細胞の分泌および膜タンパク質間ではきわめて多数の相互作用がすでに知られている。これらの既知相互では、標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを調製し、全相互作用ライブラリーのコロニーリフトをプローブして、期待される相互作用因子のどの程度の割合がライブラリーに代表されてい

るかを調べることができよう。陽性クローンに由来する相互作用パートナー配列を回収し、相同性を調べて既知または新相互作用因子が検出されているかどうかを判断することになろう。真の相互作用を発現するコロニーは増殖させ15%グリセロール中に -70 でいつまでも保存し、いっそうの特性解明またはドラッグスクリーニングなどへの使用に備えることができる。

実施例9

細胞内シグナル伝達バイオセンサーの構築

相互作用依存性 ラクタマーゼ断片相補システムは、細胞内で自然に起きているほぼ任意の翻訳後修飾による活性化または不活性化に適合させることができる。結果として、それらは翻訳後修飾によって調節される任意のプロセスの活性をモニターするバイオセンサーとして細胞内に展開されよう。そうしたプロセスの大きな種類としてリン酸化調節シグナル伝達経路がある。細胞が遺伝子の発現を加減することにより細胞外状態または伝令分子に応答するようなほとんどのプロセスではリン酸化調節中間体が必須成分となっている。細胞外シグナルに対する細胞応答は一般に増殖、生存および分化へと三分類される。悪性形質転換の偏在的な構成要素は増殖調節シグナルの解除であり、これにはしばしば生存シグナルの解除も伴う。これはしばしば、リン酸化調節シグナル伝達因子の過剰発現、およびリン酸化依存性調節機能の突然変異による麻痺によって起こる。したがって、大部分のいわゆる腫瘍遺伝子はリン酸化調節増殖シグナル伝達因子であり、がん細胞中で過剰発現または突然変異して構成的活性を生み出す。

【0090】

Her-2/neu腫瘍遺伝子は185 kDaのI型膜貫通受容体チロシンキナーゼ、すなわち表皮成長因子受容体(EGFR)ファミリーの一員である。この成長因子受容体は多数の組織特に乳房の格別に侵襲性の上皮原性腺がんで過剰発現する。正常発現の場合、Her-2/neuは他のEGFファミリー受容体と、増殖因子によって連結され異種二量体を形成する。これは両受容体の細胞質ドメイン上の複数チロシンの交差リン酸化を招く。Her-2/neu上のチロシン1068(Tyr1068)のリン酸化はホスホチロシン結合補助タンパク質およびグアノシンヌクレオチド交換因子を介してp21^{ras}の活性化を、またしたがってMAPキナーゼカスケードを介して細胞分裂の活性化を

招く。Her-2/neuが十分に過剰発現すると、リガンド独立的なEGFR異種二量体化のバックグラウンドレベルが、成長因子の不在下でも構成的細胞分裂シグナルを維持するに足るレベルへと上昇し、特徴的に歯止めのない腫瘍細胞の増殖を招く。したがって、Her-2/neuの活性化を、特に正常細胞中のEGFシグナルを遮断することなく構成的シグナルを遮断しうるような形で、遮断しうるような薬剤の発見に多大の関心が向けられている。

【0091】

Her-2/neuの活性化が遮断されるときに容易に検出可能、定量可能なシグナルを生成するような細胞内バイオセンサーは、化学種ライブラリーのハイスループットスクリーニングによる抗乳腫瘍効果をもつ化合物の検出に特に有効であろう。そうしたバイオセンサーはラクタマーゼ相補システムを用いて次のようにして用意されよう。受容体キナーゼのTyr1068基質に近接したHer-2/neuのC末端に、フレキシブルリンカーを介して断片を融合することができよう。次に、Tyr1068が非リン酸化される場合に限って受容体のTyr1068領域に結合する、scFvまたはVLなどのような結合タンパク質に断片を融合させることができよう。Tyr1068はHer-2/neu過剰発現細胞中では、特にEGFの存在下で大部分がリン酸化されているため、ラクタマーゼの活性化は最小限に抑えられるよう。しかし、Her-2/neu活性化阻害物質の存在下では非リン酸化Tyr1068の割合が上昇し、 γ -Tyr1068バインダー融合体を受容体へと送り込み、そこで γ -相補により細胞中のラクタマーゼ活性が高まろう。ラクタマーゼの蛍光原基質が存在すれば、Her-2/neu活性化阻害物質は蛍光の増大により数分足らずで容易に検出できよう。Tyr1068の脱リン酸化はHer-2/neuキナーゼ活性の阻害に伴い急速に起こるためである。

【0092】

細胞内バイオセンサーでは最大活性と活性化指数の両方が重要であろう。しかし、5つの最良TEM-1断片対のいずれについても活性化指数はほぼ全面的にTyr対ホスホTyrに関するバインダーの親和性の差に依存するとみられる。したがって親和性が最も高い断片対、すなわちG253/K254(253/254)が、特に細胞内用途では切断点ジスルフィドが使用できないこともあって、選好されよう。253/

254の細胞内活性は、もし望むなら、前述のように1つまたは2つの断片安定化トリペプチドを選ぶことによって高めることも可能であろう。

【0093】

Her-2/neu不活性化バイオセンサー開発の第一歩はTyr1068結合タンパク質を得ることであろう。これは基質ペプチドのPVPEYINQSをチオレドキシンの活性部位に挿入することにより可能となろう。この部位はG33とP34の間であって、PGSGGなどのような短いリンカーに挟まれている。その目的は、ペプチドがその天然リガンドであるGrb2 SH2ドメインに結合するうえで剛直な構造を必要としないことから、ペプチド上の構造的制約を最小限に抑えることにある。次いで、このTyr1068 trxpepを (Gly₄Ser)₃ リンカーで 254のN末端へと融合し、さらにE. coli T G1細胞内で、 253のC末端に(Gly₄Ser)₃ リンカーで融合された少なくとも10⁸クローンからなるscFvライブラリーと、または10⁶クローンからなるVLライブラリーと、同時発現させることができる。このTyr1068バインダーは哺乳類細胞の細胞質中での展開を目的に選択されるため、選択をE. coli細胞質中で行うのは慎重かもしれない。この目的のためには、図6のベクターを、シグナルペプチドを除去したうえで使用することができよう。次に色原基質、たとえばニトロセフィン ($\lambda_{max}=485 \text{ nm}$; $\epsilon=17,420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; McManus-Munoz and Crowder, *Biochemistry* (1999) 38:1547) などを用いてTyr1068を色によって選択することになる。10⁶ ~ 10⁸個以上の形質転換体の中~高度の厳密さで、たとえば遞減濃度の基質上にプレートすることにより、親和性がマイクロモル以下のバインダーを特定することが可能なはずである。というのは、Tyrは高親和性タンパク質-タンパク質界面に最も普通に見られるアミノ酸だからである。そうした親和性はTyrとホスホTyrを最大限識別するのに望ましいであろう。選ばれたTyr1068バインダーはTyrのリン酸化による阻害を検定しなければならない。これは、広域チロシンキナーゼを過剰発現する同遺伝子型細胞(TKX1細胞; Stratagene, Inc., La Jolla, CA)中でベクターを発現させることにより、容易に行うことができる。

【0094】

適当なリン酸塩感受性Tyr1068バインダーがひとたび特定されたら、 253-Tyr1068バインダー融合体をpCMV-Tagベクター(TKX1細胞; Stratagene, Inc., La Jo

IIa, CA)などのような哺乳類発現ベクターにサブクローニングして、哺乳類細胞中でサイトメガロウィルスのプロモーターから発現させるようにする。

【0095】

254断片はTyr1068を含むHer-2/neu細胞質ドメインのC末端への融合体として発現させなければならない。1210残基EGF受容体(Genbank登録no. X00588; Ulrich et al., Nature (1984) 309: 418))のコード配列が使用されることになろう。これはHer-2/neuと操作上同じであり、またそのTyr1068は腫瘍細胞中の同じ過剰発現および/または成長因子連結条件下でリン酸化されるからである。35残基

254 ラクタマーゼ断片は、EGFRのC末端に(Gly₄Ser)₃リンカーで融合されると、Tyr1068から152残基しか離れていないであろう。EGFR- 254融合体と 253-Tyr1068バインダー融合体はどちらもジシストロンmRNA由来の同じベクターから発現させてもよい。これはinternal ribosome entry site (IRES; Martinez-Salas, Cur Opin Biotechnol (1999) 10:458)を上流シストロンの終止コドンと下流シストロンの開始コドンの間に挿入することにより実現される。これによって、両タンパク質は同じmRNAから同時に作製できるようになる。腫瘍細胞株へのベクターの導入はリポフェクションによって、リポフェクタミン(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)を用いて説明書記載のプロトコールにしたがって行うことができる。バイオセンサーの動作は一過性トランスフェクト細胞を使用して試験することができ、動作すると判明した場合には、長期抗生物質耐性を指標にした選択により安定した形質転換体を単離することができる。ラクタマーゼ活性の連続モニタリングには多様な自由拡散性色原および蛍光原基質が使用できる。操作上、254断片はTyr1068の近くの受容体細胞質ドメインC末端の原形質膜に固定されることになり、また 253断片はTyr1068バインダー融合体として細胞質内に遊離することになる。市販のATP類似チロシンキナーゼ阻害物質は阻害物質選択用の陽性対照として、また完全活性化EGFRから完全阻害EGFR間でのシグナル増分を求めるために、使用することができる。

実施例10

ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ用の断片相補システム

酵素断片相補システムは、多様な遺伝要素を同じ細胞または有機体に同時に組

み込む場合の選択にも有効である。たとえば、分泌性IgA抗体を植物に産生させるには4種類の遺伝子を同じ植物に導入する必要がある。実際的な理由から、この場合は少なくとも2種類の、好ましくは3種類のDNA分子を導入する必要がある。遺伝的に安定したトランスジェニック植物を作り出すためには、各DNA分子が独自の選択マーカータを持たなければならない。同じ形質転換体にいくつもの抗生物質選択システムを使用するのは煩わしいし非効率的でもある。総合的な偽陽性率、偽陰性率は個別抗生物質の偽陽性率、偽陰性率の積として変動する傾向があるためである。したがって、単一抗生物質に対応する2ピースまたは3ピースの断片相補システムのほうが多重抗生物質選択よりも明らかに有利である。

【0096】

2断片システムでは、異種ドメインの相互作用に対する活性化の依存性は必要でない。しかし、三重トランスジェニックの同時選択では酵素断片対の相補は遊離リガンド依存性の異種相互作用に依存しなければならない。これは前述の197-jun、scFv-198およびCD40-fosの三分子相互作用によるラクタマーゼの活性化の場合と似ている。これらの用途では、最重要パラメーターは再構成された酵素の最大活性であり、それは比活性と相補効率とに規定される。各断片は単独では基本的に検出可能な活性を示さず、バックグラウンドがゼロになるため、活性化指数は無関係である。したがって、細胞内活性の点で最適の断片対を確実に回収するには、fosおよびjun相互作用因子を、切断点と(Gly₄Ser)₃リンカーの間の挟んだトリペプチドライブラリーと共に使用するのがよい。トリペプチドライブラリーは各断片に安定化ペプチドを供給して、最大比活性を示す断片に有利な選択が行われるようにしよう。異種相互作用が必要とされない2形質選択(すなわち二分子選択)用途では、突然変異誘発や折りたたみ加速突然変異の選択により比活性をさらに高めてもよい。3形質選択用途では、選ばれた断片対について異種相互作用への依存性を試験する必要がある。この場合には、活性化指数がある程度重要になるだろうが、in vitro用途の場合と同様に、クリーンな選択には指数値が1000程度で十分すぎるだろう。

【0097】

ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII(NPTII; Genbank登録no. M77786)は

、ネオマイシンやカナマイシンなどのようなアミノグリコシド系抗生物質をATPからのリン酸化により不活性化するE. coli由来のアミノ酸数267の酵素である。NPTIIは動植物の細胞形質転換用選択マーカーとして広く使用されている。よって、NPTII用の断片相補システムは多形質トランスジェニック動植物の容易な生成には特に有効であろう。NPTIIの三次元構造は不明であり、既知構造との相同性も低すぎて信頼性の高い予測はしにくい。しかし、前述のように、経験的に導き出されたニューラルネットアルゴリズムを使用すれば、任意のタンパク質配列について二次構造と溶媒曝露をかなり正確に予測することができる。そうしたアルゴリズムのなかでも最も優れているのはRost and Sander (1993, 1994, supra)のPredictProteinプログラムである。このプログラムをNPTIIのタンパク質配列に適用すると、図10に示すような結果が得られた。配列のなかの10領域は二次構造が乏しく、溶媒中に曝露する、したがって生産的断片化候補部位になると予測された。これら10領域それぞれの中心での、または比較的長い領域では2つの等間隔部位での切断に対応する断片対は適当なプライマーを用いてPCRで生成し、図6に示すようなベクターにサブクローニングして、リンカーを介在させたfosおよびjunヘリックス融合体として発現させることができよう。ベクターはシグナルペプチドをコードしないという点で図6に示したものと異なるろうし、またpA01ベクターはカナマイシン耐性ではなくアンピシリン耐性をもつことになるろう。また、ベクターは酵素断片のクローニング部位と(Gly₄Ser)₃リンカーの間にVRKまたはNNKランダムトリペプチドコード化配列を含むのがよいであろう。

【0098】

各断片用のPCR産物は部分消化し、適当なベクターに、すなわち断片はpAE1タイプのベクターに、また断片はpA01タイプのベクターに、それぞれ連結する。連結産物を次に高電圧エレクトロポレーションでTG1細胞に導入し、クロラムフェニコールまたはアンピシリン上にプレートする。各断片につき少なくとも 10^4 の形質転換体を収集するのがよい。また、偽陽性を防ぐうえでも、最低定量選択カナマイシン濃度を定めるうえでも、各断片ライブラリーのカナマイシン感受性も求めるのがよい。これは単一断片プレーティング効率が $<10^{-6}$ となる濃度である。断片安定化ペプチドの頻度がこの程度の低さだからである。各断片対がト

リペプチドライブラリーで完全にカバーされるようにするには $\sim 10^8$ の同時形質転換体が必要となろうから、定量的ファージ感染を用いて各断片対につき2ライブラリーを結合するのがよい。これは前述のように、M13K07ヘルパーファージを用いて(pA01タイプのファスミドベクター内の)断片ライブラリーをファージとして再利用することにより実現される。定量的感染を容易にするには、それぞれが断片ライブラリーを収めた少なくとも 10^9 個の細胞に、それぞれが対応する断片ライブラリーを収めた少なくとも 10^{11} 個のファージを接種するのがよい。浮遊培地中で1~2時間静かに攪拌しながらファージの吸着、浸透および遺伝子の発現を図ったうえで、各断片対の細胞を遠心分離し、洗浄し、最低定量選択カナマイシン濃度の固形LB培地を入れた10個の150 mm径皿にプレートする。

【0099】

37 で一晩増殖させてから、すべてのカナマイシン耐性コロニーを集めて、遞増濃度のカナマイシン上に再プレートして、最高レベルのカナマイシン耐性を示すトリペプチド/断片対の組み合わせを特定する。最も活性の高いクローンを対象に必要な数だけ、fos-jun相互作用に対する活性の依存性を試験するのがよい。これは、この目的のために含めた遺伝子構築体中の部位を部分消化してヘリックスのうちの1つを除去することにより、最も簡単に行うことができる。その後、部分消化産物は再連結しTG1細胞に再導入しカナマイシン上に再プレートする。前述のように、活性化指数は1000でも十分すぎるので、指数が1000以上の最も活性が高い対が最適であろう。細胞質内の三分子活性化では、2つの異種二量体化ヘリックス対を、たとえば前述のようなfosおよびjunに由来する平行結合ヘリックスや酵母DNAトポイソメラーゼII(TopII; Berger et al., Nature (1996) 379: 225)に由来する逆平行結合ヘリックスを都合よく使用することができよう。各ヘリックス対の一方はNPTII断片と融合させ、他の2ヘリックスは互いに融合させて、2ヘリックス融合体が三分子複合体を形成するために存在するときだけNPTII断片が引き合わされるようにする。たとえば、-TopIIN融合体とfos-融合体はjun-TopIIC融合体によってだけ引き合わされ、活性化されることができる。そこで、3融合体のそれぞれをコードする遺伝子を、目的遺伝子をもコードする3種類のDNA構築体に分配することができよう。こうして、真核細胞を3種類の構築

体の混合物によって形質転換し、また単一抗生物質上での増殖を指標とする選択により同じ細胞内に3種類の遺伝子すべてが同時に存在するものを選択することができる。

実施例11

標的活性化酵素プロドラッグ療法

抗体指定酵素プロドラッグ療法(ADEPT)は、酵素の触媒能を利用して腫瘍特異抗体の細胞傷害性標的化能を増幅する有力な抗がん化学療法である。酵素は腫瘍特異抗体の接合体として投与されると腫瘍部位で濃縮される。未結合接合体が循環系から排出された後、腫瘍結合酵素により活性化されるまでは比較的無害であるプロドラッグが投与されようが、それに伴い細胞傷害性産物が主要部位に集積し、薬剤の非経口投与によっては過剰傷害性を伴わずに達成することが不可能な濃度になる。ラクタマーゼなどのような酵素はこれまで腫瘍標的化抗体と化学的または遺伝子工学的に接合させ、セファロsporinマスタードやアントラサイクリンなどのようなラクタム誘導体の抗腫瘍薬と併用されてきた。しかしADEPTの有効性は未結合接合体を循環系から排出した後でプロドラッグを投与しなければならないという事情によって限定される。プロドラッグの全身性活性化により許容レベルの傷害性が生み出される下限にまで循環接合体が減少する頃には、腫瘍から多量の接合体が失われているため、有効性はしばしば大幅に低下する。

【0100】

この問題は、相互作用依存性ラクタマーゼ断片相補システムを腫瘍標的化抗体と併用することによって克服されよう。ラクタマーゼの断片は、腫瘍マーカ-上の非重複エピト-プを認識する一本鎖抗体断片(scFv)へと融合されると、腫瘍へと局部集中し、ラクタムプロドラッグから高レベルの腫瘍局在細胞傷害性を生み出すに足るラクタマーゼ活性を腫瘍細胞表面で回復することができる。こうしたシステムの大きな利点は、プロドラッグの活性化が全身循環ではあるいは腫瘍マーカ-と遭遇しないいかなる場所でも、起こり得ないため、プロドラッグを高用量のscFv-断片融合体と同時にでも、または断片の腫瘍負荷が最高となる時点でも、完全に不活性である断片の循環濃度にはかまわず投与できるという点にある。

【0101】

例として、相互依存性 ラクタマーゼ断片の、ヒト乳腫瘍マーカーHer-2/neu上の非重複エピトープを巻き込むscFvとの融合体の構築と精製について説明する。次いで、Her-2/neu発現SKOV3ヒト卵巣がん細胞の表面上での ラクタマーゼ活性化回復の反応速度を求めることになる。さらに最適負荷条件下で、種々のセファロスポリンプロドラッグについて細胞傷害を、in vivo律速因子であることが知られている濃度の関数として評価することになる。次いで、得られる腫瘍活性化酵素プロドラッグ療法(TAcEPT)システムについて、重篤複合免疫不全(scid)マウスのSKOV3および他Her-2/neu発現ヒト腫瘍を軽減する効能を試験する。システムの有効性と安全性が動物モデルで実証されたならば、ヒト乳がん患者を対象に毒性および有効性試験が開始されることになる。

【0102】

ラクタマーゼ断片相補システムの治療への使用に関する要件はin vivo使用一般の要件とほぼ同じである。最重要パラメーターは比活性と断片安定性であり、1000を超える活性化指数は追加の有効性をほとんどもたらさない。したがって、253/254がこの用途での推奨断片対となる。相互作用依存性の比活性が最も高いし、断片安定性もほどほどであるし、また活性化指数も十分すぎるからである。しかし253断片の安定性はおそらく、あつらえの断片安定化トリペプチドによってさらに高めることができよう。したがって、腫瘍活性化システムの設定に先立って、まずVRKまたはNNKトリペプチドライブラリーをコードする縮重配列を253発現構築体に切断点システインとリンカーの間でサブクローニングしてもよいかもしれない(図6のpAE1を参照)。次いで、少なくとも 10^4 個のライブラリー形質転換体を400 $\mu\text{g/ml}$ から1000 $\mu\text{g/ml}$ までの逡増アンピシリン上にプレートすることにより253安定化トリペプチドを選択する。253/254は400 $\mu\text{g/ml}$ 上で安定化ペプチドなしでも定量的にプレートするが、野生型TEM-1 ラクタマーゼはこれらの条件で発現させると1000 $\mu\text{g/ml}$ 超ではプレートしないからである。

11a. TEM-1 ラクタマーゼH25-G253(253)およびK254-W288(254)断片の、Her-2/neuヒト乳腫瘍マーカー上の非重複エピトープに対するscFv融合体としての

発現

これらの断片の腫瘍活性化機構にはSchier et al. (Gene (1996) 169: 147)が記載しているような2つのscFvが使用されよう。これはヒト非免疫レパートリー of ファージディスプレイライブラリー (Marks et al., 1991) から、Her-2/neuの細胞外ドメイン(ED)を含む組み換え断片を使用したふるい分けで得られた。これら2つのscFvは非重複エピトープを認識するように見受けられる。というのは、これらはELISA法ではHer-2/neuEDへの結合で競合しないからである。これらのscFvのうち一方の親和性はin vitroでサブナノモルKdへと高められたし(Schier et al., 1996, supra)、他方についても同じ方法で同様の改善を図ることができた (Balint and Larrick, Gene (1993) 137:109)。scFvのコード配列は図11に示すように、ラクタマーゼ および 融合体産生ベクター、p lac およびp lac へとサブクローニングすることになる。これらのベクターはpET26b (Novagen) から得られるが、scFvとラクタマーゼ断片配列の両方を挿入するのに好都合な制限部位をもつ。各融合タンパク質は、lacリプレッサーの制御下に強いファージT7プロモーターから誘導的に発現させる (IPTG)。各一次翻訳産物は、細菌ペリプラズム中への分泌のためのpelBシグナルペプチドおよび固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC; Janknecht et al., Proc Natl Acad Sci (1991) 88: 8972) による浸透圧衝撃抽出物からのワンステップ精製のためのC末端His₆タグを含む。各融合タンパク質の収量は、主に誘導物質濃度と増殖温度の操作により最適化することができる。

【0103】

各scFvは、両融合体として発現させて、どの配置が(1)最大結合親和性を支え、(2)最大酵素活性を支え、また(3)最大収量を支えるかを見極めるようにすることができる。まず、発現を銀染色PAGEの判定基準により最適化することになる。次いで融合タンパク質をIMACで浸透圧衝撃抽出物 (Neu and Heppel, 1965, supra) から精製するのがよいだろう。精製融合タンパク質は、Her-2/neu細胞外ドメイン(ED)の安定化免疫グロブリンドメイン(Ig)に対する固定化組み換え融合体に対する結合性が、ELISA法により抗His₆タグ抗体(Qiagen)を用いて検定されることになる。精製融合タンパク質は次いで、固定化rc-Her-2/neu ED-Ig上

でのラクタマーゼ活性の回復を、色原基質のニトロセフィン($\lambda_{\max}=485 \text{ nm}$; $\epsilon=17,420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; McManus-Munoz and Crowder, 1999, supra)を用いて検定することになろう。固定化BSAは陰性対照として用いられよう。

11b. 固定化組み換え抗原に対する β -lac / β -scFv融合体の結合による特異的ラクタマーゼ活性化の反応速度の決定

ラクタマーゼ活性は、固定化抗原に対する融合タンパク質結合の関数として定量的に求めることができよう。この速度は次に、既存担体、すなわち抗体-ラクタマーゼ接合体と比較してどれだけの活性が腫瘍上に局在化されるかを示す指標としての、同じscFvに融合された原型のラクタマーゼで得られる値と比較されよう。

【0104】

まず、scFv- β -lac断片融合タンパク質の1つで抗原を飽和させるための条件を確立する。マイクロタイタープレートの穴に抗原を塗布し、ELISA信号がプラトーに達するまで逡増量の第1 scFv断片融合体で浸漬していく。このレベルで、すなわち第1融合タンパク質が飽和量に達したところで、逡増量の第2融合タンパク質を加えていく。結合と洗浄が済んだら、過剰量のニトロセフィンとの30分間のインキュベーション後にラクタマーゼ活性を分光定量する。この検定法を3回行えば、 V_{\max} は第2融合体の濃度のほぼ一次関数となるはずである。第2融合体の量が増していくと、 V_{\max} はどこかで頭打ちになるはずである。第2融合体の結合量はELISA法で求めることができるので、断片によって再構成されたラクタマーゼについての相対比活性($k_{\text{cat}}^{\text{rel}}$)を計算することができよう。 K_M は飽和量の抗原、飽和量の第1融合体および限量の第2融合体からなる溶液で推定することができよう。一連の濃度のニトロセフィンを加えて、485 nmでの吸光度の初期変化率を第2融合体濃度の関数として測定する。あとは、標準回帰分析から K_M を計算することになろう。

【0105】

原型のラクタマーゼと比較するには、原型ラクタマーゼの第2 scFvとの融合体を調製することになろう。次いで、その逡増量を、前述のように第1融合体で飽和させた抗原塗布穴に加えていく。この場合もやはり、 V_{\max} は原型ラクタ

マーゼ融合体の量のほぼ一次関数となり、飽和点で頭打ちとなるはずである。各点で、ELISA法で定量される原型ラクタマーゼ融合体の結合量は第2断片融合体の結合量に匹敵するはずであり、また V_{max} 比は原型ラクタマーゼと再構成ラクタマーゼの比活性の比を反映するはずである。比較のために、再構成酵素の K_M を前述の要領で推定するのがよい。TEM-1 253/ 254断片複合体の最大比活性(k_{cat})は原型酵素のそれと近いものになると見込まれる。 K_M もまた同程度であるとすれば、プロドラッグ活性化ピーク時の腫瘍上の活性は在来抗体-ラクタマーゼ融合体の場合の最高100倍になると期待されよう。ちなみに、在来融合体では未結合融合体がプロドラッグの投与を可能にするレベルまで循環系から排除された時点での残存活性はピーク活性の1%以下であろう。

11c. セファロスポリンプロドラッグのscFv依存性 -lac / 活性化によるHer-2/neu発現SKOV3卵巣がん細胞傷害反応速度の決定

次に、固定化抗原上でラクタマーゼ最大比活性を生み出すようなscFv-ラクタマーゼ断片結合の配置について、Her-2/neu抗原を発現するヒト腫瘍細胞の存在下でのラクタマーゼ活性化が試験されることになる。細胞傷害は図5に示す3種類のセファロスポリンプロドラッグのいずれを使用して検定してもよい。断片再構成活性がやはり、ただし今回の場合は腫瘍細胞障害に関して、原型ラクタマーゼ活性と比較されよう。得られる結果は、主要標的化ラクタマーゼの臨床前評価の次の段階となる動物で著しい抗腫瘍効果を示すために必要とされるような用量範囲を示唆するはずである。

【0106】

ヒト卵巣腺がん細胞のSK-OV-3株(ATCC)を、10%ウシ胎仔血清(FCS)を混ぜたDulbecco最小必須培地の6穴組織培養プレートに、1穴当たり 3×10^5 細胞まいて、37℃、10% CO₂条件下で密集増殖させる。両Her-2/neuエピトープの細胞上での可飽和性を求めるには、ニトロセフィンの加水分解後に分光定量される、各scFvに融合された原型ラクタマーゼの逓増量を用いる。次に、断片再構成酵素の V_{max} を、細胞上で、飽和量の両融合体とニトロセフィンを用いて定量する。それは、原型ラクタマーゼの最大活性と固定化組み換え抗原上で観測される V_{max} 比とに基づく予想活性と一致するものと見込まれよう。図5に示す3種類のプロドラッグの

うち任意のものに対する細胞の感受性は、本質的にMarais et al. (Cancer Research (1996) 56:4735)が記載している要領で、飽和条件下の原型 ラクタマーゼ-scFv融合体および / 断片-scFv融合体を用いて、また用いないで、求められよう。プロドラッグは使用直前にDMSOに溶かし、一連の濃度へとDMEN/FCSで希釈する。各穴に1 mlを加え、細胞を一晩インキュベートする。次いで、細胞を洗浄しトリプシン処理して、色素排除試験で生存度を判定する。次に分取量を新しい皿にまく。4日間増殖させた後に、細胞の生存度を、酸不溶性物質の液体シンチレーションカウンティングで決められる $[^3\text{H}]$ チミジンの組み込みによって評価する。結果は未処置対照細胞のパーセンテージで表示する。この場合もまた、ラクタマーゼ断片システムをもつプロドラッグの相対的な細胞傷害性を原型 ラクタマーゼ融合体のそれと、特に二次速度定数(k_{cat}/K_M)が重要であるような低プロドラッグ濃度で比較し、in vivoでTAcEPTの有効性を在来ADEPTに比して高められる余地を示すことができよう。

【0107】

本書で述べた諸々の出版物および特許出願は本発明が関係している分野における当業者の技術水準を示す。それら諸々の出版物および特許出願は、あたかも個別に参照指示により本書に組み込まれる旨を断っているかのごとく、参照指示により本書に組み込まれる。

【0108】

本発明について十二分に説明したいま、本発明には、添付請求項の精神または範囲から逸脱することなく多数の変更や修飾を加えうることが当業者には自明であろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】

相互作用依存性酵素会合(IdEA)の機構。相互作用依存性断片相補は酵素 および 断片を必要とするが、これらの断片は、その末端に融合した異種ドメインの相互作用によって引き合わされる場合に限って再折りたたみにより活性酵素を形成することができる。

【図2】

成熟型TEM-1 ラクタマーゼおよびコード化アミノ酸配列に対応するヌクレオチドコード配列(Sutcliffe, Proc Natl Acad Sci (1978) 75:3737)。プラスミドpBR322 (SYNPBR322)、Genbank登録no. J01749より。残基Asn52/Ser53、Glu63/Glu64、Gln99/Asn100、Pro174/Asn175、Glu197/Leu198、Lys215/Val216、Ala227/Gly228およびGly253/Lys254に および 断片の間の切断点を示す。

【図3】

成熟TEM-1 ラクタマーゼの三次元構造。Jelsch et al. (Proteins Struct Funct (1993) 16:364ff)のX線結晶構造の模式図であり、赤と青のべた塗りリボンはそれぞれ ヘリックスと シートを示す。分子はツードメイン(- および μ)構造を強調するような向きにしてある。活性部位の求核試薬Ser70は棒球モデルで示す。

【図4】

断片相補による ラクタマーゼの相互作用依存性活性化の三次元模式図。AP-1転写アクチベーターのfosおよびjunサブユニットに由来する異種二量体化ヘリックスの相互作用によりTEM-1 197および 198断片が結合すると、両断片は活性コンホメーションの酵素への再折りたたみが可能になる(図3と比較せよ)。

【図5】

いくつかの抗がん剤とそのセファロスポリンプロドラッグの構造。YW-200およびYW-285はDNA結合トリインドールおよびそのセファロスポリンプロドラッグである(Wang et al., 1998; USP 5,843,937)。

【図6】

断片相補による相互作用依存性 ラクタマーゼ活性化のためのTEM-1 ラクタマーゼの 197および 198断片への融合体としての異種タンパク質発現のためのベクターと戦略。ベクターpA01はジシストロン転写産物から 198融合体および遊離型リガンドを発現させるための高コピーpUC119系プラスミドであり、高多重度感染による宿主細胞への定量的導入用のファージとして再利用できる。ベクターpAE1は、pA01ベクターからの発現レベルと同等以上のレベルで 197融合体を発現させるための強いプロモーターを備えた低コピーp15Aレプリコンである。Tripepsはチオレドキシンの活性部位に挿入された12-量体ペプチドである。Tripep

-trxライブラリーはチオレドキシニン末端のランダムトリペプチドであり、介在Gly₄Serリンカーを備える。scFvは一本鎖抗体Fv断片。LC-CH1はH鎖とL鎖第1定常領域から成る抗体断片。VLは抗体L鎖可変領域。lac promはラクトースオペロンプロモーター。SPはシグナルペプチド。(Gly₄Ser)₃はフレキシブル15-量体リンカー。pUC oriとp15A oriはプラスミドの複製起点。fl oriは線状ファージの複製起点。catはクロラムフェニコール耐性遺伝子。m.o.iは感染の多重度。trc promはトリプトファンおよびラクトースオペロンからの融合プロモーター。ttは転写終結因子。kanはカナマイシン耐性遺伝子。塩基対(bp)表示のベクターサイズは相互作用因子を含まない。

【図7】

代表的な一本鎖抗体Fv断片(scFv)とチオレドキシニンを足場とするタンパク質(Trx)との相互作用によるTEM-1ラクタマーゼ断片相補。N末端ラクタマーゼ断片の197()は赤色で示す。C末端断片の198()は青色で示す。TEM-1、チオレドキシニンおよびscFvは公開構造から模式化した。ペプチドとリンカーも描き込んだ。

【図8】

CD40細胞外ドメイン(CD40)とチオレドキシニンを足場とするペプチド(Trx)との相互作用によるTEM-1ラクタマーゼ断片相補。N末端ラクタマーゼ断片の197()は赤色で示す。C末端断片の198()は青色で示す。TEM-1、チオレドキシニンおよびscFvは公開構造から模式化した。ペプチドとリンカーも描き込んだ。

【図9】

相互作用依存性ラクタマーゼ断片相補システムを用いた多重タンパク質-タンパク質相互作用ライブラリー構築のためのベクターとプロトコール。発現配列(ES)、すなわちランダムプライミング法で作製されたcDNAライブラリーをファスミドベクターにサブクローニングし、フレキシブルリンカー(Gly₄Ser)₃を介在させたラクタマーゼおよび断片との融合体として発現させるようにする。これらのベクターはESのC末端でペプチドエピトプタグたとえば12残基Mycタグなどをコードする。ESライブラリーは、抗myc 9E10などのような抗Tag scFvを他方の断片と融合させたものと同時発現させると、Tag-抗Tag相互作用により促進さ

れる ラクタマーゼ活性を指標に選択することができるが、それにはこのES断片の安定した発現が必要となろう。得られたライブラリーは、自律折りたたみドメイン(AFD)の安定エクスペッサーを多く含むようにしてあり、ファージとして再利用し雄性細胞中に同時導入して相互作用AFD対(Multiplex Interaction Library)の選択に用いてもよい。AFDライブラリーはまた、scFvライブラリー、抗体L鎖可変領域ライブラリー(VL)またはチオレドキシン上にディスプレイされるペプチドライブラリー(trx-peptide)と同時導入して、各AFDの結合タンパク質の同時選択(Multiplex Antibody/Peptide Binder Selection)に用いることもできる。他の略語の意味については図6および10の説明を参照。

【図10】

NPTIIの二次構造と溶媒浸漬を予測するためのPredictProteinプログラムの短縮出力(Rost and Sander, 1993, 1994)。第1行は1文字表記のアミノ酸配列を示す。第2および第3行は二次構造予測を示し、Hはヘリカル、Eはストランド、Lはループを表す。第4行は信頼性の度合いを1~10の段階で示し、10が最高である。第5行は溶媒可触度を示し、eは露出、bは埋没を表す。最終行は溶媒可触度の信頼性の度合いを1~10の段階で示し、10が最高である。二次構造が乏しく、露出していて溶媒に浸漬すると予測された10の配列領域を生産的断片化の候補部位として下線で示す。

【図11】

-lac 253および -lac 254のscFvとの融合タンパク質を産生させるための発現ベクター。矢印は翻訳開始部位を示す。T7 promIはファージT7プロモーター。SPはpeIBシグナルペプチド。scFvはVH(抗体H鎖可変領域)、(Gly₄Ser)₃(15-量体フレキシブルリンカー)およびVL(抗体L鎖可変領域)から成る。kanはカナマイシン耐性。His₆は金属イオンアフィニティー精製用のヘキサヒスチジンタグ。lacI^qは高アフィニティーlacオペロンリプレッサー突然変異体。f1 oriはファージ複製起点。

【図1】

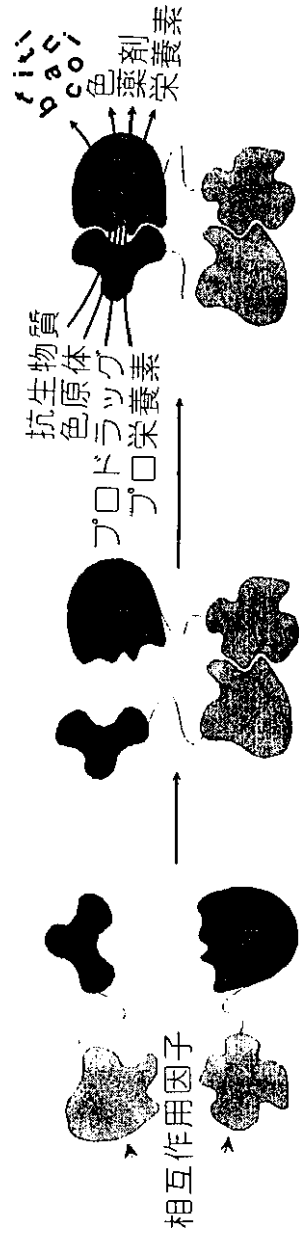


Figure 1

【图2】

```

76  cac cca gaa acg ctg gtg aaa gta aaa gat gct gaa gat cag ttg ggt
26  H  P  E  T  L  V  K  V  K  D  A  E  D  Q  L  G

124 gca cga gtg ggt tac atc gaa ctg gat ctc aac agc ggt aag atc ott
42  A  R  V  G  Y  I  E  L  D  L  N | S  G  K  I  L

172 gag agt ttt cgc ccc gaa gaa cgt ttt cca atg atg agc act ttt aaa
58  E  S  F  R  P  E | E  R  F  P  M  M  S  T  F  K

220 gtt ctg cta tgt ggc gcg gta tta tcc cgt att gac gcc ggg caa gag
74  V  L  L  C  G  A  V  L  S  R  I  D  A  G  Q  E

268 caa ctc ggt cgc cgc ata cac tat tct cag aat gac ttg gtt gag tac
90  Q  L  G  R  R  I  H  Y  S  Q | N  D  L  V  E  Y

316 tca cca gtc aca gaa aag cat ctt acg gat ggc atg aca gta aga gaa
106 S  P  V  T  E  K  H  L  T  D  G  M  T  V  R  E

364 tta tgc agt gct gcc ata acc atg agt gat aac act gcg gcc aac tta
122 L  C  S  A  A  I  T  M  S  D  N  T  A  A  N  L

412 ctt ctg aca acg atc gga gga ccg aag gag cta acc gct ttt ttg cac
138 L  L  T  T  I  G  G  P  K  E  L  T  A  F  L  H

460 aac atg ggg gat cat gta act cgc ctt gat cgt tgg gaa ccg gag ctg
154 N  M  G  D  H  V  T  R  L  D  R  W  E  P  E  L

508 aat gaa gcc ata cca aac gac gag cgt gac acc acg atg cct gta gca
170 N  E  A  I  P | N  D  E  R  D  T  T  M  P  V  A

556 atg gca aca acg ttg cgc aaa cta tta act ggc gaa cta ctt act cta
186 M  A  T  T  L  R  K  L  L  T  G  E | L  L  T  L

604 gct tcc cgg caa caa tta ata gac tgg atg gag gcg gat aaa gtt gca
202 A  S  R  Q  Q  L  I  D  W  M  E  A  D  K | V  A

652 gga cca ctt ctg cgc tcg gcc ctt ccg gct ggc tgg ttt att gct gat
218 G  P  L  L  R  S  A  L  P  A | G  W  F  I  A  D

700 aaa tct gga gcc ggt gag cgt ggg tot cgc ggt atc att gca gca ctg
234 K  S  G  A  G  E  R  G  S  R  G  I  I  A  A  L

748 ggg cca gat ggt aag ccc tcc cgt atc gta gtt atc tac acg acg ggg
250 G  P  D  G | K  P  S  R  I  V  V  I  Y  T  T  G

796 agt cag gca act atg gat gaa cga aat aga cag atc gct gag ata ggt
266 S  Q  A  T  M  D  E  R  N  R  Q  I  A  E  I  G

844 gcc tca ctg att aag cat tgg
282 A  S  L  I  K  H  W

```

Figure 2

【図3】

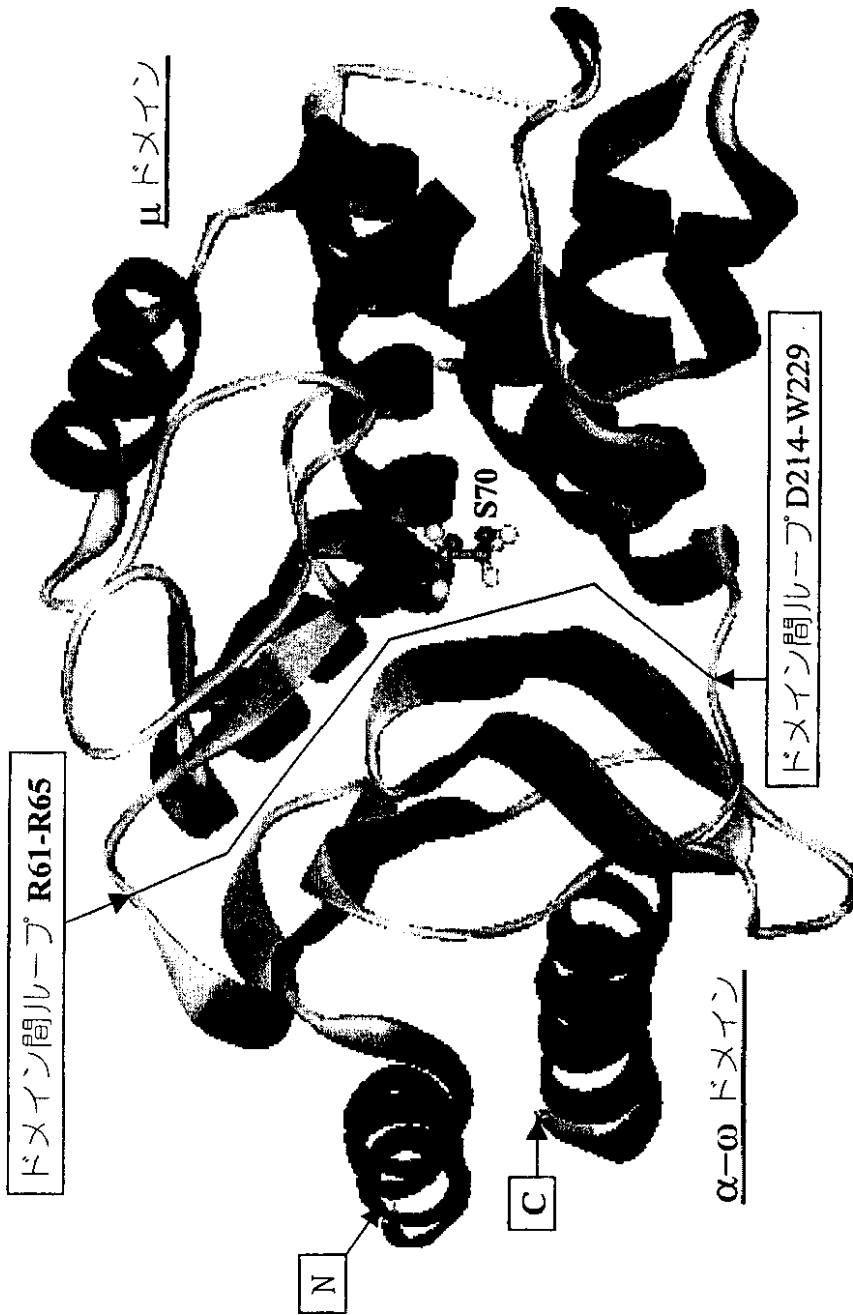


Figure 3

【図4】

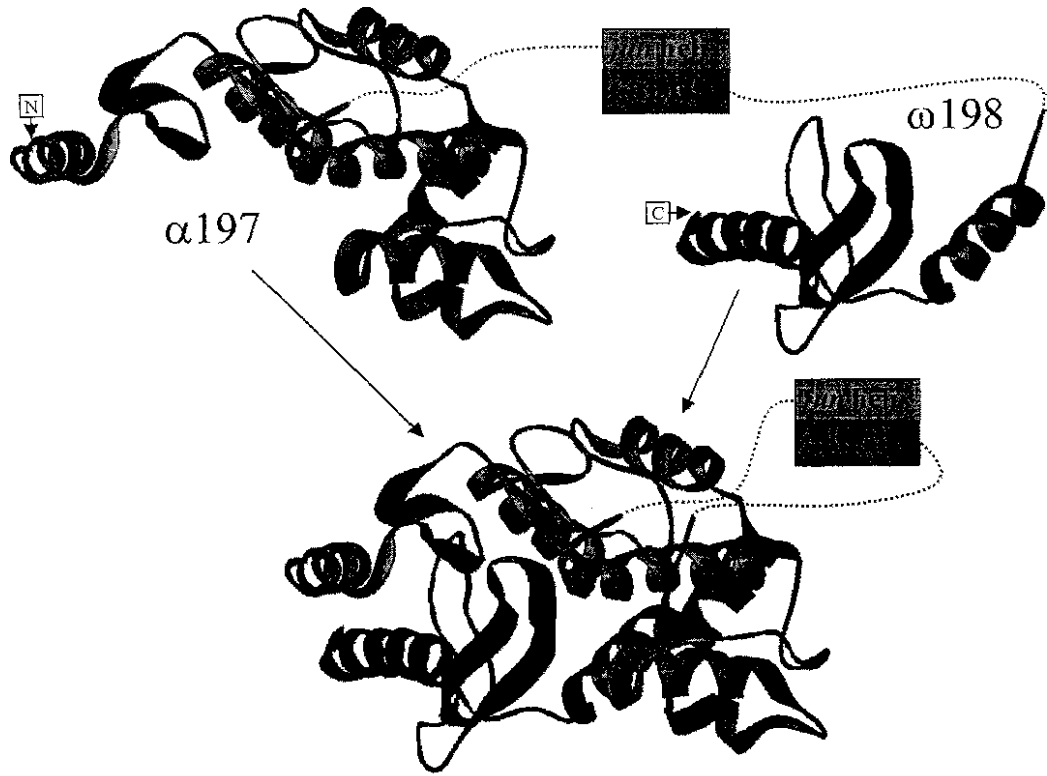
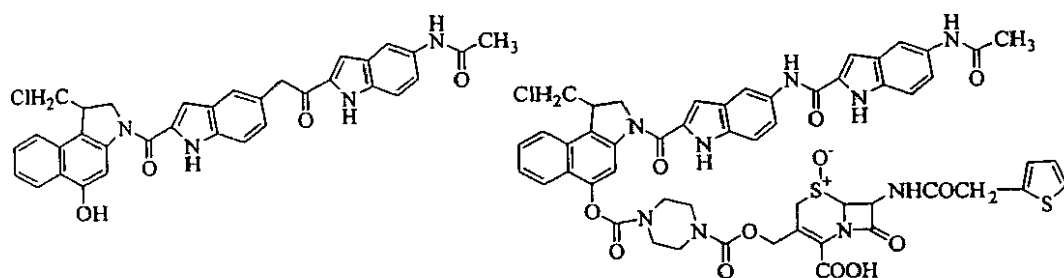


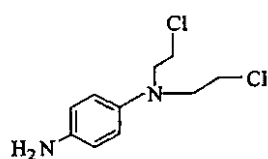
Figure 4

【図5】

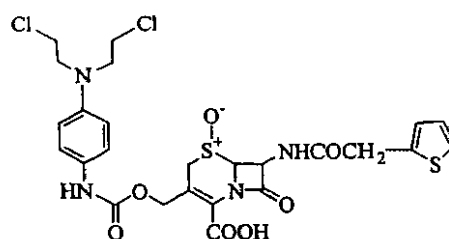


1. YW-200
IC₅₀: 0.01 nM

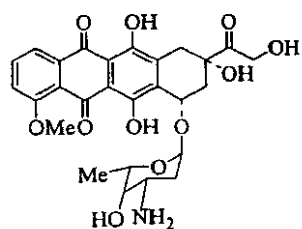
2. YW-285
IC₅₀: 10 nM



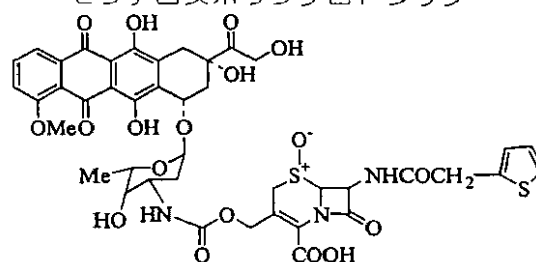
3. アニリンマスタード



4. アニリンマスタード
セファロスポリンプロドラッグ



5. ドキソルピシン



6. ドキソルピシン
セファロスポリンプロドラッグ

Figure 5

【図6】

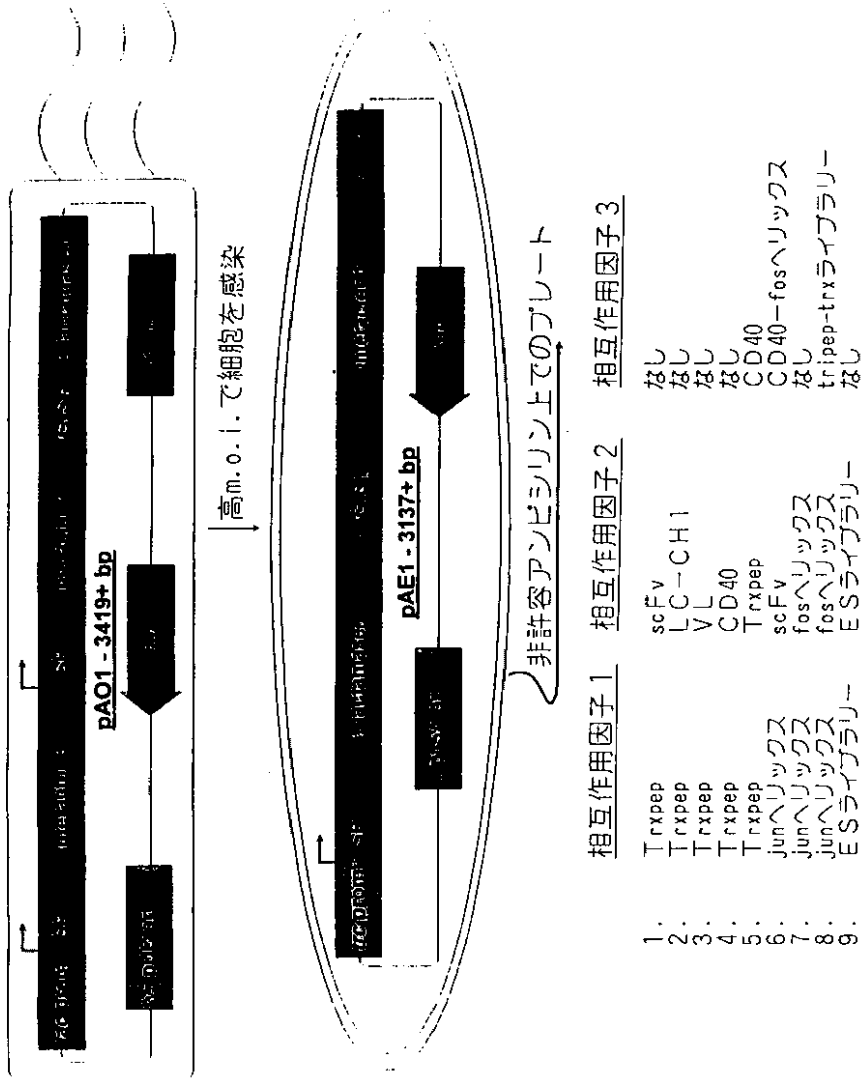


Figure 6

【図7】

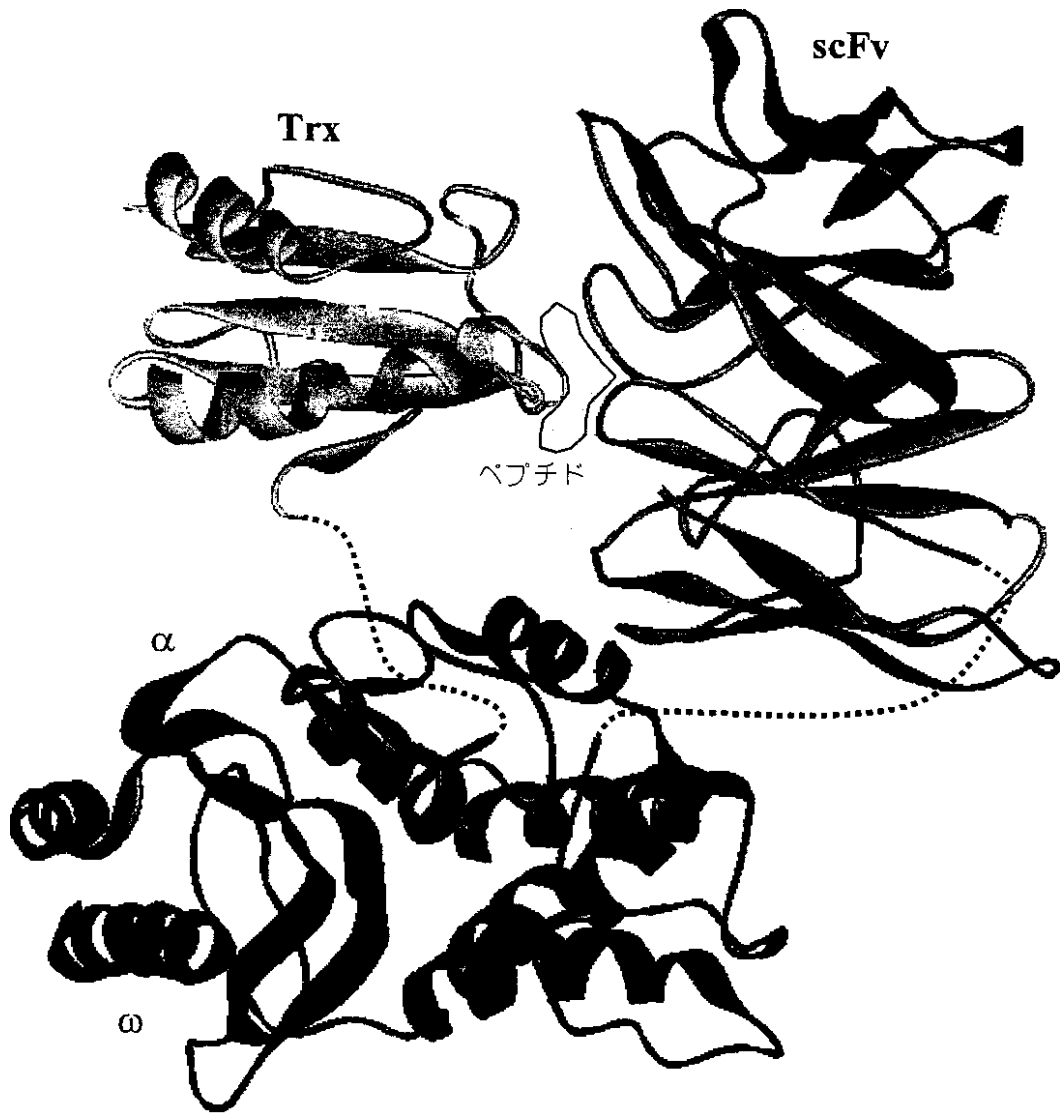


Figure 7

【図8】

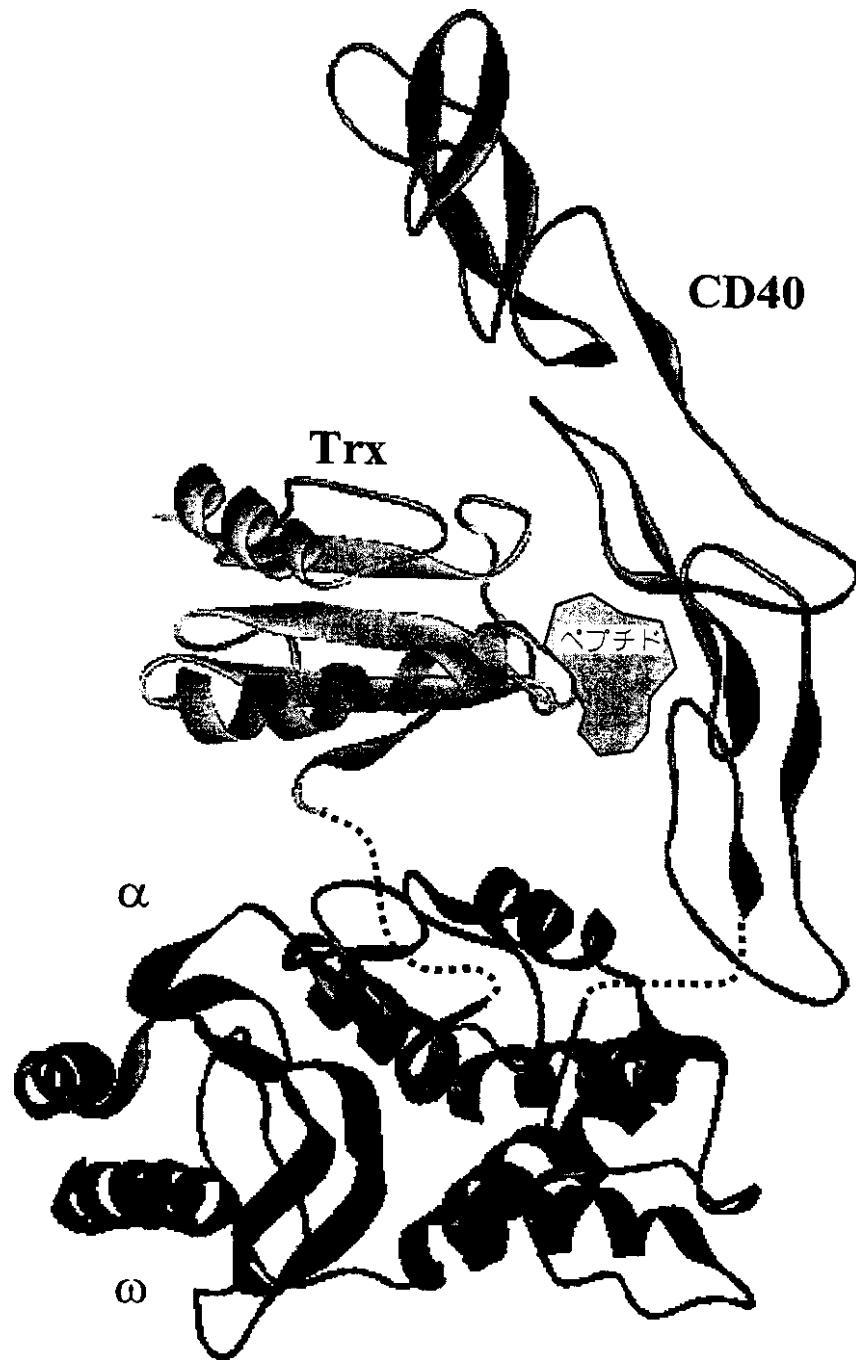


Figure 8

【図9】

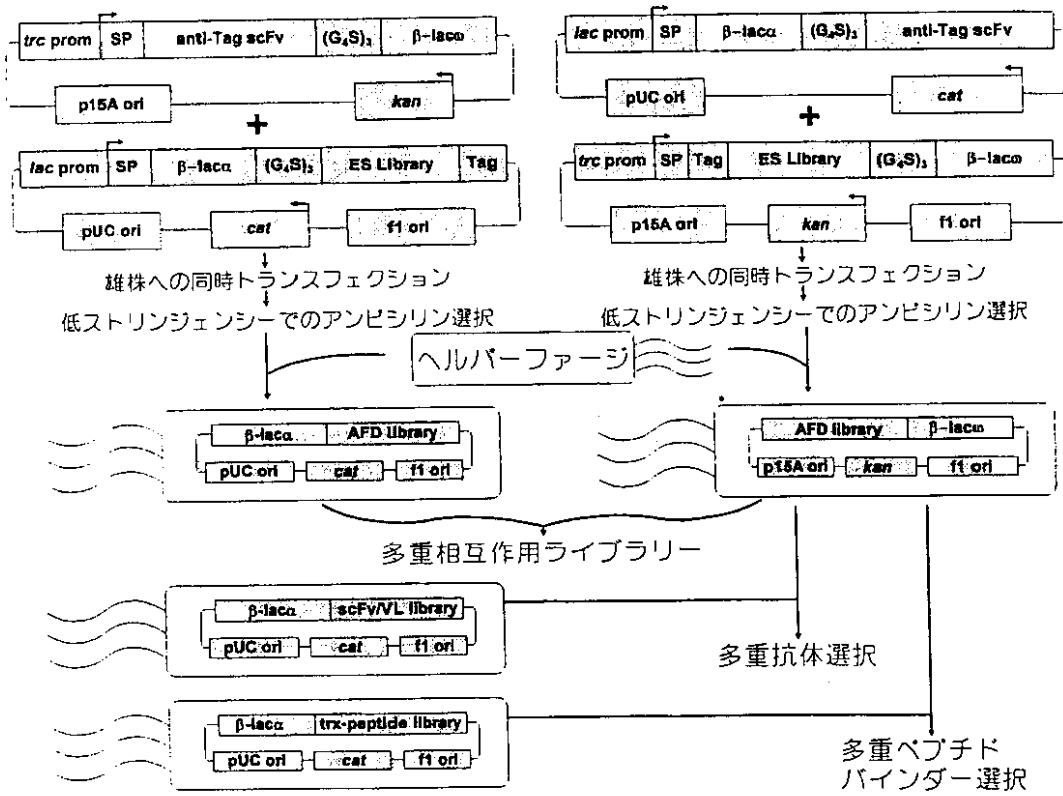


Figure 9

【図10】

```

.....1.....2.....3.....4.....5.....6
AA      |MGSAIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWAQQTIGCSDAAVFRLSAQGRPVLFVKTLDSGAL|
PHD sec |          HHHHHHHH  EEEE  HHHEE  EEEE  |
サブセット: SUB sec |LLL...LLLLLL.HHHHHH.LL...LLLL.H...LL.EEEE.LLLL.|
Rel sec  |987133465669894799999815523221257775463342249993789851777773|
アクセス: P_3 acc |eeebbeeeeeee eeebbeeb eebbeebbbbbbbeeeeeebbbebeeeeee|
10st:    PHD acc |9970067777787579700760673600767706000006069796760006067777|

.....7.....8.....9.....10.....11.....12
AA      |NELQDEAARLSWLATTGVFCAAVLDVVTTEAGRDWLLLGEPGDLLSSHLAPAEKVSIMA|
PHD sec |          HHHHHHHH  EEEE  HHHHHH  HHHHHH  |
サブセット: SUB sec |.HHHHHHHHHHHHHLLL...E...LLLLL...LL.HHHHHHHH|
Rel sec  |327799999999996599872322332122322354310278765424553599999999|
アクセス: P_3 acc |eebeeebe bbbbeeeebbeebbeebbeebbeebbeebbeebbeebbeebbeebbeeb|
10st:    PHD acc |7707760650000077706006006006777600007006077077757777006000|

.....13.....14.....15.....16.....17.....18
AA      |DAMRRLHLDPATCFDHQAKHRIERARTRMEAGLVDQDDLEEHQGLAPAELFARLKAR|
PHD sec |          HHHHHH  HHHHHHHHHHHH  HHH  HHHHHHHHHH  |
サブセット: SUB sec |HHHHH.LLLL.LLLL...HHHHHHHHHHH.LLLLLL...LLLLHHHHHHHHH|
Rel sec  |99999838866468887332899999999715558874221368678999999961|
アクセス: P_3 acc |bbbeebbebeebbeebbeebbeebbeebbeebbeebbb beebbeebbeebbeebbeeb|
10st:    PHD acc |70006007060770007770776077067607700050760776777760760076077|

.....19.....20.....21.....22.....23.....24
AA      |MPDGEDLVVTHGDACLPNIMVENGRFSGFIDCGRLGVADRYQDIALATRDIAEEELGGEWA|
PHD sec |          EEEE  EEE  EEEEE  HHHHHHHHHHHHHHHHHH  HHHH  |
サブセット: SUB sec |LLLLLLEEEE.LLLL.LLLL..E..LL.EEEE.....HHHHHHHHHHHHH.L.HHH|
Rel sec  |89899668862678866315318835788814311234478999999999975284999|
アクセス: P_3 acc |eeeeebbbbbeebbbbbeebbbbbeebbbbbeebbbb bbbb bbbbbeebbeebbeee e|
10st:    PHD acc |677777000000600000006706000000040000050000000066067707736|

.....25.....26.....27.....28.....29.....30
AA      |DRFLVLYGIAAPDSQRIAFYRLLDEFF|
PHD sec |          HHHHHH  HHHHHHHHHHHH  |
サブセット: SUB sec |HHHHHHH.LLLL..HHHHHHHHH.LL|
Rel sec  |999999737998834667579998359|
アクセス: P_3 acc |e bbeebbee eeeebbbbbeeb|
10st:    PHD acc |750066000765777606000006600|

```

Figure 10

【図11】

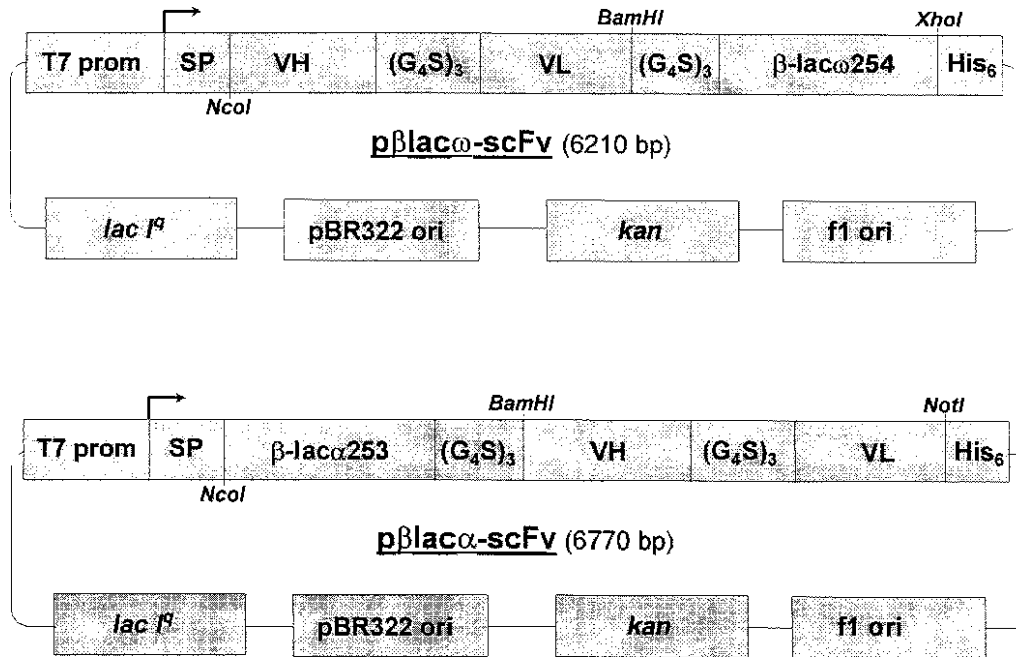


Figure 11

【手続補正書】**【提出日】**平成13年12月28日(2001.12.28)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 タンパク質中の機能的断片を検出する方法において、

マーカートンパク質の断片を、各断片が前記マーカートンパク質の溶媒暴露ループ内に切断点末端を有し各CまたはN末端のNまたはC末端残基がそれぞれ前記切断点末端を構成するように調製して、マーカ断片のライブラリーが得られるようにすること

前記マーカ断片ライブラリーの要素を非常に多数の宿主細胞中で発現させること

機能的に再構成された前記マーカートンパク質をすでに形成している断片対の第1要素と第2要素を含む細胞の指標として前記マーカートンパク質を発現する宿主細胞を単離し、もって前記の機能的断片対が検出されるようにすること

を含む方法。

【請求項2】 機能的に再構成されたマーカートンパク質が直接選択可能なシグナルを与える請求項1記載の方法。

【請求項3】 断片対の第1および第2要素が共にマーカートンパク質の不連続、連続または重複配列の1つを含み、また前記マーカートンパク質の全長の約90~110%を占める請求項1記載の方法。

【請求項4】 第1要素と第2要素がそれぞれさらに、切断点末端から5アミノ酸位置以内にシステイン残基を含み、前記第1要素と第2要素の間にジスルフィド結合が形成されうるようにした請求項1記載の方法。

【請求項5】 システイン残基が切断点末端にある請求項4記載の方法。

【請求項6】 タンパク質が酵素である請求項1記載の方法。

【請求項7】 酵素がラクタマーゼである請求項5記載の方法。

【請求項8】 マーカータンパク質の断片がそれぞれfosまたはjun転写因子との融合タンパク質として発現する請求項1記載の方法。

【請求項9】 第1オリゴペプチドの結合相手である第2オリゴペプチドを検出する方法において、

第1オリゴペプチドとライブラリー要素によってコードされる第2オリゴペプチドとをそれぞれ、マーカータンパク質の断片対の第1要素と第2要素との融合タンパク質として非常に多数の宿主細胞中で同時発現させ、ここで当該マーカータンパク質の当該断片対の当該第1要素と第2要素はそれぞれ当該マーカータンパク質の溶媒暴露ループ内にドメイン内破断点末端を含んで成り、その過程で前記第1オリゴペプチドの前記第2オリゴペプチドへの結合により前記マーカータンパク質が機能的に再構成される結果となるようにすること

すでに相互作用した第1オリゴペプチドと第2オリゴペプチドを含んでいる細胞の指標となる前記マーカータンパク質を発現させる宿主細胞を単離すること

前記融合タンパク質をコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって第1オリゴペプチドの結合相手である第2ペプチドが検出されるようにすること

を含む方法。

【請求項10】 各融合タンパク質がさらにシグナルペプチドを含む請求項9記載の方法。

【請求項11】 シグナルペプチドが細菌細胞のペリプラズムへの転位を導く請求項10記載の方法。

【請求項12】 第1オリゴペプチドと第2オリゴペプチドが細胞外タンパク質である請求項11記載の方法。

【請求項13】 各融合タンパク質がさらに、切断点末端と第1または第2オリゴヌクレオチドの間にフレキシブルポリペプチドリンカーを含む請求項10記載の方法。

【請求項14】 融合タンパク質がさらに、次のもののうち少なくとも1つを含む請求項13記載の方法:

- i) ランダムコード化ペプチドの群から選ばれ、切断点末端とフレキシブルポリペプチドリンカーの間に位置する、アミノ酸数3~12のペプチド
- ii) 切断点末端から5アミノ酸位置以内のシステイン残基、および
- iii) 断片対の要素をコードするヌクレオチド配列の誤りがち(error-prone)の条件下でのPCR増幅によって導入された、再構成マーカートンパク質の折りたたみ安定性を強めるための前記断片対要素内の1~3個のコドン変更、ここで当該1~3個の変更を含む当該断片は前記条件下でランダムコード化断片対の群から選択される。

【請求項15】 チオレドキシンの活性部位内の融合体として発現させたアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドをさらに含む請求項9記載の方法。

【請求項16】 宿主細胞が大腸菌(E. coli)細胞である請求項9記載の方法。

【請求項17】 マーカートンパク質が酵素である請求項9記載の方法。

【請求項18】 酵素がラクタマーゼである請求項17記載の方法。

【請求項19】 第1オリゴペプチドが一本鎖抗体Fv断片、抗体軽鎖可変領域および細胞表面分子から成る群より選択され、また第2オリゴペプチドがチオレドキシンの活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドである請求項9記載の方法。

【請求項20】 細胞表面分子がCD40である請求項19記載の方法。

【請求項21】 リン酸化調節シグナル伝達タンパク質がチロシンキナーゼである請求項19記載の方法。

【請求項22】 C末端ドメイン内切断点をもつN末端断片を含む第1オリゴペプチドとN末端ドメイン内切断点をもつC末端断片を含む第2オリゴペプチドとを含む断片相補システムにおいて、前記N末端断片と前記C末端断片がそれぞれマーカートンパク質に由来し、かつ再び組み立てられて機能的に再構成されたマーカートンパク質を形成するような断片相補システム。

【請求項23】 第1オリゴペプチドと第2オリゴペプチドがそれぞれさらに、切断点から5アミノ酸位置以内にシステイン残基を含む請求項22記載の断片相補システム。

【請求項24】 シス테인残基が切断点にある請求項23記載の方法。

【請求項25】 切断点を介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと融合されたN末端断片と第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび第2相互作用因子ドメインと切断点を介してC末端断片へと融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを含む断片相補システムにおいて、前記N末端断片と前記C末端断片がどちらも直接選択可能なシグナルを備える一マーカートンパク質に由来し、また前記N末端断片と前記C末端断片がそれぞれ当該マーカートンパク質の溶媒暴露ループ内にドメイン内破断点末端を含み、また前記N末端断片と前記C末端断片は前記第1相互作用因子ドメインが前記第2相互作用因子ドメインと結合する場合に限って前記マーカートンパク質を機能的に再構成するような断片相補システム。

【請求項26】 第1および第2オリゴペプチドがさらにシグナルペプチドを含む請求項25記載の断片相補システム。

【請求項27】 N末端およびC末端断片が共にマーカートンパク質の不連続、連続または重複配列の1つを含み、また前記マーカートンパク質の全長の約90～110%を占める請求項25記載の断片相補システム。

【請求項28】 マーカートンパク質の機能的再構成が、第1および第2オリゴペプチド配列の少なくとも1つに、次の修飾のうち少なくとも1つを導入することにより増進される請求項27記載の断片相補システム：

- i) ランダムコード化ペプチドの群から選ばれ、切断点末端とフレキシブルポリペプチドリンカーの間に位置する、アミノ酸数3～12のペプチド
- ii) 別個に発現し、かつチオレドキシンの活性部位内に作動可能に融合されたランダムコード化ペプチドの群から選ばれるアミノ酸数3～12のペプチド
- iii) 断片とフレキシブルポリペプチドリンカーの間にコードされたシス테인残基、または
- iv) 断片をコードするヌクレオチド配列を誤りがちの条件下でPCR増幅することにより導入された、再構成マーカートンパク質のより安定した折りたたみを可能にするための断片分子当たり1～3個のコドン変更、ここで当該1～3個の変更を含む当該断片は前記条件下でランダムコード化断片対の群から選択される。

【請求項29】 直接選択可能なシグナルが明確な表現型変化または抗生物質耐性である請求項25記載の断片相補システム。

【請求項30】 直接選択可能なシグナルを備えるタンパク質が酵素である請求項25記載の断片相補システム。

【請求項31】 第1相互作用因子ドメインが一本鎖抗体Fv断片、抗体軽鎖可変領域および細胞表面分子から成る群より選択され、また第2相互作用因子ドメインがE. coliチオレドキシンまたはリン酸化調節シグナル伝達タンパク質の活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドを含む請求項28記載の断片相補システム。

【請求項32】 細胞表面分子がCD40である請求項31記載の断片相補システム。

【請求項33】 リン酸化調節シグナル伝達タンパク質がチロシンキナーゼである請求項31記載の断片相補システム。

【請求項34】 第1相互作用因子ドメインが第1ライブラリー由来のポリペプチドをコードし、また第2相互作用因子ドメインが第2ライブラリー由来のポリペプチドをコードする請求項25記載の断片相補システム。

【請求項35】 切断点を介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと融合されたラクタマーゼのN末端断片と第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび第2相互作用因子ドメインと切断点を介してラクタマーゼのC末端断片へと融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを含む断片相補システムにおいて、前記N末端断片と前記C末端断片が、前記第1相互作用因子ドメインが前記第2相互作用因子ドメインと結合する場合に前記ラクタマーゼを機能的に再構成するような断片相補システム。

【請求項36】 ラクタマーゼの機能的再構成が、第1および第2オリゴペプチド配列の少なくとも1つに、次の修飾のうち少なくとも1つを導入することにより増進される請求項35記載の断片相補システム：

- i) 断片とフレキシブルポリペプチドリンカーの間にコードされたアミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチド、
- ii) 別個に発現し、かつチオレドキシンのN末端へと作動可能に融合されたア

ミノ酸数3～12のランダムコード化ペプチド、

iii) 断片とフレキシブルポリペプチドリンカーの間にコードされたシステイン残基、または

iv) 断片をコードするヌクレオチド配列を誤りがちの条件下でPCR増幅することにより導入された、再構成ラクタマーゼのより安定した折りたたみを可能にするための断片分子当たり1～3個のコドン変更。

【請求項37】 アミノ酸数3～12のランダムコード化ペプチドがトリペプチドであり、またN末端断片に融合されたトリペプチドがHSE、NGR、GREおよびEK Rから成る群より選択され、かつC末端断片に融合されたトリペプチドがREQ、QGN、DGR、GRRおよびGNSから成る群より選択される請求項36記載の断片相補システム。

【請求項38】 N末端断片またはC末端断片の切断点がN52/S53、E63/E64、Q99/N100、P174/N175、E197/L198、K215/V216、A227/G228およびG253/K254からなる群より選択されるアミノ酸残基間の接合部からいずれかの方向で10残基以内にある請求項36記載の断片相補システム。

【請求項39】 N末端断片またはC末端断片の切断点がアミノ酸残基E197およびL198の接合部からいずれかの方向で10残基以内にある請求項36記載の断片相補システム。

【請求項40】 アミノ酸数3～12のランダムコード化ペプチドがトリペプチドGREを含む請求項39記載の断片相補システム。

【請求項41】 N末端断片が、K55E、P62SおよびM182Tから成る群より選択される少なくとも1つの突然変異を含む請求項35記載の断片相補システム。

【請求項42】 転写方向に作動可能に結合された構成要素として

(i) 宿主細胞内で機能するプロモーター

(ii) ポリペプチド相互作用因子ドメイン

(iii) フレキシブルポリペプチドリンカー、および

(iv) 選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質のC末端断片、ここで当該断片は当該マーカートンパク質の溶媒暴露ループ内にドメイン内破断点末端を含み、ここで当該断片は当該マーカートンパク質の活性を欠き、そして当該C

末端断片が当該マーカートンパク質のN末端断片と結合すると、機能性マーカートンパク質が形成される、
をコードするヌクレオチド配列を含む発現カセット。

【請求項43】 転写方向に作動可能に結合された構成要素として

(i) 宿主細胞内で機能するプロモーター

(ii) 選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質のN末端断片、ここで当該断片は当該マーカートンパク質の溶媒暴露ループ内にドメイン内破断点末端を含み、ここで当該断片は当該マーカートンパク質の活性を欠き、そして当該N末端断片が当該マーカートンパク質のC末端断片と結合すると、機能性マーカートンパク質が形成される、

(iii) フレキシブルポリペプチドリンカー、および

(iv) ポリペプチド相互作用因子ドメイン

をコードするヌクレオチド配列を含む発現カセット。

【請求項44】 シグナルペプチドをコードする配列をさらに含む請求項42または43記載の発現カセット。

【請求項45】 シグナルペプチドが細菌ペリプラズムへの転位を誘導する請求項44記載の発現カセット。

【請求項46】 相互作用因子ドメインが細胞外タンパク質である請求項45記載の発現カセット。

【請求項47】 選択可能な表現型をもたらすマーカートンパク質がラクタマーゼである請求項42または43記載の発現カセット。

【請求項48】 アミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドまたはN末端断片をコードする配列とフレキシブルポリペプチドリンカーをコードする配列との間に作動可能に結合されたシステイン残基のうち少なくとも1つをコードする配列をさらに含む請求項42記載の発現カセット。

【請求項49】 アミノ酸数3~12のランダムコード化ペプチドまたはフレキシブルポリペプチドリンカーをコードする配列とC末端断片をコードする配列との間に作動可能に結合されたシステイン残基のうち少なくとも1つをコードする配列をさらに含む請求項43記載の発現カセット。

【請求項50】 請求項42記載の発現カセットである第1発現カセットおよび請求項43記載のカセットである第2発現カセットを含む宿主細胞。

【請求項51】 免疫グロブリン可変領域に結合するエピトープを検出する方法において、

枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと作動可能に融合されたラクタマーゼのN末端断片とチオレドキシンの活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドから成る第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび一本鎖Fv断片または抗体軽鎖可変領域から成る第2相互作用因子ドメインと枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してラクタマーゼのC末端断片へと作動可能に融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを、宿主細胞中に共に収めたプラスミドから同時発現させ、その過程で前記第1相互作用因子ドメインの前記第2相互作用因子ドメインとの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再構成されるようにすること

アンピシリン耐性の宿主細胞を単離すること、および

前記第1および第2オリゴペプチドをコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって前記免疫グロブリン可変領域に結合する前記エピトープが検出されるようにすること

を含んで成る方法。

【請求項52】 膜貫通タンパク質の細胞外ドメインとポリペプチドの間の相互作用を検出する方法において、

枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと作動可能に融合されたラクタマーゼのN末端断片とチオレドキシンの活性部位に挿入されたランダムコード化ペプチドから成る第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよび膜貫通タンパク質から成る第2相互作用因子ドメインと枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してラクタマーゼのC末端断片へと作動可能に融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを、宿主細胞中に共に収めたプラスミドから個別に発現させ、その過程で前記第1相互作用因子ドメインの前記第2相互

作用因子ドメインとの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再構成されるようにすること

アンピシリン耐性の宿主細胞を単離すること、および

前記第1および第2オリゴペプチドをコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって前記膜貫通タンパク質に結合する前記ポリペプチドが検出されるようにすること

を含んで成る方法。

【請求項53】 膜貫通タンパク質が免疫細胞タンパク質である請求項52記載の方法。

【請求項54】 前記細胞がCD40である請求項53記載の方法。

【請求項55】 試料中のタンパク質-タンパク質相互作用の発生を監視する方法において、

第1細胞ライブラリーの第1オリゴペプチド要素と第2細胞ライブラリーの第2オリゴペプチド要素をそれぞれ、請求項1記載の方法に従ってそれぞれ得られるマーカートンパク質の断片対の第1要素と第2要素との融合タンパク質として宿主細胞中で同時発現させ、その過程で前記第1オリゴペプチドの前記第2オリゴペプチドへの結合の結果として前記マーカートンパク質が機能的に再組み立てされるようにすること

すでに前記マーカートンパク質を機能的に再構成した断片対の第1要素と第2要素を含む細胞の指標となる前記マーカートンパク質を発現する宿主細胞を単離すること、および

前記融合タンパク質をコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって前記タンパク質-タンパク質相互作用が監視されるようにすることを含む方法。

【請求項56】 2つの異なるプロテオーム間のオリゴペプチド相互作用を検出する方法において、

第1細胞ライブラリーの第1オリゴペプチド要素と第2細胞ライブラリーの第2オリゴペプチド要素をそれぞれ、請求項1記載の方法に従ってそれぞれ得られるラクタマーゼの断片対の第1要素と第2要素との融合タンパク質として宿主細胞中

で同時発現させ、その過程で前記第1オリゴペプチドの前記第2オリゴペプチドへの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再組み立てされるようにすること

アンピシリン耐性の宿主細胞を単離すること、および

前記融合タンパク質をコードする発現カセットを収めたプラスミドの配列を決定し、もって2つの異なるプロテオーム間の前記オリゴペプチド相互作用が検出されるようにすること

を含む方法。

【請求項57】 細胞ライブラリーが腫瘍細胞または免疫細胞に由来する請求項55または56記載の方法。

【請求項58】 リン酸化調節細胞シグナル変換器を阻害する化合物のハイスループット検出方法において、

枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してフレキシブルポリペプチドリンカーへと作動可能に融合されたラクタマーゼのN末端断片とリン酸化調節細胞シグナル伝達因子の非リン酸化活性部位を結合する一本鎖Fv断片または抗体軽鎖可変領域から成る第1相互作用因子ドメインとを含む第1オリゴペプチドおよびリン酸化調節細胞シグナル伝達タンパク質から成る第2相互作用因子ドメインと枠内でシステイン残基または安定化トリペプチドを介してラクタマーゼのC末端へと作動可能に融合されたフレキシブルポリペプチドリンカーとを含む第2オリゴペプチドを、宿主細胞中に共に収めたプラスミドから同時発現させ、その過程で前記第1相互作用因子ドメインの前記第2相互作用因子ドメインとの結合の結果として前記ラクタマーゼが機能的に再構成されるようにすること

ラクタマーゼ色原基質の存在下で宿主細胞の色を変える結果となる前記化合物を検出すること

を含んで成る方法。

【請求項59】 リン酸化調節細胞シグナル伝達タンパク質がチロシンキナーゼである請求項58記載の方法。

【請求項60】 チロシンキナーゼがHer-2/neuである請求項59記載の方法

。

【請求項61】 多重遺伝要素の宿主細胞への同時組み込み用の選択のために酵素相補システムを使用する方法において、

i) 抗生物質耐性タンパク質のN末端断片とC末端断片を宿主細胞中で同時発現させ、その過程で前記N末端断片が第1オリゴペプチドをもコードする第1組み換え配列から発現し、また前記C末端断片が第2オリゴペプチドをもコードする第2組み換え配列から発現するようにし、ここで当該第1及び第2オリゴペプチドはそれぞれ遺伝子要素を含み、ここで第1および第2組み換え配列の両方からポリペプチドを発現させる前記細胞が前記抗生物質耐性タンパク質を再構成するに足る量の前記N末端断片および前記C末端断片を産生するようにすること、および

ii) 前記抗生物質に対する耐性をもつ細胞を単離し、かくして多重遺伝子要素の組み込まれた細胞が選択される

を含んで成る酵素相補システム。

【請求項62】 抗腫瘍化合物のラクタム誘導体の活性化を、それを要する宿主において行なうための医薬品の製造のための第1オリゴペプチド及び第2オリゴペプチドを含む断片対の使用であって、当該断片対が、

ラクタマーゼのN末端断片、フレキシブルポリペプチドリンカーおよび腫瘍タンパク質のエピトープに対する第1一本鎖Fv断片を含む第1オリゴペプチドと、前記腫瘍タンパク質の第2非重複エピトープに対する第2一本鎖Fv断片、フレキシブルポリペプチドリンカーおよびラクタマーゼのC末端断片を含む第2オリゴペプチドとを含み、

ここで前記一本鎖Fv断片の前記エピトープへの結合の結果としてラクタマーゼは機能的に再構成され、そして前記抗腫瘍化合物の前記ラクタム誘導体が前記再構成ラクタマーゼにより活性化される、

使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

ヒト非免疫抗体レパートリーに由来するscFvをコンセンサプライマーミックス使用のPCRで増幅し(Marks et al., Eur J Immunol (1991) 21:985)、pUC119系ファスミドベクター(pA01; 図6参照)にサブクローニングし(Sambrook et al., supra)、介在(Gly₄Ser)₃リンカーを介した 198断片N末端への融合体としてscFvを発現させるようにした。N末端シグナルペプチドを用意して、細菌ペリプラズムへの転位を図るようにした。市販のtrxpepライブラリーを入手し、E. coliチオレドキシンのNおよびC末端に対し特異的なプライマーを使用してPCR増幅した(Genbank登録no. M54881)。p15Aレプリコン(Rose, Nuc Acids Res (1988) 16:355)にこの産物をサブクローニングし、trp-lac融合プロモーターから 197断片C末端への融合体として発現させるようにした(pAE1; 図6参照)。この場合もまた、N末端シグナルペプチドを用意して、ペリプラズムへの転位を図るようにした。図7は、scFvとtrxpepの相互作用に依存した 197と 198の相補によるTEM-1の活性化を示している。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

これらの結果はいくつかの重要な意味をもつ。第1に、偽陽性率が非常に低くなり、酵母ツーハイブリッドシステムなどのような他の細胞内相互作用センサーの場合の報告値を大幅に下回った(Bartel et al., 1993, supra; Bartel et al., 1996, supra)。この特性はハイスループット用途ではきわめて重要である。第2に、すべての機能的scFvに対応するtrxpepが回収されるため、scFvに関する偽陰性率が非常に低くなった。これもまたハイスループット用途ではきわめて重要である。すべてのscFvでミモトープが回収されるという事実は、このシステムをscFvのハイスループット多重エピトープマッピングに使用することを可能にする。最後に、このシステムは多様な2タンパク質集合間の多様な相互作用物質の同

時的、効率的回収を可能にする。結局、このシステムの高効率、すなわち低偽陽性率と低偽陰性率からすれば、システムの処理能力を制限するものは相互作用ライブラリーのサイズおよび/または手際よく扱える同時形質転換体の数だけであろう。たとえばscFv、trxpepまたはcDNAでは $10^9 \sim 10^{10}$ 単位の組み換えタンパク質ライブラリーの構築がごく普通に可能である(Hoogenboom et al., Immunotech (1998) 4:1)。任意の2つのこうしたライブラリーを対象にした組み合わせ対単位相互作用トラッピングには少なくとも $10^{18} \sim 10^{20}$ クローンが必要となるが、定量的ファスミド感染法(Sambrook et al., 1989, supra)や自動発酵プレートイング法を用いれば、この程度の処理能力は現実的に実現可能であろう。

実施例2

197と 198の相互作用依存性相補による ラクタマーゼ活性化:

抗体L鎖V領域(VL)とtrxpepの相互作用

この実施例では、VLプラス第1H鎖定常領域を含むFd断片にジスルフィド結合された完全長L鎖から成るFabなどのような、より大きな抗体断片にも対応しうるこのシステムの能力を例示する。ヒト・レパートリーライブラリーに由来するFabのサブセットをpA01ベクターにサブクロニングしlacプロモーター由来のジシストロン転写産物からC末端 198融合体として発現させるようにした(図6参照)。第1シストロンはペリプラズムへの転位のためのシグナルペプチドをもつL鎖をコードしていた。L鎖終止コドンには短いスペーサー配列が、次いでFd断片のシグナルペプチドに対応する翻訳開始点から約10 bp上流のリボソーム結合部位が続き、さらに次いで介在(Gly₄Ser)₃リンカーをもつ 198が続いた。次にE. coli株DH5 およびTG1を用いてこの構築体をpAE1ベクター内の 197-trxpepライブラリーと同時発現させた。L鎖とペリプラズム内のFd- 198融合タンパク質との自然会合が機能的Fab断片を生成させるものと期待された。次いで、これが 197-trxpep融合体上のペプチドと結合することにより、宿主細胞に選択可能なアンピシリン耐性を付与するに足る量の機能的TEM-1 ラクタマーゼの組み立てを助長するものと期待された。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

^a +、++、+++、++++は25、50、100、600 µg/mlアンピシリン上での>10%プレートの効率は

以上の結果は、サイズが~12 kDaにすぎないL鎖V領域だけが、断片相補によるラクタマーゼの抗原依存性活性化に好都合なハイアフィニティー結合分子を作りうることを示している。これを検定するために、いくつかの被選択LC-CH1に由来するVLをサブクローニングして198に対するC末端融合体としてだけ発現させるようにした。各VLをそのパートナーの197-trxpepと同時発現させると、約3分の1のVLが親LC-CH1並みの選択可能なアンピシリン耐性を付与した。

実施例3

197と198の相互作用依存性相補によるラクタマーゼ活性化:

CD40とtrxpepの相互作用

この実施例では、目的とする任意のタンパク質に結合し、またタンパク質上の相互作用表面のマッピングに使用しうるうえに相同性による新リガンドの同定にも役立つようなtrxpep群を単離するこのシステムの能力を例示する。ヒトB細胞活性化抗原CD40の細胞外ドメインはE. coliペリプラズム内で確実に発現することが知られている(Noelle et al., Immunol Today (1992) 13:431; Bajorath and Aruffo, Proteins: Struct, Funct, Genet (1997) 27:59)。T細胞表面分子のCD40リガンド(CD40L)はCD40へと連結することによりB細胞のコアクチベーターとして機能することが知られているが、他のリガンドも存在するかもしれない。そこで、TEM-1 197/198断片相補を利用して一群のCD40結合trxpepを選択し、次いでこれらのペプチドの配列について既知リガンドや他の潜在的リガンドとの相同性を調べることにした。成熟型細胞外ドメイン(CD40ED)のコード配列を、この成熟タンパク質のN末端および~190残基細胞外ドメインのC末端と相同のプライマーを使用するPCRによって増幅した(Genbank登録no.X60592)。次いでpA01ファスミドベクターにPCR産物をサブクローニングし(図6参照)、介在(Gly₄Ser)₃

リンカーを介したTEM-1 198断片との融合体としてlacプロモーターから発現させるようにした。正しい産物の発現をPAGEで確認し、次いでCD40融合ベクターをファージとして再利用し、前述と同じtrxpepライブラリー構築体を入れたTG1細胞に導入した。カナマイシン上とクロラムフェニコール上の二重選択により約 10^7 個の同時形質転換体が収集されたので、それを次に25 μ g/mlアンピシリン上にプレートした。図8は 197と 198のtrxpep- CD40相互作用依存性相補によるTEM-1の活性化の模式図である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International Application No. PCT/US 00/07108
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C12N15/10	C12N15/62	C12N15/70	C12N9/02	C12N9/38	
	C07K14/705	C07K16/00	C12Q1/02	C12Q1/68	G01N33/68	
	G01N33/50					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
B. FIELDS SEARCHED						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)						
IPC 7	C12N	C07K	C12Q	G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CAB Data						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	WO 98 44350 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 8 October 1998 (1998-10-08) cited in the application page 11, line 21 - line 25 page 14, line 12 - line 18 page 22, line 6 --- -/--					1,6,7,9, 16-18, 22,25, 27,30, 34,35, 42,43, 47,55
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.						
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents :						
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "B" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report		
2 November 2000				15/11/2000		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016				Authorized officer Hornig, H		

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/US 00/07108

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROSSI F ET AL: "MONITORING PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN INTACT EUKARYOTIC CELLS BY BETA-GALACTOSIDASE COMPLEMENTATION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, vol. 94, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 8405-8410, XP002064565 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1,6,9, 16,17, 22,25, 42,43,55
X	WO 98 34120 A (PELLETIER JOELLE NINA ;REMY INGRID (CA); UNIV MONTREAL (CA); MICHN) 6 August 1998 (1998-08-06) cited in the application the whole document	1,6,9, 16,17, 22,25, 42,43,55
X	PELLETIER JOELLE ET AL: "Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 21, 13 October 1998 (1998-10-13), pages 12141-12146, XP002151867 Oct. 13, 1998 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,6,9, 16,17, 22,25, 42,43,55
X	PELLETIER J N ET AL: "A PROTEIN COMPLEMENTATION ASSAY FOR DETECTION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN VIVO" PROTEIN ENGINEERING, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 10, no. SUPPL. 01, 1997, page 89 XP002064563 ISSN: 0269-2139 the whole document	1,6,9, 16,17, 22,25, 42,43,55
X	WO 95 29195 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 2 November 1995 (1995-11-02) cited in the application the whole document	1,9,16, 22,42, 43,55

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/07108

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHANSSON N ET AL: "SPLIT UBIQUITIN AS A SENSOR OF PROTEIN INTERACTIONS INV VIVO" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, vol. 91, 1 October 1994 (1994-10-01), pages 10340-10344, XP002064564 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,9,16, 22,42, 43,55
X	KARIMOVA ET AL: "A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, vol. 95, May 1998 (1998-05), pages 5752-5756, XP002100623 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1,6,9, 16,17, 22,42, 43,55
P,X	WO 99 28746 A (LADANT DANIEL ;ULLMANN AGNES (FR); KARIMOVA GOUZEL (FR); PASTEUR I) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document	1,6,9, 16,17, 22,42, 43,55
P,X	WO 00 07038 A (PELLETIER JOELLE NINA ;REMY INGRID (CA); UNIV MONTREAL (CA); MICHN) 10 February 2000 (2000-02-10) the whole document	1,6,9, 16,17, 22,25, 42,43,55
A	KREBBER ANKE ET AL: "Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 201, no. 1, 1997, pages 35-55, XP002151868 ISSN: 0022-1759 the whole document	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No PCT/US 00/07108

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KREBBER CLAUS ET AL: "Selectively-infective phage (SIP): A mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 268, no. 3, 1997, pages 607-618, XP002151869 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 96 30540 A (TSIEN ROGER Y ;UNIV CALIFORNIA (US); ZLOKARNIK GREGOR (US)) 3 October 1996 (1996-10-03) the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/07108

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9844350	A	08-10-1998	EP 0980524 A	23-02-2000
WO 9834120	A	06-08-1998	CA 2196496 A AU 5850598 A EP 0966685 A	31-07-1998 25-08-1998 29-12-1999
WO 9529195	A	02-11-1995	US 5503977 A US 5585245 A AU 2288595 A	02-04-1996 17-12-1996 16-11-1995
WO 9928746	A	10-06-1999	EP 1036323 A	20-09-2000
WO 0007038	A	10-02-2000	AU 5143099 A EP 1027608 A	21-02-2000 16-08-2000
WO 9630540	A	03-10-1996	US 5741657 A AU 723164 B AU 5526696 A CA 2215310 A CN 1184479 A EP 0817785 A EP 0982398 A JP 11502714 T	21-04-1998 17-08-2000 16-10-1996 03-10-1996 10-06-1998 14-01-1998 01-03-2000 09-03-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	1/48	Z
	1/34	G 0 1 N	33/15	Z
	1/48		33/50	Z
G 0 1 N	33/15	C 1 2 N	15/00	Z N A
	33/50		5/00	A

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W
) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U ,
 T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z ,
 B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C
 R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S
 , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U ,
 I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K
 R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V
 , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O ,
 N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S
 I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A
 , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36

4B024 AA01 AA11 BA11 CA03 CA04
 CA07 DA01 DA03 DA06 EA02
 EA04 GA13 GA14 HA01 HA11
 HA17
 4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ08 QQ36
 QR07 QR10 QR48 QR56 QR58
 QR68 QS03 QS05 QS38
 4B065 AA26X AA88X AA93X AA93Y
 AB01 AC10 BA02 BA03 BA05
 CA24 CA44 CA46

【要約の続き】

よび抗組織抗体に対応する抗原の迅速な検出、(7)抗体
 に対応するエピトープの迅速な検出、(8)任意のタンパ
 ク質-タンパク質相互作用の阻害物質の高性能選択のため
 の細胞系スクリーンなどである。

专利名称(译)	交互活化蛋白质		
公开(公告)号	JP2003500051A	公开(公告)日	2003-01-07
申请号	JP2000620079	申请日	2000-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	全景研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	全景研究, Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	バリントロバートエフ ハーゲンホーン		
发明人	バリント,ロバート エフ. ハー,ジェン-ホーン		
IPC分类号	G01N33/50 C07K16/28 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C12N15/00 C12N15/10 C12Q1/02 C12Q1/34 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6842 C07K16/2878 C07K16/32 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/00 C12N9/0036 C12N15/1055 G01N33/535 G01N33/6803 G01N2333/986		
FI分类号	C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/34 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15 /00.ZNA C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024 /CA07 4B024/DA01 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/GA14 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063 /QQ36 4B063/QR07 4B063/QR10 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR68 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS38 4B065/AA26X 4B065/AA88X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC10 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA05 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46		
优先权	60/135926 1999-05-25 US 60/175968 2000-01-13 US		
其他公开文献	JP2003500051A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

异源多肽或其他多肽, 其中A类β内酰胺酶 (E. coli TEM-1) 片段对将其功能重新组装成亲本蛋白, 该亲本蛋白通过基因或化学方法与片段对的断点末端连接。被公开为依赖于分子之间的相互作用。进一步提供了一种检测片段对的方法, 该片段对被最佳地组装成亲本功能蛋白。含有分子相互作用依赖性酶的片段对用于 (1) 具有两个或多个独立结合位点的任何样品的均相测定和生物传感器, (2) 癌症, 慢性炎症, 动脉粥样硬化动脉。组织定位的治疗和成像试剂的体内活化, 用于早期发现和治疗硬化症, 淀粉样变性病, 感染, 移植排斥和其他病理, (3) 目标途径激动剂/拮抗剂 基于细胞的传感器, 可检测代谢或信号转导途径的激活或抑制, 从而高效, 高效地筛选 (4) 细胞, 组织和病原体蛋白质组内和之间的高成对蛋白质-蛋白质相互作用 性能图谱分析, (5) 快速选择与目标蛋白特异性结合的抗体片段或其他结合蛋白, (6) 快速选择与抗细胞和抗组织抗体相对应的抗原 出, 对应于抗体 (7) 的表位的快速检测, (8) 的任何蛋白质 - 等的细胞系用于筛选高选择蛋白相互作用的抑制剂。