

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4730804号

(P4730804)

(45) 発行日 平成23年7月20日(2011.7.20)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 5 E

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 37/00 1 0 2

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 F

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 11 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-558013 (P2001-558013)

(86) (22) 出願日 平成13年1月31日(2001.1.31)

(65) 公表番号 特表2003-521922 (P2003-521922A)

(43) 公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)

(86) 国際出願番号 PCT/GB2001/000395

(87) 国際公開番号 W02001/057198

(87) 国際公開日 平成13年8月9日(2001.8.9)

審査請求日 平成20年1月29日(2008.1.29)

(31) 優先権主張番号 0002215.2

(32) 優先日 平成12年1月31日(2000.1.31)

(33) 優先権主張国 英国(GB)

(31) 優先権主張番号 60/196,490

(32) 優先日 平成12年4月12日(2000.4.12)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501385112

センス・プロテオミック・リミテッド

イギリス国、オーエックス5・1ピーエフ

、オックスフォードシャー、オックスフォ

ード、ヤーントン、サンディー・レイン、

ベグブローク・サイエンス・パーク(番地

なし)

Begbroke Science Pa

rk, Sandy Lane, Yarn

ton, Oxford, Oxfordshi

re, OX5 1PF, U.K.

(74) 代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74) 代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 各々のタンパク質がN末端又はC末端の何れかにおいてマーカー部分によりタグ付加されたタンパク質をコードする複数のcDNA分子を提供すること；

(b) 個々のタグ付加されたタンパク質を、空間的に分離されたフォーマットで発現させること；

(c) 各々のタグ付加されたタンパク質を、空間的に規定されたフォーマットで精製、固定して、タンパク質アレイを固体支持体上に作成し、ここで、前記精製および固定の両方においてタグと固体支持体との間の特異的な相互作用を使用すること  
を備えたタンパク質アレイを作成する方法。

【請求項2】

前記マーカー部分が、

(a) ヘキサヒスチジンタグ；

(b) 完全なタンパク質又はタンパク質ドメイン；

(c) 抗体のエピトープ；

(d) ビオチン類似物；および

(e) マルトース結合タンパク質ドメイン

からなる群より選択されるペプチド配列である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記マーカー部分が、翻訳後修飾されている、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項4】**

前記翻訳後修飾が、ビオチンまたは脂質分子の付加を含む、請求項3に記載の方法。

**【請求項5】**

前記タグ付加されたタンパク質が、正しく折り畳まれ、機能を維持している、請求項1～4の何れか1項に記載の方法。

**【請求項6】**

前記タグ付加されたタンパク質が、完全長である、請求項1～5の何れか1項に記載の方法。

**【請求項7】**

タグ付加されたタンパク質をコードする前記cDNA分子が、前記1以上のDNA分子に存在する開始コドンの直後または停止コドンの直前の何れかに、マーカー部分をコードする追加の公知のDNA配列を挿入することを含む、以下の工程を備えた方法により作成される、請求項1～6の何れか1項に記載の方法：

(a) 前記1以上のDNA分子から入れ子状態の欠失物のセットを作成する工程；

(b) 入れ子状態の欠失物のセットに、オリゴヌクレオチドの第一または第二のセットをアニーリングし、ライゲートする工程；ここで、

(i) 3つの可能な停止コドンの一または複数の配列または相補配列は、オリゴヌクレオチドの第一のセットの混合物の中に提示され、

(ii) 3つの主要な開始コドンの一または複数の配列または相補配列は、オリゴヌクレオチドの第二のセットの混合物の中に提示され、

(c) オリゴヌクレオチドの第一または第二のセットに相補的になるように選択されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いたプライマー伸張反応により、ライゲート産物を特異的に増幅する工程。

**【請求項8】**

請求項1～6の何れか1項に記載の方法であって、1以上のテスト化合物を、前記タンパク質アレイと接触させる工程と、前記アレイ中の前記タンパク質への前記1以上の化合物の結合を測定し、これにより前記1以上の化合物を生物学的活性についてスクリーニングする工程とを更に備えた方法。

**【請求項9】**

請求項1～6の何れか1項に記載の方法であって、1以上のタンパク質、例えば、細胞表面受容体を、前記タンパク質アレイと接触させる工程と、前記1以上の特異的なタンパク質の、前記アレイの前記タンパク質との結合を測定し、これにより1以上のタンパク質を特異的なタンパク質－タンパク質相互作用についてスクリーニングする工程とを更に備えた方法。

**【請求項10】**

請求項1～6の何れか1項に記載の方法であって、1以上の核酸プローブを、前記タンパク質アレイと接触させる工程と、前記プローブの、前記アレイ中の前記タンパク質への結合を測定し、これにより1以上のタンパク質を特異的なタンパク質－核酸相互作用についてスクリーニングする工程とを更に備えた方法。

**【請求項11】**

請求項1～6の何れか1項に記載の方法であって、前記タンパク質アレイ中の1以上のタンパク質が抗体ライブラリー中の少なくとも1つの抗体に結合するように、前記タンパク質アレイを、抗体ライブラリーと接触させる工程と、結合していない全ての抗体を除去する工程と；前記タンパク質アレイ中のタンパク質に結合した抗体を固定化し、これにより抗体アレイを作成する工程とを更に備えた方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、タンパク質発現アレイを作成する新規方法、及び迅速なスクリーニングにおけるこのようなアレイの使用に関する。

**【0002】**

ゲノムマッピング計画は、治療の標的を発見するプロセスとそれを用いた薬物を発見するプロセスとに革命を与えている。新規な治療の標的が同定されると、既存の化学物質ライブラリー及びコンビナトリアル化学物質ライブラリーの高速大量スクリーニングによって、これらの標的に対して活性な多くのリード化合物の候補が提示されるであろう。初期の臨床検査においてでさえ、全てのリード化合物を追求するのが不経済であることは明確であろう。しかしながら、今のところ、生物中に存在する全てのタンパク質に対する、それらが有し得る活性のプロフィールに関してこのようなリード化合物を評価するための迅速な方法は存在しない。もし利用できるのであれば、このような方法は、全てのリード化合物が有し得る毒性学的プロフィールを、初期の段階で評価することを可能とし、この情報によって、何れの化合物を追跡し、何れの化合物を除外すべきかを決定するプロセスが著しく促進されるであろう。

#### 【0003】

製薬業界には、既存の薬物（既に市場に出回っているものとまだ開発中のものの両者）の標的を全て同定して、これにより、それらの作用機序を決定したいという補完的な需要が存在する。規制当局は、現在、作用機序についての知識が極めて重要であると考えていることが益々明らかとなっているので、このような情報が得られれば、新規薬物に対する規制当局の承認を得る工程が大幅に容易となるであろう。さらに、この種の情報によれば、改良された第2世代の薬物をデザインすることが可能となろう。これは、薬物の多くは、おそらくは薬物又はその代謝物が望ましくない標的に結合することによって生じる副作用を少なくとも僅かには有しているためである。改良された薬物をデザインするために必要な基準を確定するためには、これらの標的タンパク質が全て同定される必要がある。しかしながら、現在ところ、この情報を得るための簡易な方法は存在せず、単に作用の標的が分からないために、多くの何百万ドルもの薬物候補が不成功により断念している。

#### 【0004】

タンパク質-タンパク質相互作用は、内的ストレスと外的ストレスの両者に対する細胞応答を支配する上で、極めて重要であると益々認識されるようになっている。それ故、特異的なタンパク質-タンパク質相互作用は、感染症やその他の病状における薬物を介した処置に対する標的の候補となる。現在のところ、酵母ツーハイブリッドアッセイが、タンパク質-タンパク質相互作用を評価するための唯一の信頼できる方法であるが、この種のインビボアッセイは、非高速大量フォーマットにおいてでさえ、タンパク質-タンパク質相互作用の特異的なアゴニスト又はアンタゴニストの同定には、余り適さないであろう。機能的プロテオーム発現アレイ、すなわち「プロテオームチップ」によれば、タンパク質-タンパク質相互作用の特異性、及び任意の薬物を介した効果の特異性をインビトロフォーマットで決定することが可能となるであろう。それ故、この研究分野に革命を与えるために、プロテオームアレイは莫大な可能性を有しているといえるだろう。

#### 【0005】

機能的プロテオームアレイを作成し得る1つの方法は、特定のプロテオーム中に発現されている全てのタンパク質を各別にクローニングし、発現し、精製し、固定化することである。しかしながら、ゲノム全体の配列データの利用可能性についての考慮とともに、まず考慮すべき重要な事柄は、目的とするゲノムの絶対的なサイズである。これらの点について説明すると、典型的な細菌のゲノムは約5 Mbpであり、今のところ、完全に配列が決定されたのは少数であり（例えば、*Helicobacter pylori*、*Escherichia coli*、及び*Mycobacterium tuberculosis*）、真菌のゲノムは典型的には約40 Mbp、哺乳類のゲノムは3 Gbpであり、植物のゲノムは約10 Gbpである。現在、ヒトゲノムの配列決定は2003年頃に完結すると推測されているが、この情報のうちの程度が公共的なドメインに置かれるかは、大いに疑問とされねばならない。明らかに、代表的なモデル生物以外の全てのゲノムが、現実的な時間枠内に入手できるようになると予想するのは完全に非現実的であり、機能的なプロテオミクスの展望から、モデル動物の価値は限られたものである。それ故、原理的には、この4年以内に、ヒトゲノム中の約10万の各遺伝子をcDNAライブラリーからクロ

ーニングするためのプライマーをデザインし、合成することが可能となるかもしれないが、実際には、たとえ必要な配列データが入手できるとしても、これは極めて費用がかかり（プライマーの費用だけで、数百万ドルにのぼるであろう）、且つ著しく手間のかかる工程となろう。

#### 【0006】

しかし、完全な配列データが得られないであろう製薬に適した生物はどうなるのであろうか？ 機能的プロテオミクスからこれらを全く無視することはできないとして、何が代替物となるのであろうか。発現cDNAライブラリーは、原理的には、タンパク質のアレイを作成するために非特異的な固定化とともに使用することができるが、非特異的な固定化は、通常、タンパク質の折り畳みが破壊されるために、機能の喪失を伴うという事実によって、この技術は、著しく制限される。さらに、宿主の細胞タンパク質が固定化されると、少なくともS/N比が顕著に減少し、最悪の場合には、明確な結果が得られなくなってしまう。それ故、各タンパク質が特異的に固定化され、機能に影響を与えることなく、且つ全ゲノム配列についての知識を要せずに、共通のモチーフ又はタグを介して精製される機能的プロテオームアレイを作ることができれば、機能的プロテオミクスの分野に莫大な進歩を与えるであろう。

#### 【0007】

本発明者らは、対応する遺伝子のDNA配列を予め知ることを必要とせずに、プロテオーム中の各タンパク質内の所定位置に共通のマーカを付加させ得る方法を提供することによって、上記の課題を解決する新規アプローチを開発するに至った。この「タグ」は、続いて、その後の固定化及び精製操作に対して共通性と特異性を与えるために使用することができ、これにより、続いて、所定のプロテオームから得られた何千ものタンパク質がディスプレイされた空間的に規律されたアレイの作成が可能となる。

#### 【0008】

ここで考慮すべき重要なことは、「タグ」を正確な場所に置くことである。もし前記タグが、何れかの遺伝子の不確定でランダムな位置にインフレームに挿入されれば、得られたタグ付加されたタンパク質は、不確定な態様で末端切断されると思われるので、多くの場合には、正しい折り畳みと機能が破壊されるであろう。ここに記載した方法は、各完全長のタグが付加されたタンパク質が正しく折り畳まれ、このため、アレイ中に特異的に固定化したときに機能が保持されるように、何れかの特定の遺伝子の開始コドンの直後又は停止コドンの直前に前記タグを挿入することによって、この課題を回避する。

#### 【0009】

前記アレイ中の各タンパク質は完全に機能的であるはずなので、その後、アレイは、薬物の標的及び他の生物学的に関連する分子を同定するために直接スクリーニングすることができる。前記アレイが空間的に規定されていることによって、各タンパク質の表現型を直接その遺伝子型に関連付けて、「ヒット」を同定することが可能となるであろう。

#### 【0010】

このように、第1の側面において、本発明は、各々N末端又はC末端の何れかにマーカ部分が付加された完全長のタンパク質として、1以上のタンパク質をクローニングし、発現することを備えたタンパク質アレイを作成する方法を提供する。

#### 【0011】

前記マーカ部分は、ペプチド配列、例えばヘキサヒスチジンタグ、抗体のエピトープ、又はビオチン類似物（biotin mimic）、又は実際に完全なタンパク質、又はタンパク質ドメイン、例えばマルトース結合タンパク質ドメインの何れであってもよい。前記マーカ部分自体は、例えば、ビオチン又は脂質分子を付加することによって、翻訳後に修飾することができる。好ましい態様では、前記マーカ部分は、「タグ付加された」タンパク質の精製も可能とするであろう。

#### 【0012】

このように、本発明の方法は、各遺伝子の配列についてのいかなる知見にも依拠しない態様で、1つのポットで、cDNAライブラリーの全てのメンバーを特異的に修飾すること

を可能とする。代わりに、本発明の方法は、全ての遺伝子中に存在する共通の開始又は停止コドンに基づいている。前記修飾は、必要に応じて、配列公知の付加すべきさらなるDNAを、各cDNAの開始コドンの直後か、又は停止コドンの直前の何れかに、インフレームで正確に挿入するという形態でなされるであろう。

【0013】

前記付加すべきDNAは、各cDNAの産物と同じリーディングフレーム中に存在するであろう公知のマーカー部分をコードするであろう。本発明の方法によって作成された各遺伝的に修飾されたcDNAは、このため、ここでは、そのN又はC末端の何れかに正確に融合された共通部分である「タグ」、例えばポリペプチドを有する各タンパク質をコードすることになる。cDNAライブラリーの全てのメンバーは、正確に同じように修飾されると思われるので、前記cDNAライブラリーによってコードされる全てのタンパク質は、最終的な結果としては、この段階では、それらのN又はC末端の何れかに共通部分が付加されることになるだろう。

【0014】

一般的に、前記cDNAライブラリーから発現される前記タンパク質は「タグ付加」され、容易に同定し、単離することができるであろう。一度精製されると、タンパク質は、例えば、マイクロアレイに付着させることができる。付着は、タグ自体を通じて、あるいはタンパク質に最初に付着された別の部分を通じて行うことができる。

【0015】

本明細書に記載された方法によって形成されたアレイは、本発明の第2の側面を成す。このようなアレイは、通常は、固相支持体上に固定された、「タグ付加された」タンパク質の発現ライブラリーを備える。当業者であれば、アレイの分野において、固相支持体たり得る幅広い支持体が一般的に使用されており、これらの「基材 (substrate)」を何れも、本発明のアレイの製造に使用できることが理解できるであろう。

【0016】

本明細書に記載されているように、本発明の方法は、あるプロテオーム中の全タンパク質のN末端又はC末端の何れかに特異的にタグを付加することを可能とする。タンパク質の中にはN末端の伸長が許容され得ないものも、C末端の伸長が許容され得ないものもあるが、殆どのタンパク質は、このような伸長の何れかを許容するであろう。しかしながら、完全長の、修飾されていないcDNAとして、又はランダムで殆ど不可避免的に末端切断された、あるタンパク質パートナーへの融合物として遺伝子をクローニングするので、既存のライブラリークローニング法は、この課題を全く解決することができない。

【0017】

後者に比べて、本方法によれば、例えば、所望のペプチドパートナーへの融合物として、正確な、完全長のcDNAライブラリーを作成することが可能となる。前者に比べて、本明細書に記載したアレイ中にタンパク質を固定化する方法は、非特異的な相互作用よりも、特異的な相互作用を介し、これらの特異的な相互作用が、各cDNAの末端に付加されたタグの機能である。さらに、本明細書に記載された方法は、正確な折り畳みと翻訳後修飾を通じて機能の維持を補助するために細菌でない宿主生物で発現された、精製、固定化されたタンパク質をスクリーニングするために使用することができるのに対して、フェージディスプレイ又はλ-cDNAライブラリーのような既存の方法は、誤った折り畳みか、又は不正確な翻訳後修飾の何れかのために、多くの真核細胞のタンパク質が非機能的な形態で合成される細菌宿主に限定される。

【0018】

本発明の方法は、大きく3つの主たる領域に分けることができる広い範囲にわたるインビトロでの使用可能性を有している。これらは、タンパク質-リガンド相互作用の研究、タンパク質-タンパク質相互作用の研究、及びタンパク質-DNA相互作用の研究である。

【0019】

タンパク質-リガンド相互作用

本明細書に記載した方法は、ある新規な化学物質とあるプロテオーム中の全タンパク質間

の相互作用を迅速に描出することが可能であろう。これは、単に、逆高速大量スクリーニングと考え得る様々なストリンジェンシーで、NCEを用いて適切なプロテオームのアレイをプロービングすることによって達成され得る。このようなスクリーニングから読み取られた情報は、多くの場面（そのうちの幾つかは以下に記載されている）ですぐに役立つであろう。

#### 【0020】

細胞又は完全な生物体に対して化合物のライブラリーを検査する高速大量スクリーニングプログラムは、しばしば、スクリーニング前にその標的を知ることなしに、表現型の変化をもたらす手がかりを同定する。しかしながら、その後の一次標的の同定は、極めて手間のかかるプロセスであり得る。当該種に対する機能的プロテオームアレイを作り出した後、リード化合物がプロテオーム中の何れのタンパク質を標的としているかを同定するために、リード化合物を用いてこのアレイをスクリーニングすることができると思われるので、本発明の方法は、この種の問題にそのまま適用することができる。タンパク質-リガンド相互作用を同定するためのこの大規模並列アプローチは、NCEの一次標的の決定を大幅にスピードアップさせ、且つ簡易化し、同じく重要であり得るより弱い二次的な相互作用の同定も可能にするであろう。さらに、本方法は、種の交叉反応性という問題にも直接適用できるので、例えば、ヒトのプロテオーム中の全タンパク質との相互作用について、例えば、抗真菌化合物の候補を迅速に評価することが可能となる。この種の情報は、リード化合物のその後のいかなる最適化においても、極めて有用であることが分かるであろう。

#### 【0021】

高速大量スクリーニング法は、現在、それ自身以前に治療の標的の候補として同定されたあるタンパク質に結合する小分子の迅速な同定を可能にする。しかしながら、これらの方法は、あるリード化合物を追跡するかどうかを決定する上である相互作用がどの程度選択的であるかを知ることが重要であり得るにもかかわらず、この問いに答えるものではない。優れた者であれば単一のタンパク質を標的とする化合物は、多数の関連する、又は無関係なタンパク質にも遭遇する化合物よりも副作用が少ないと思われると主張するであろう。

#### 【0022】

第3相臨床試験までは上手く進めたが、それらの主要な機序が不明であるために、規制当局の承認を勝ち得ることができない化合物の例が多数存在する。抗鬱薬であるミアンセリンとトラザドン、及びファイザーの抗関節炎薬デニグアップは、この例であり、それぞれ、何億ドルもの投資に対する見返りが全く得られていない。本明細書に記載された方法は、このような薬物の主要な標的を発見し、続いて作用機序が明らかになれば、非常に高価な臨床試験データが、既に規制当局の承認のために使用できるようになるので、このような失敗に終わった薬物を復活させるのに使用することができるであろう。

#### 【0023】

全ての既存の薬物は、多かれ少なかれ、副作用を有しているが、この例として、それ以外の面では魅力的な抗分裂病薬であるクロザピンである。このような副作用が由来する分子を決定することができれば、これによって、最小限の副作用と最適な主作用が組み合わされた未来の創薬のデザインが大きく促進されるであろう。化合物とプロテオーム中の全てのタンパク質との相互作用のプロフィールを作成する上で、異常な2次的相互作用が同定され、続いて、既知の副作用と関連しているかという見地から、これら进行评估することができるので、本明細書に記載した方法は、ここでも、このような課題に直接適用することができる。

#### 【0024】

本発明の方法は、一般的な阻害剤を備えたプロテオームアレイをスクリーニングすることによって、セリンプロテアーゼのようなタンパク質ファミリーを同定するためにも使用することができる。続いて、これによって、さらに集中したリード化合物のスクリーニングのために、その後、例えば、全てのヒトのセリンプロテアーゼ、あるいは、全てのキナー

ぜ、又は全てのp450酵素をディスプレイするバイオチップを開発することが可能となるであろう。例えば、p450チップによって媒介された水酸化は、代謝プロセスの最初の段階であることが多く、薬物応答における患者間の変動の主たる原因の1つであると考えられるので、p450バイオチップは、あるリード化合物が代謝されたかどうかを評価するのに有用であろう。現に、現在の薬物デザインの最終目標の1つは、第1に代謝されない化合物を作成することであり、この場合にも、p450チップは、顕著な有用性を有し得るであろう。

#### 【0025】

##### タンパク質-タンパク質相互作用

タンパク質-タンパク質相互作用及び多タンパク質複合体は、細胞生物学において、特に重要である。例えば、シグナル伝達経路は、一般的に、細胞表面の受容体と外部のリガンドとの相互作用によって開始され、この後、タンパク質-タンパク質相互作用のカスケードが続き、最終的に特定遺伝子の活性化をもたらす。各タンパク質-タンパク質相互作用は、特定のリガンドの存在に依存し得、あるいは特定のリガンドによって遮断され得るが、多タンパク質複合体の中には、リガンド依存性の態様でのみ形成されるものもあるだろう。

#### 【0026】

何千もの新しいタンパク質-タンパク質相互作用は、ツーハイブリッド手法を用いて同定されてきた。本明細書に記載された方法は、このような方法の限界を克服し、相互作用するパートナーのみならず、各相互作用の相対的な強度を明らかにするために、各標識されたタンパク質を用いてプロテオームアレイをスクリーニングするために使用することができる。本方法は、多タンパク質複合体の成分を同定し、さらには、それらの集合がどこでリガンド依存性であるのかを明らかにするためにも使用できる。

#### 【0027】

新規タンパク質-タンパク質相互作用を明らかにする上での、このような本方法の使用例は、病状に関与していると考えられているある細胞表面受容体の細胞質ドメインのシグナル伝達パートナーの同定であろう。このようなタンパク質-タンパク質相互作用は、治療の標的候補を直ちに示すかもしれないので、このようなシグナル伝達パートナーの同定は、製薬の展望と直接関連するであろう。

#### 【0028】

##### タンパク質-DNA相互作用

ヒトのゲノム中の全遺伝子のおよそ10%が転写因子をコードすると推測されているが、現在のところ、これらのうちの僅かな割合しか同定されていない。DNAエンハンサー要素への特異的な転写因子の結合（しばしば、外的な刺激に応答して起こる）は、エンハンセオソーム（enhanceosome）複合体の形成に不可欠であり、該複合体が、続いて、遺伝子発現のスイッチをオンにする。遺伝子の発現が、原理的に、薬物の投与によって影響を受け得る様々な点が存在する。薬物は、細胞表面受容体へのタンパク質又は小分子の結合を遮断し、これによって、最初からシグナル伝達カスケードを遮断し得る；薬物はタンパク質-タンパク質相互作用を遮断するか、又はシグナル伝達カスケード中の酵素活性を阻害し得る；あるいは、薬物は、エンハンセオソーム複合体中の特異的なタンパク質-DNA又はタンパク質-タンパク質相互作用の形成を遮断し得る。ここでの例としては、転写因子NF- $\kappa$ Bは、免疫及び炎症反応、肢の発育、敗血性ショック、喘息、並びにHIVプロベチドの産生にわたる様々な細胞のプロセスに関与している。NF- $\kappa$ Bの活性化における細胞内シグナル伝達カスケードの大部分は、これらのプロセス全てに共通なので、処置のための実用的な標的とはならない。それ故、前記反応間の差は、最初のリガンド-受容体相互作用か、又は特異的なエンハンセオソーム複合体の形成の何れかに存する。NF- $\kappa$ Bは、少なくとも14の異なるエンハンサー要素とエンハンセオソーム複合体に結合することが知られているので、治療のための標的候補となる。しかしながら、各エンハンセオソーム複合体の描出には、関与する各DNA結合タンパク質の数とそれらの互いのタンパク質-タンパク質総合作用に関する知見が必要である。本方法は、

これらの問題の何れをも直接解決するために使用することができる。プロテオームアレイは、新規DNA結合タンパク質を同定するための特異的なDNAプローブを用いてスクリーニングすることができる。あるいは、プロテオームアレイは、特定の転写因子のトランス活性化ドメインを用いてスクリーニングして、それと相互作用する他のタンパク質を同定することができる。このようなスクリーニングの相互相関によって、特定のエンハンセオソーム複合体の新規成分を同定することが可能となるはずである。

#### 【0029】

本発明の方法によって作成されたタンパク質アレイは、アレイ中にディスプレイされた各タンパク質を認識する分子の選択も可能にするであろう。好ましい態様では、選択された分子は、抗体又は抗体様タンパク質であり、ファージ上若しくはリボソーム上にディスプレイされ、又はコードしているmRNAに共有結合しているであろう。

#### 【0030】

このように、ファージにディスプレイされた抗体ライブラリーは、アレイ中の各固定化されたタンパク質に適用し、結合していない抗体は洗浄によって除去することができる。続いて、選択されたファージは回収して、通常の操作に従って、細菌を感染するために使用することができる。ファージに感染した細菌は、続いて、さらなるラウンドの選択用の前記選択した抗体をディスプレイするファージ粒子を産生するか、又は直接使用するための可溶性抗体断片を産生することができる。本明細書において、「抗体」又は「抗体断片」という語は、マウス、ヒト、ラクダ、又はその他の生物に由来する単鎖のFv s、FAB断片、各軽鎖又は重鎖断片を意味する。

#### 【0031】

好ましい態様では、前記タンパク質アレイは、選択工程後に、各ウェル（ここで、細菌細胞は前記選択したファージに感染するであろう）に適切な細菌細胞を加えることによってファージ粒子が回収できるように、マイクロウェルフォーマットの中に存在させ得るであろう。続いて、前記アレイ中の各固定化されたタンパク質に対して選択された抗体断片の物理的な分離を維持しながら、各ウェルに増殖培養液を加えて、感染した前記細菌を増殖させ、抗体断片を発現させることができる。所望であれば、感染した前記細菌によって産生された新規ファージ粒子は、続くラウンドの選択で使用することができる。このような操作は、現在では、単一の精製され、且つ固定化されたタンパク質に対するポリクローナル又はモノクローナル抗体断片を選択するための一般的な操作である。実際に、その後、前記元のタンパク質アレイは、その他は標準的なインビトロ抗体選択法を用いて、大量に並行して、正しく折り畳まれた何千ものタンパク質に対するポリクローナル又はモノクローナル抗体断片を作成することが可能であろう。

#### 【0032】

元のアレイの各ウェルから得た前記選択され、可溶性に発現された抗体断片は、新しいアレイの各位置の中に存在する抗体断片が、前記元のアレイ中の単一の決まった位置に固定化されたタンパク質に対して選択されるように、それ自体を、新しい空間的に規定されたアレイの中に固定化することができる。このように作成された抗体のアレイは、可溶性抗体断片の固定化の前に行われた選択のラウンド回数に応じて、各位置にポリクローナル又はモノクローナル抗体断片の何れかを含有するであろう。

#### 【0033】

このような抗体のアレイは、関連するプロテオームのディファレンシャル発現モニタリングのために、粗細胞又は組織可溶化液の各タンパク質を捕捉することを含む多数の潜在的な用途を有するであろう。あるいは、抗体によって捕捉されたタンパク質は、リガンド-結合機能について直接スクリーニングされ得る。一般的に、あるモノクローナル抗体は、タンパク質の機能を遮断するように標的タンパク質に結合し得るが、別のモノクローナル抗体は機能を遮断せずに結合し得る。大規模並列アプローチでは、プロテオーム中の全てのタンパク質に対する全てのモノクローナル抗体が機能に影響を与えずに結合する能力を各別に評価することは明らかに非現実的である。しかしながら、プロテオーム中の全てのタンパク質に対する一群のポリクローナル抗体は、機能に影響を与えずに結合する所望の



能力を有する各抗体を含有しているかもしれず、さらには、あるタンパク質の全ての翻訳後修飾を認識する各抗体を含有している可能性がある。このため、一般的には、既述のごとく作成したモノクローナル抗体のアレイよりもポリクローナル抗体のアレイの方が、捕捉されたタンパク質の機能について直接スクリーニングするのに有利であろう。

#### 【0034】

元のタンパク質アレイと比べて、本明細書に記載した方法によって作成した抗体アレイは、アレイ上に固定化された全てのタンパク質が、類似の条件下で安定であるであろうという利点を有するだろう。粗細胞又は組織可溶化液から捕捉された前記タンパク質は組換え体ではなく、天然に発現されているものであろう。さらに、前記捕捉されたタンパク質は、前記粗細胞又は組織可溶化液からの捕捉後に、直接、機能又はリガンド結合などについてスクリーニングすることができ、これは機能の維持を補助するはずである。

#### 【0035】

このように、さらなる側面では、本発明は、

(1) 1以上の化合物の生物学的活性をスクリーニングする方法であって、前記1以上の化合物を、本明細書に記載のタンパク質アレイと接触させる工程と、前記アレイ中の前記タンパク質への前記1以上の化合物の結合を測定する工程とを備えた方法；

(2) 1以上のタンパク質の特異的なタンパク質-タンパク質相互作用をスクリーニングする方法であって、前記1以上のタンパク質、例えば、細胞表面受容体を、本明細書に記載のアレイと接触させる工程と、前記1以上のタンパク質の前記アレイの前記タンパク質との結合を測定する工程とを備えた方法；

(3) 1以上のタンパク質の特異的なタンパク質-核酸相互作用をスクリーニングする方法であって、前記1以上の核酸プローブを、本明細書に記載のアレイと接触させる工程と、前記プローブの前記アレイ中の前記タンパク質への結合を測定する工程とを備えた方法；

(4) 化合物、タンパク質、又は核酸の迅速なスクリーニングにおける本明細書に記載のアレイの使用；

(5) アレイ中の各タンパク質を認識する分子のスクリーニングにおける本明細書に記載のアレイの使用であって、前記分子が好ましくは抗体である使用；

(6) 抗体アレイを作成する方法であって、タンパク質アレイ中の1以上のタンパク質が抗体ライブラリー中の少なくとも1つの抗体に結合するように、本明細書に記載のタンパク質アレイを、抗体ライブラリーと接触させることと、結合していない全ての抗体を除去することと；前記タンパク質アレイ中のタンパク質に結合した抗体の固定化とを備えた方法；及び

(7) タンパク質の機能又は存在量をスクリーニングする方法であって、本明細書に記載の抗体アレイを1以上のタンパク質の混合物と接触させる工程を備えた方法を提供する。

#### 【0036】

方法(1)、(2)、(3)、及び(6)は、まず、1以上の本発明の方法によるアレイを提供する工程を含んでもよい。

#### 【0037】

本発明の各側面の好ましい特徴は、必要な変更を加えれば、互いの側面に当てはまる。

#### 【0038】

ここで、以下の例を参照しながら本発明を記載するが、本例は、いかなる意味においても、本発明の範囲を限定するものと解してはならない。

#### 【0039】

例1

(a) ベクターの構築 (図1 a参照)

我々は、プロモーター配列のすぐ下流のNcoI部位中にクローニングされた遺伝子発現を誘導するための強力なハイブリッドプロモーター (Ptrc) を含有するpUC19に由来するベクターpMM106Hを構築した。我々は、NcoI部位と下流のHpaI部位の間にあるスタッファー断片 (stuffer fragment) として、676bp

のナンセンスDNA配列を挿入した。Hpa Iは平滑断端切断酵素であり、読み取り枠が前記平滑断端の最初の塩基上にあれば、前記下流のDNAがポリアスパラギン、ヘキサヒスチジンペプチドをコードするように、ベクターを切除するように配置されている。ヘキサヒスチジンタグの後には、アンバー停止コドン (TAG) があり、クラゲ *Aequorea victoria* の緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子が続いている。pMM106H中にNco I/平滑断端断片としてクローニングされた遺伝子は、クローニングの間にHpa I部位に正しい読み取り枠が作出されたときにのみ、HisタグとGFPへの融合体をもたらす。ここでは、GFPは、Hisタグを発現するクローンの可視的なスクリーニングを促進するためにレポーター遺伝子として使用されるが、GFPは、正しいコンフォメーションに折り畳まれたときだけ活性となるので、融合タンパク質の正しい折り畳みの指標も与える。前記アンバー停止コドンは、緑のコロニーを可視化するための少量の完全長融合タンパク質をもたらすであろうが、融合タンパク質の多くはHisタグの直後で終結すると思われるので、その後固定化と酵素アッセイに使用することができる。pMM106Hの構築は配列決定によって確認された。

#### 【0040】

我々は、まず、プライマー「GTS fwd 2」(5' -ATG CTG CAG ACG TCA ACA GTA TCC ATG GCC CCT ATA CTA GG-3') 及び「GST Hind III」(5' -GCG AGG AAG CTT GTC AAT CAG TCA CGA TGA ATT CCC G-3') を用いて、標準的な条件下で、*Schistosoma japonicum* のグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 遺伝子をpGEX-2T (Pharmacia) からPCR増幅することによって第2のベクターpGSTNを構築した。これらのプライマーは、GSTの開始コドンにNco I制限部位を導入し、GSTの2番目の残基をセリンからアラニンに変異させ、Hind III制限部位が続くGST遺伝子の3'にある多重クローニング部位の中に停止コドンを導入する。続いて、標準的な条件下で、pGSTNを作成するために予めNco I/Hind IIIで消化したpTrcHisA (Invitrogen) の中に、Nco I/Hind III断片として、前記PCR産物をクローニングした。

#### 【0041】

(b) タグを付加する前の遺伝子のPCR増幅及びエキソヌクレアーゼ消化 (図1b参照)

我々は、それぞれ、ベクターの開始コドンの156bp上流及び停止コドンの84bp下流に結合するベクター特異的な特注プライマー「STフォワード」(5' -ATG CTG ACG TCA TGA GGC CCA TGG GGC CCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G-3') と「STリバーズ」(5' -GCG GAT CCT TGC GGC CGC CAG GCA AAT TCT GTT T-3') によるポリメラーゼ連鎖反応を用いて、前記構築物pGSTNからGST遺伝子を増幅した。4つの別個の100µLの反応中で、30サイクルのPCR (94℃1分; 57℃1分; 72℃2分) を行った。各PCR反応は、約20ngのテンプレートDNA、50pmolの各プライマー、及び2.5ユニットのPwoポリメラーゼを含有していた。各PCR反応は、標準的な緩衝液 (10mM Tris, HCl pH8.8, 25mM KCl, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 10% DMSO) 中で行った。続いて、4つのPCR反応は、それぞれ、以下のような、標準的でないデオキシヌクレオチド三リン酸ミックスも含有していた。

#### 【0042】

反応1) 200µM dATP、200µM dTTP、200µM dCTP、150µM dGTP、50µM α-S-dGTP;

反応2) 200µM dATP、200µM dTTP、200µM dGTP、150µM dCTP、50µM α-S-dCTP;

反応3) 200µM dATP、200µM dGTP、200µM dCTP、150µM dTTP、50µM α-S-dTTP;

反応4) 200 $\mu$ M dGTP、200 $\mu$ M dTTP、200 $\mu$ M dCTP、150 $\mu$ M dATP、50 $\mu$ M  $\alpha$ -S-dATP。

#### 【0043】

それぞれの特異的なPCRミックスに単一の $\alpha$ -チオデオキシヌクレオチド三リン酸を含有させると、前記特異的な最終PCR産物中に適切な $\alpha$ -S-dNTPをランダムであるが統計的に取り込ませる。続いて、前記4つの各PCRミックスをプールし、標準的な条件下で、QIAquick PCRクリーンアップキット (Qiagen) を用いて精製し、制限酵素Aat IIで完全に消化した。得られた約1000bpのPCR産物を続いてゲル精製した。

#### 【0044】

続いて、50 $\mu$ Lの反応液中において、37℃で45分間、375ユニットのエキソヌクレアーゼIIIとともに、5 $\mu$ gの前記消化したPCR産物をインキュベートした。Exo III消化は、標準的な反応緩衝液 (66mM Tris, HCl pH8.0、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、5mM DTT、50 $\mu$ g/mL ウシ血清アルブミン) 中で行った。これらの条件は、Exo IIIによる消化は確実に完結させる。続いて、75℃まで15分間加熱することによって、酵素を不活化する。Exo III消化の産物は、PCR産物の3'末端から得られた欠失物の入れ子状態のセット (nested set) である。Aat IIによる制限は、その後エキソヌクレアーゼIII活性に対して抵抗する3'突出部を残すので、PCR産物の5'末端は、消化から保護される。

#### 【0045】

エキソヌクレアーゼIIIは、 $\alpha$ -チオ含有ヌクレオチドを加水分解することができない非前進性の3'から5'へのエキソヌクレアーゼなので、本プロトコルでは、Exo IIIが $\alpha$ -チオデオキシヌクレオチド塩基に達する毎に、進行するPCR産物の陥凹した3'末端の切断が停止する。このため、初期の段階に各 $\alpha$ -S-dNTPがランダムに取り込まれる結果として、最終的には、欠失物の入れ子状態のセットが得られる。元のPCR増幅で使用したdNTPに対する $\alpha$ -S-dNTPの比率は、入れ子状態の欠失のエンベロープが、元の完全長PCR産物より約100bp短いものを中心とする400bpのサイズのウィンドウに及ぶように、経験的に決定した。我々は、Exo IIIミックスの一部を取り、マング・ビーンヌクレアーゼで入れ子状態の欠失を処理することによって、これを確認した。このプロセスによって、5'及び3'突出部が除去されて、平滑断端産物が得られ、続いて、100bpのDNAラダーを標準として用いて、1%のアガロース/TBEゲル上で該産物のサイズを決定した。

#### 【0046】

明らかに、上記の操作において、入れ子状態の3'が陥凹した欠失物の必要なセットを作成するために、多くの異なる3'から5'へのヌクレアーゼ活性を使用することができる；これらには、エキソヌクレアーゼIII、E. coliのDNAポリメラーゼI、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0047】

(C) タグを導入するための特異的な連結とPCR増幅 (図1c参照)

約25倍モル過剰の「オリゴミックス」の存在下で、5 $\mu$ LのExo III反応ミックスをT4 DNAリガー緩衝液中に希釈した。前記「オリゴミックス」は、2つの異なるオリゴヌクレオチドプールのうちの何れか1つからなる。第1のプール、「オリゴミックスA」は、3つの可能な各停止コドンが5'末端に提示され、直後に縮重塩基が続く12のオリゴヌクレオチドを含有している。各オリゴの残りの領域は、12のケース全てにおいて同じであり、3'末端にプライマー「LBM2」に対する相補的な制限配列 (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') が続いた2つのIIS型制限酵素部位 (Sap I及びBpm I) 以外は、効果的にランダムな配列である。12のオリゴの配列は以下のとおりである。

#### 【0048】

【表1】

|                                                                         |              |           |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|
| 5'-TAA GGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAA AGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAA TGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAA CGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAG GGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAG AGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAG TGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAG CGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TGA GGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TGA AGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TGA TGA AGA GCT AGT ACT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TGA <u>CGA AGA GCT AGT ACT CCA</u> <b>GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'</b> |              |           |
| <i>Sap</i> I                                                            | <i>Bpm</i> I | LMB2 結合部位 |

## 【0049】

第2のプール「オリゴミックスB」は、3組のオリゴヌクレオチドからなり、それぞれは、5'末端に存在する3つの停止コドンのうち1つを有し、その直後に6つの縮重した残基が続いている。各オリゴの残りの領域は、3つの組全てで同じであり、2つのIIS型制限酵素部位(*Bpm*Iと*Bse*RI)を含有し、3'末端にプライマー「LMB2」に対する相補的な認識配列が続いている。3組のオリゴの配列は以下のとおりである。

## 【0050】

【表2】

|                                                                         |              |           |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|
| 5'-TAA NNN NNN ACT CCT CCT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TAG NNN NNN ACT CCT CCT CCA GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'               |              |           |
| 5'-TGA NNN NNN <u>ACT CCT CCT CCA</u> <b>GAC TGG CCG TCG TTT TAC-3'</b> |              |           |
| <i>Bse</i> RI                                                           | <i>Bpm</i> I | LMB2 結合部位 |

## 【0051】

ExoIIIミックス+オリゴミックスA又はオリゴミックスBの何れかを、16℃で30分間アニールした後、400ユニットのT4 DNAリガーゼを加え、その後16℃で一晩反応液をインキュベートした。標準条件下で、QIAquick PCRクリーンアップキット(Qiagen)を用いて連結産物を精製し、プライマー「STフォワード」と「LMB2」により、Pwoポリメラーゼを用いる標準的なPCR反応におけるテンプレートとして使用した。30サイクルのPCR(94℃、1分; 57℃1分; 72℃2分)を実施して、1000bpに及ぶPCR産物を生成させた。

## 【0052】

オリゴミックスAとオリゴミックスBは何れも、前の工程で実施された二重鎖のうちの1つの鎖のE x o I I Iによる加水分解によって露出された元のテンプレートの一本鎖DNA領域に拮抗的にアニールすることができる。アニーリングに続いて、何れかのオリゴとテンプレートとの間で上手く連結が起こるためには、オリゴがその5'末端で絶対的な相補性をもってアニールし、さらに、前記二重鎖テンプレートの陥凹した3'残基が、特異的にアニールされたオリゴの5'残基と直接隣接していることを要する。新しく連結されたオリゴに結合する第1のプライマーと二重鎖テンプレートの5'末端に結合する第2のプライマーを用いたPCRは、その後、このような連結を受けた二重鎖のみを選択的且つ特異的に増幅する。オリゴミックスA中の前記12の各オリゴの5'末端は、停止コドンに対応するので、図1cに示されているように、このミックス中に含まれる12のオリゴのうち、その5'末端に、GSTの第1のインフレーム停止コドンと該停止コドンのすぐ3'にある塩基とを含む4つの塩基対認識配列に対して絶対的な相補性を有する1つだけがアニールすることができる。残りの11のオリゴは、それらの5'末端において、前記欠失物の入れ子状態のセットの内部の別の場所に完全にアニールし得るが、これら他の特異的なアニーリング現象は、GST遺伝子中のアウトオブフレームの停止コドン又は最初のインフレーム停止コドンの下流にある停止コドンでしか起こらない。新しくアニールしたオリゴがどこで、二重鎖テンプレートの3'陥凹した残基に直接隣接していても、連結が起こり得る。この段階のPCRは、それ故、正確な、完全長の遺伝子のみならず、末端切断され、且つ伸長された産物のセットも増幅するであろう。オリゴミックスB中のオリゴは、同様に反応すると予想される。前記プール中の前記3組の各オリゴの5'末端は、停止コドンに対応し、効果的にランダムである6つの残基が続く。それ故、前記プールは、停止コドンと次の6つの残基が目的の遺伝子の下流にある残基と完全にマッチする1つの順列を含有するであろう。4と比べて、9つのヌクレオチド上に相補部分が伸長しているので、このオリゴは、12のオリゴのプールから得られた対応するオリゴより高い特異性で結合するであろう。

#### 【0053】

オリゴミックスAとオリゴミックスBとの理論的な差は、各オリゴの5'末端にある停止コドンの直後にある配列中に存在する。オリゴミックスAでは、単一の縮重する塩基の後にはナンセンスであるが、決まった単一のDNA配列が続いているので、この決まった領域は、各オリゴの5'末端での4つのデザインされた塩基対の相互作用を超えて、意図的にではないが塩基対の相補性をさらに与えることによって、何れかの特定の遺伝子内の各「停止」コドン（インフレームであるとアウトオブフレームであるとを問わない）を優先するように、オリゴミックスのアニーリングを偏らせることができる。アニーリング中の何れの偏りも、各停止コドン（インフレームであるとアウトオブフレームであるとを問わない）の特異的な切り出しと置換が起こったクローンに対する偏りの下流に現れ得る。このような異なる停止コドンにおける修飾の頻度の偏りは、望ましくないかもしれないので、オリゴミックスBは、以下のように、これを回避するためにデザインされている。各遺伝子又はライブラリー内の停止コドンは何れも、そのすぐ後に、確定しているが、未知の配列が続いているであろう。3つの停止コドンは全て、オリゴミックスBの中に提示されており、遺伝子又はライブラリー内の何れの停止コドンに対しても、前記停止コドンとその正確な下流の配列と正確にマッチするオリゴがオリゴミックスBの中に1つ存在し、全体で9塩基対の相補性が得られるように、それぞれは、全ての可能なヘキサヌクレオチド配列（すなわち、ランダムヘキサマー配列によって）が直後に続いている。これは全ての停止コドンについて当てはまると思われるので、オリゴミックスBは、それ故、オリゴミックスAで起こり得るこの種の偏りからは、何れも解放されるはずである。

#### 【0054】

我々は、前記オリゴミックスのE x o I I I消化、アニーリング、及び連結、並びに特異的なPCR増幅の全プロセスが、高度に再現性を有することを見出した。この操作における対照として、エキソヌクレアーゼI I I、T4 DNAリガーゼ、又は何れかのオリゴミックスのうち何れか1つを省略すると、PCR産物が全く得られないことを示した。こ

のことは、このプロセスが高度に選択的であることを示している。

#### 【0055】

T4 DNAリガーゼは、異なる特異性を示し得る多数の異なるDNAリガーゼ、例えば、Taq DNAリガーゼ、又はTsc DNAリガーゼによって置き換え得ることも理解できるであろう。

#### 【0056】

##### (d) 操作の変形

明らかに、上記の操作において、3' 陥凹した欠失物の必要な入れ子状態のセットを作成するために、多数の異なる3' から5' へのヌクレアーゼ活性を使用することができる。これらには、エキソヌクレアーゼIII、E. coli DNAポリメラーゼI、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されることはない。

#### 【0057】

停止コドン又は開始コドンが正確に除去された完全長の挿入物を作成するための前記元の操作に対する明確な変形には、コード配列を包含するPCR産物中に、5' が陥凹した欠失物の入れ子状態のセットを製造することが含まれる。これは、λエキソヌクレアーゼ、E. coli DNAポリメラーゼI、Taq DNAポリメラーゼ、T7遺伝子6エキソヌクレアーゼのようなヌクレアーゼを用いて行うことができるであろう。このように、例えば、前記元のPCR産物は、5' から3' 方向にdsDNAの1つの鎖からヌクレオチドを除去するλエキソヌクレアーゼを用いて消化することができる。前記酵素は、5' リン酸基のみを基質として認識するので、2つの鎖のうち1つは、最初のPCR増幅において適切なプライマーの末端に5' 水酸基を取り込むことによって保護され得る。欠失物の入れ子状態のセットは、このように、5' が陥凹した末端を残すように反対鎖が消化されることを除き、エキソヌクレアーゼIIIについて上記したように作成することができる。続いて、停止コドンの相補部分が前記オリゴの3' 末端に存在し、すぐ直前に6つのランダム化された残基が先行し、その前にIIS型制限部位をコードする所定配列が先行するオリゴの混合物を、前記露出した1本鎖領域にアニールすることができる。前記混合物からの1つのオリゴは、各露出された停止コドンに特異的にアニールし、5' から3' の方向にポリメライズするE. coliのDNAポリメラーゼIに対するプライマーとしての働き、その5' から3' へのエキソヌクレアーゼ活性で、その前にある鎖を消化するであろう。この新しい二重鎖DNA断片は、続いて、元のPCR産物の5' 末端に結合するプライマーと新しくアニール、伸長されたオリゴに特異的に結合するプライマーとを用いて、特異的に増幅することができる。この操作では、前記アニールされたオリゴの3' 末端は、二重鎖テンプレートの5' が陥凹した残基に直接隣接することを要しない。前記混合物からのオリゴは、ランダムなヘキサマープライミングと類似した態様で、前記露出した1本鎖DNAテンプレート上の任意の相補領域にアニールすることができるが、重要なことに、鎖の伸長は、3' 末端が絶対的な相補性をもってアニールし、前記混合物中のオリゴの3' 末端が停止コドンのみに相補的であるようにデザインされている場合だけに起こるのである。このように、オリゴの3' 末端が一致する停止コドンに特異的に結合するときだけ、プライマーの伸長とその後のPCR増幅が起こるのである。アウトオブフレームの停止コドンと目的の遺伝子の真の停止コドンの下流にあるコドンへの結合も起こり、正確な完全長の遺伝子のみならず、一群の末端切断され、伸長された産物のPCR増幅が得られる。

#### 【0058】

##### (e) PCR産物のクローニングと分析 (図1d参照)

QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて、サイズが800~1000bpにわたるPCR産物(約5μg)を精製した後、IIS型制限酵素BpmIを用いて完全に消化した。この酵素は、一方の鎖中に存在するその認識配列から離れた14の塩基と他方の鎖上の16bpを遠隔的だが特異的に切断して、3' 陥凹した末端を残す。このため、この制限修飾は、前記PCR産物から停止コドン(前記「オリゴミックス」か

ら各オリゴの5'末端は、前の工程において、ここにアニールし、適切に連結される)を特異的に切り出す。

#### 【0059】

続いて、マング・ビーンヌクレアーゼを用いて、標準的な条件下で、前記消化された産物の陥凹した3'末端を除去し、PCR産物の3'末端に平滑断端を作出する。標準的な条件下で、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて、DNAを精製し、続いて、制限酵素NcoIを用いて完全に消化した。続いて、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて、1%アガロース/TBEゲル上で、800bp~1000bpにわたる制限DNA断片を精製した。制限酵素NcoIとHpaIでベクターpMM106H(3μg)を完全に消化し、2870bpの骨格断片をゲルで精製した。続いて、標準的な条件下で、ベクターDNAと制限PCR産物を互いに連結させ、連結混合物を用いてE. coli DH5α細胞を形質転換した後、これを回収し、100μg/mLのカルベニシリンを含有するLBプレート上に播種した。

#### 【0060】

このクローニング操作は、前工程で得られたPCR産物の完全なセットに対して行った。しかしながら、最初のインフレーム停止コドンへのオリゴの特異的なアニーリングと連結に由来するPCR産物のみが、この操作を介したクローニング工程後に、ヘキサヒスチジインタグとGFPへのインフレーム融合物を生じることができるはずである。このようにしてクローニングされた他の全てのPCR産物は、ヘキサヒスチジインタグとGFPへのアウトオブフレーム融合物を誘導するにすぎないはずである。PCR産物の平滑断端の、ベクターの平滑断端への連結が、下流ベクターDNAの読み取り枠の翻訳が切り出された停止コドンの元の読み取り枠によって指示される遺伝的融合物もたらずので、このようなことが起こる。もし、停止コドンがGST遺伝子に関してアウトオブフレームであれば、新しく付加されたヘキサヒスチジンをコードする配列も、GST遺伝子に対してアウトオブフレームになるものと思われるが、停止コドンがGSTに関してインフレームであれば、新しく付加されたヘキサヒスチジンをコードする配列もGST遺伝子に関してインフレームとなるであろう。しかしながら、特異的に切り出された停止コドンがGSTの最初のインフレーム停止コドンであったPCR産物のみが、前記DNAが転写、翻訳されるときに、ヘキサヒスチジン(とGFP)が付加されたGST融合タンパク質を生じ得る。上記特異的工程全体から生じ得る唯一のヘキサヒスチジン(とGFP)が付加されたタンパク質は、それ故、必ず、ポリアスパラギン、ヘキサヒスチジンへの完全長のGST融合物であろう。

#### 【0061】

上述したクローニング操作から得られたコロニーは、緑色の蛍光のコロニーを同定するために、365nmで可視化された。90のコロニー(白と緑の両者)をランダムに選んで、レプリカプレーティングを行い、抗Hisタグと抗GST抗体を用いた標準的な条件下でコロニーウェスタンブロットによって分析した。抗Hisタグ抗体は、ヘキサヒスチジンが付加されたタンパク質を発現するコロニーに結合するだけであると思われるので、ウェスタンブロットは、ヘキサヒスチジインタグへのインフレーム融合物を発現するコロニーの数についての直接的な情報を与える。これに対して、抗GST抗体は、GSTタンパク質のC末端付近に結合するので、完全長又はほぼ完全長のGSTタンパク質を発現するコロニーのみを認識する。我々は、抗Hisタグと抗GST抗体の両者によって陽性に認識されたタンパク質を含有するコロニーを同定した。これらのコロニーからのDNAを増幅、精製、及び配列決定した。配列決定データによって、完全長のGSTへの2つの完全なインフレーム融合物(すなわち、元のGST遺伝子の最初のインフレーム停止コドンが特異的に切り出され、インフレームのポリアスパラギン、ヘキサヒスチジインタグによって置き換えられたクローン)の存在が確認された。この操作全体を介して我々が取得した修飾の成功率は、それ故、約2.2%である。両陽性クローンは、十分な量の完全長のGST-ヘキサヒスチジン-GFP融合物が発現されるために、長波長の紫外光に暴露すると、緑の蛍光を発することが見出された。それ故、さらなる全ての実験において、ウェスタン

プロットによるさらなる分析のためには、緑の蛍光を発するコロニーのみを選択した。我々は、約70～80%の緑の蛍光を発するコロニーが、抗Hisタグ抗体によって認識されるタンパク質を発現することを見出した。残りの20～30%のケースでは、おそらくは、クローニングされた挿入物によって導入された偽リボソーム結合部位の助けによって、ヘキサヒスチジンタグとは独立に、GFP遺伝子の最初のATGから翻訳が開始している。

#### 【0062】

我々は、抗Hisタグと抗GST抗体の両者によって認識されるタンパク質を発現している緑の蛍光を発するコロニーからプラスミドDNAを増幅、精製、配列決定した。オリゴミックスAとオリゴミックスBの両者を用いて調製した挿入物に関しては、修飾の成功率は、全ての緑のコロニーの約25%であることが分かった。それ故、GFP遺伝子をインフレーム融合物に対するマーカーとして使用すると、正しいクローンを検出する効率が約10倍増加する。

#### 【0063】

マング・ビーンヌクレアーゼは、異なる特異性を示すかもしれない多数の異なる1本鎖ヌクレアーゼ、例えばS1ヌクレアーゼ又はRNase Tによって置き換えることができ、適切な位置に置かれた多数の異なるIIS型制限酵素、例えばSap Iを、Bpm Iの代わりに使用し得ることも理解できるであろう。

#### 【0064】

(f) タグ付加されたタンパク質の固定化と機能的な分析 (図1e参照)

上記の方法によって作成された完全長のヘキサヒスチジンが付加されたGSTプラスミドのうちの1つで、E. coli DH5 $\alpha$ 細胞を形質転換した。10 mLの液体培地中において、中期対数期まで、単一のカルベニシリン耐性コロニーを増殖させた後、100  $\mu$ MのIPTGを補充して、ヘキサヒスチジンが付加されたGSTの発現を誘導する。さらに4時間増殖させた後、細胞を採集し、凍結融解/リゾチームによって溶解した。粗可溶化液のSDS-PAGEは、予想されたサイズ(27 kDa)の過剰発現したタンパク質(全可溶性タンパク質の約20%を占めた)とともに、アンバーの抑制によって生じた少量の54 kDaのGST-ヘキサヒスチジン-GFP融合物を示した。続いて、粗可溶化液(500  $\mu$ L; 100  $\mu$ g)をニッケル-NTA磁気ビーズ(50  $\mu$ L; 結合能15  $\mu$ gのヘキサヒスチジンが付加されたタンパク質)と混合し、磁場の下での沈降によって前記ビーズを回収した。上清を捨て、ビーズを洗浄した後、各1 mMのグルタチオンと1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼンを含むグルタチオンSトランスフェラーゼアッセイ緩衝液中に再懸濁した。340 nmの吸光度を測定することによって、室温で30分後に終末点のアッセイデータを集めた。この波長は、GSTによって触媒される反応の産物の $\lambda_{max}$ に相当する。

#### 【0065】

対照として、親ベクター(pMM106H)又は無関係のHis付加タンパク質(アラニンラセマーゼ)をコードするプラスミドの何れかを含有するDH5 $\alpha$ の培養物を平行して増殖、誘導、採集、溶解し、アッセイした。GST活性は、Hisを付加されたGSTを含有する粗可溶化液と混合されたビーズ上のみに検出され、明らかに、観察されたGST活性が、固定化されたHis付加GSTから特異的に得られたものであり、さらに、該タンパク質が特異的に固定化されたときに、活性を保持していることが実証された。

#### 【0066】

酵素アッセイの完了後に、100 mMのイミダゾールを含む緩衝液を添加することによって、磁気ビーズからタンパク質を溶出し、SDS-PAGEによって分析した。これによって、陽性活性のアッセイ結果が得られたサンプルが、グルタチオンSトランスフェラーゼに対して予想された正確なサイズ(27 kDa)の単一の固定化されたタンパク質を含有することが示され、このため、前記ビーズ上に観察された活性が、この組み換えHis付加タンパク質のみによることが確認された。

#### 【0067】



## 例2

(a) 2つの異なるタグを用いたGSTの修飾、固定化、及びアッセイ  
ヘキサヒスチジンタグによるグルタチオン-S-トランスフェラーゼの修飾について例1で記載した操作に従って、我々は、該操作が、加えたタグの正確な性状の影響を受けないことを実証した。

## 【0068】

まず、676bpのNcoI/HpaIナンセンスDNAスタッファー断片が、*Escherichia coli* *gdhA*遺伝子に由来する300bpのNcoI/HpaI断片に置き換えられ、ヘキサヒスチジンタグがFLAGペプチド（エピトープタグ）とStreptIIタグ（ストレプトアビジンに特異的に、且つ高い親和性で結合する）の何れかによって置き換えられていることを除いて、pMM106Hと同一である2つのさらなるベクターを構築した。これらのベクターは、それぞれ、pMM104F及びpMM104Sと表記された。NcoIとHpaIを用いて、これらのベクター（それぞれ3μg）を別々に完全消化し、2870bpの骨格断片をゲル精製し、例1に記載したようにオリゴミックスAから生じたGST断片に連結した。抗FLAG及び抗GST抗体の組み合わせを使用した後、配列決定し、FLAGタグへの前記完全長のGST遺伝子の完全なインフレーム融合物を含有するクローンを同定した。同様に、抗GST抗体とストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体の組み合わせを用いた後、配列決定し、StreptIIタグへの前記完全長のGST遺伝子の完全なインフレーム融合物を含有するクローンが同定された。何れの例においても、完全長のインフレーム融合物が見出される頻度は、例1で決定したものと同一（実験誤差の範囲内）であった。

## 【0069】

固定化基材が、それぞれ抗FLAG抗体をコートした96ウェルのプレートとストレプトアビジンコートされた磁気ビーズであることを除き、実質的に例1に記載されているように、これらのクローンを固定化実験で使用した。例1における如く、我々は、これらのタグを介した融合タンパク質の特異的な固定化を実証することができ、さらに、我々は、FLAG又はStreptタグの何れかを介して固定化したときに、GST融合物とその活性を保持することを示すことができた。

## 【0070】

## 例3

(a) ヘキサヒスチジンタグを用いた別のタンパク質の修飾  
グルタチオン-S-トランスフェラーゼについて例1に記載した操作に従って、我々は、この操作が、扱っている正確な遺伝子の影響を受けないことを実証した。

## 【0071】

このように、ヒト転写因子NF-κB p50をコードするプラスミドから開始し、特に明記されていなければ、例1に記載されている操作（オリゴミックスAを用いる）に正確に従って、我々は、最初のインフレーム停止コドンが特異的に切り出され、ポリアスパラギン、ヘキサヒスチジンタグをコードするDNAへのインフレーム融合物によって置き換えられているようにNF-κB p50が修飾されることを実証することができた。抗Hisタグ抗体を用いたコロニーウェスタンブロットによって、ヘキサヒスチジンが付加されたタンパク質を発現するクローンの同定が可能となった。これらのコロニーからのDNAを増幅、精製、配列決定した。配列データによって、幾つかのクローンは、完全長のNF-κBへの完全なインフレーム融合物（すなわち、前記停止コドンが特異的に切り出され、インフレームヘキサヒスチジンタグによって置き換えられたクローン）をコードすることが確認された。NF-κB p50のケースで、完全長のインフレーム融合物が見出される頻度は1.1%であり、GSTについて例1で決定したものと近く、実験誤差の範囲内にある。

## 【0072】

(b) ヘキサヒスチジンが付加されたNF-κB p50の固定化と機能分析 上記方法によって作成した完全長のヘキサヒスチジンが付加されたNF-κBプラスミドのうちの

1つで、E. Coli DH5 $\alpha$ 細胞を形質転換した。10 mLの液体培地中において、中期対数期まで、単一のカルベニシリン耐性コロニーを増殖させた後、100  $\mu$ MのIPTGを補充して、ヘキサヒスチジンが付加されたNF- $\kappa$ B p50の発現を誘導する。さらに4時間増殖させた後、細胞を採集し、音波処理によって溶解した。粗可溶化液のSDS-PAGEは、予想されたサイズ(38 kDa)の過剰発現したタンパク質(全可溶性タンパク質の約5%を占めた)とともに、アンバーの抑制によって生じた少量の65 kDaのNF- $\kappa$ B p50-ヘキサヒスチジン-GFP融合物を示した。

【0073】

【表3】

$\kappa$ Bモチーフ 5'-CGT ATG TTG TGG GGA ATT CCC AGC GGA TAA C-3'

3'-GCA TAC AAC ACC CCT TAA GGG TCG CCT ATT G-5'

NF- $\kappa$ B p50 結合部位

【0074】

標準的な条件下で3末端トランスフェラーゼ(Boehringer Mannheim)を用いて、二重鎖オリゴヌクレオチド「 $\kappa$ Bモチーフ」(NF- $\kappa$ B p50に対するパリンドローム結合部位を含有する)の3'塩基をジゴキシゲニンで標識した。

【0075】

5 mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを含有するPBS(リン酸緩衝化された生理的食塩水 pH 7.5)中でのリゾチーム/凍結溶解法を用いて、タンパク質溶解物を調製した。各クローンからの可溶性タンパク質溶解物200  $\mu$ LをNi-NTAコートしたマイクロウェルに加え、室温で45分間インキュベートした。インキュベーション時間の終了時に、PBST(0.02%のTriton X-100を含有するPBS)でウェルを3回洗浄して、結合していないタンパク質を全て除去した。DNA結合緩衝液(5 mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを含有する10 mM Tris, HCl pH 7.4、75 mM KCl)を用いて、1分の浸漬時間で、ウェルを3回洗浄した。3'ジゴキシゲニンを標識した $\kappa$ Bモチーフ(2 pmol)を、1  $\mu$ gのポリ(dI-dC)非特異的DNAを含有するDNA結合緩衝液200  $\mu$ L中にウェルに加えた。さらに30分間インキュベートした後、0.02%のTriton X-100を含有する10 mM Tris, HCl pH 7.4、25 mM KClで3回ウェルを洗浄することによって、結合していないDNAを除去した。抗ジゴキシゲニン抗体-アルカリホスファターゼ接合体を、0.2%のウシ血清アルブミンが補充された「抗体希釈緩衝液」(10 mM Tris, HCl pH 7.4、25 mM KCl)の中に、150 mU/mLになるように希釈した。続いて、希釈した抗体(200  $\mu$ L)をマイクロウェルに加えた。室温で30分間放置した後、0.02%のTriton X-100が補充された「抗体希釈緩衝液」(3  $\times$  350  $\mu$ L)でマイクロウェルを洗浄することによって、結合していない抗体を除去した。続いて、アルカリホスファターゼの基質である250  $\mu$ Mのp-ニトロフェニルリン酸(pNPP)を含有する200  $\mu$ Lの緩衝液(100 mM Tris, HCl pH 9.5、100 mM NaCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>)をウェルに加え、室温で一晩反応を進行させ、その後、各ウェル中の黄色の呈色(産物の形成に相当する、p-ニトロフェノール)を405 nmで定量した。基質pNPPの加水分解のバックグラウンド速度は低いので、ウェル中に黄色が出現することから、直ちに、陽性のアッセイ結果が明らかとなった。このアッセイの対照として、我々は、粗可溶化液、又は標識されたオリゴヌクレオチド、又は抗体の何れかを省略し、又は20倍過剰の未標識の二重鎖オリゴを加え、又は粗可溶化液を含有するヘキサヒスチジンが付加されたNF- $\kappa$ B p50を、同じベクターのバックグラウンド中でヘキサヒスチジンが付加されたGSTを発現しているDH5 $\alpha$ 細胞から得た等量の粗細胞可溶化液で置き換えた。

## 【0076】

このアッセイでは、NF- $\kappa$ B p50は、まず、特異的な結合部位を介して標識されたオリゴヌクレオチドに結合する。続いて、ヘキサヒスチジンタグを介して、マイクロウェル中に該タンパク質-DNA複合体を固定化し、全ての結合していない標識されたオリゴとともに、(前記標識されたオリゴと粗可溶化液中に存在する他のDNA結合タンパク質との複合体を含む)他の全てのタンパク質を洗浄除去した。抗体-接合体は前記オリゴ上の標識を認識するが、ヘキサヒスチジンが付加されたタンパク質を認識しないので、タグを介してNF- $\kappa$ B p50を固定化したときに、NF- $\kappa$ B p50-DNA相互作用が維持されれば、アッセイ中の陽性シグナルのみを観察することができる。この相互作用が維持されなければ、前記オリゴは、洗浄工程の間に失われ、色の変化は観察されないであろう。

## 【0077】

我々は、黄色の産物は、ヘキサヒスチジンが付加されたNF- $\kappa$ B p50粗可溶化液とジゴキシゲニン標識されたオリゴヌクレオチドを含有するマイクロウェル中のみで検出されことを見出し、これに抗ジゴキシゲニン抗体-アルカリホスファターゼ接合体を添加した。これにより、観察された色の変化は、固定化されたNF- $\kappa$ B p50オリゴヌクレオチド複合体から特異的に得られたものであり、さらに、特異的な固定化のときに、NF- $\kappa$ B p50が活性を保持していることが実証された。

## 【0078】

## 例4

停止コドンが正確に除去された完全長の遺伝子又はcDNAを作成するための別の操作は、コード配列を包含するPCR産物において、5'が陥凹した欠失物の鎖特異的な入れ子状態のセットを作成することが含まれる。これは、 $\lambda$ エキソヌクレアーゼ、E. coli DNAポリメラーゼI、Taq DNAポリメラーゼ、又はT7遺伝子6エキソヌクレアーゼのようなヌクレアーゼを用いて行うことができるであろう。このように、例えば、前記元のPCR産物は、任意の5'から3'方向へのエキソヌクレアーゼを用いて行うことができるであろう。5'が陥凹した欠失物の入れ子状態のセットが一度作成されると、オリゴミックスは、露出した1本鎖領域にアニールすることができる。該オリゴミックスは、各停止コドンの相補部分が3'末端に存在し、すぐ直前に6つのランダムな残基が先行し、その前にIIS型制限部位をコードする所定配列とプライマー「LBM2」(例1参照)に対する相補性認識配列が先行する1群のオリゴからなる。このため、前記オリゴ群の配列は、以下のとおりである。

## 【0079】

## 【表4】

```

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTC TGG AGG AGG AGA NNN NNN TCA-3'
5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTC TGG AGG AGG AGA NNN NNN TTA-3'
5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTC TGG AGG AGG AGA NNN NNN CTA-3'

```

## 【0080】

前記混合物からの1つのオリゴは、センス鎖上に露出された各停止コドンに特異的にアニールし、Taqポリメラーゼのように、又はE. coliのDNAポリメラーゼIのような5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性のように何れかの鎖を置き換える活性を有するDNAポリメラーゼに対するプライマーとなるであろう。新しく生じた二重鎖DNA断片は、続いて、元のPCR産物の5'末端に結合するプライマーと新しくアニール、伸長されたオリゴに特異的に結合するプライマーとを用いて、特異的に増幅することができる。この操作では、前記アニールされたオリゴの3'末端は、二重鎖テンプレートの5'が陥凹した残基に直接隣接することを要しない。前記混合物からのオリゴは、ランダムなヘキサマープライミングと類似した態様で、前記露出した1本鎖DNAテンプレート上の任

意の相補領域にアニールすることができるが、重要なことに、鎖の伸長は、3'末端が絶対的な相補性をもってアニールする場合だけに起こるのであろう。前記混合物中のオリゴの3'末端は、停止コドンに相補的であるようにデザインされているので、オリゴの3'末端が一致する停止コドンに特異的に結合するときだけ、プライマーの伸長とその後のPCR増幅が起こるのであろう。アウトオブフレームの停止コドンと目的の遺伝子の真の停止コドンの下流にあるコドンへの結合も起こり、正確な完全長の遺伝子のみならず、一群の末端切断され、伸長された産物のPCR増幅が得られる。しかしながら、これらは、ペプチドタグへのインフレーム融合物を生じないと思われるので、続く工程で容易にスクリーニングすることができる。

#### 【0081】

記載のごとく5'欠失物の入れ子状態のセットに対してアニーリングと伸長操作を行うことは、全コード領域を包含する完全に1本鎖のDNA又はRNA分子に対してアニーリングと伸長操作を行うことに比べて、著しい利点を有する。これは、伸長の前に、プライマーが特異的にアニールすることができる部位の数が、前記欠失物の入れ子状態のセットの2本鎖部分の存在によって大きく制限されることによるものである。欠失物の入れ子状態のセットの1本鎖部分は、主として、前記遺伝子の3'未翻訳領域を包含し、これは、コード配列の外にある停止コドンを優先して、さらにはより長い伸長産物を優先して、前記伸長産物に強く偏らせる効果を有するであろう。これらの因子は、最初のインフレーム停止コドンが操作全体によって特異的に除去される頻度を著しく増加させるように作用するであろう。実際に、我々は、完全に1本鎖のコード領域テンプレートを用いて、以下の工程(b)に記載したオリゴをアニールし、伸長することを試みたが、我々は、その実験からは、正しく修飾された完全長のクローンを何ら同定できなかった。これに対して、以下に詳述されている操作の結果は、アニーリングと伸長工程のためのテンプレートとして5'欠失物の入れ子状態のセットの使用が、コード配列の最初のインフレーム停止コドンの特異的な除去を促進して、ポリペプチドタグへの完全長のインフレーム融合物を得る上で効果的且つ効率的であることを明らかに実証している。

#### 【0082】

(a) タグ付加に先立つ遺伝子のPCR増幅とエキソヌクレアーゼ消化

このように、我々は、前記増幅において、ここでは「STRリバーサ」プライマーが5'リン酸化されていることを除いて、正確に、例1の工程(a)と(b)に記載されているように、まずGST遺伝子の最初のPCR増幅を行った。続いて、2.5ユニットのλエキソヌクレアーゼ(Novagen Strandaseキット)を用い、標準的な反応緩衝液(67mM グリシン-KOH pH9.4、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、50μg/mL ウシ血清アルブミン)中において、精製されたPCR産物を37℃で40分間消化した。続いて、15分間75℃に加熱することによって該酵素を不活性化した。λエキソヌクレアーゼ酵素は、5'リン酸基のみを基質として認識するので、センス鎖は消化から保護され、それ故、消化産物は、前記PCR産物のアンチセンス鎖の5'末端から得られる欠失物の入れ子状態のセットである。

#### 【0083】

(b) タグを導入するための特異的な連結、伸長、及び増幅

250μMのdNTPと約25倍モル過剰の下記の縮重オリゴ群の存在下で、E. coli DNAポリメラーゼI反応緩衝液中に、5μLのλエキソヌクレアーゼ反応ミックスを希釈した。

#### 【0084】

【表5】

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTC TGG AGG AGG AGA NNN NNN TCA-3'

#### 【0085】

消化された断片とオリゴを37℃で30分間アニールした後、5ユニットのE. coli

DNAポリメラーゼIを加え、その後37℃で3時間反応液をインキュベートした。標準的な条件下で、QIAquick PCRクレンジアップキット(Qiagen)を用いて伸長産物を精製し、プライマー「STフォワード」と「LMB2」により、Pwoポリメラーゼを用いる標準的なPCR反応におけるテンプレートとして使用した。30サイクルのPCR(94℃、1分; 57℃1分; 72℃2分)を実施して、1000bpに及ぶPCR産物を生成させた。

#### 【0086】

上記操作から生じたPCR産物を消化し、例1の工程(e)で記載されているベクターpMM106H中にクローニングした。クローニング操作から得られたコロニーを365nmで可視化して、緑の蛍光を発するコロニーを同定した。73のこのようなコロニーを選択し、レプリカプレーティングを行い、抗Hisタグと抗GST抗体を用いた標準的な条件下でコロニーウェスタンブロットによって分析した。緑の蛍光を発するコロニーのうち58%が、抗Hisタグと抗GST抗体の両者によって陽性に認識されるタンパク質を発現していた。抗Hisと抗GSTの両者に陽性であった15のコロニーからのDNAを増幅、精製、配列決定した。配列決定データによって、完全長のGSTへの10個の完全なインフレーム融合物(すなわち、元のGST遺伝子の最初のインフレーム停止コドンが特異的に切り出され、インフレームのポリアスパラギン、ヘキサヒスチジンタグによって置き換えられたクローン)の存在が確認された。この操作全体を介して我々が取得した修飾の成功率は、それ故、緑の蛍光を発するコロニーの総数の39%である。

#### 【0087】

##### 例5

##### (a) 11の遺伝子のプールから得られたあるタンパク質の同定

我々は、下表に列記された11の異なる遺伝子のプールに特定されていることを除き、正確に例1に記載されているように前記操作を適用した。我々は、アレイ中の各位置が、該操作の結果として付加されたタグを通じて固定化された単一の組換えタンパク質に対応するように、得られた特異的に修飾されたタンパク質のアレイを作成した。続いて、我々は、機能的アッセイによって該アレイをスクリーニングし、前記プールの各タンパク質成分を首尾良く同定した。

#### 【0088】

##### 【表6】

## プール中の11の遺伝子のサイズと機能

| 遺伝子                            | サイズ    | 採取源と機能           |
|--------------------------------|--------|------------------|
| グルタチオンSトランスフェラーゼ               | 950bp  | 細菌; 解毒           |
| NF- $\kappa$ B p50             | 1165bp | ヒト; 転写因子         |
| マルトース結合タンパク質                   | 1325bp | 細菌; 炭水化物の輸送      |
| アラニンラセマーゼ                      | 1342bp | 細菌; 細胞壁の生合成      |
| T細胞活性化因子(NFAT)                 | 1087bp | マウス; 転写因子        |
| インドールグリセロールリン酸シンターゼ            | 1528bp | 細菌; アミノ酸の生合成     |
| ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ           | 920bp  | 細菌; アミノ酸の生合成     |
| トリプトファンシンターゼ( $\alpha$ サブユニット) | 1122bp | 細菌; アミノ酸の生合成     |
| キモトリプシン阻害剤2                    | 389bp  | 大麦; セリンプロテアーゼ阻害剤 |
| ピーナッツアゲルチニン                    | 1096bp | ピーナッツ; 炭水化物の結合   |
| $\beta$ -ラクタマーゼ                | 1040bp | 細菌; 抗生物質耐性       |

## 【0089】

とりわけ、cDNAライブラリーで遭遇する状況を模倣するために、まず、11の遺伝子を全て、同じpTrcHisAベクター骨格の中にサブクローニングした。例1に記載されたプライマー「STフォワード」と「STリバース」は、pTrcHisAベクター骨格内にコードされた遺伝子を増幅するための万能プライマーとなるようにデザインした。プライマー「STフォワード」は、以下のように、多数の制限部位をコードするようにデザインされた。

## 【0090】

## 【表7】

5'-ATG CTG ACG TCA TGA GGC CCA TGG GGC CCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG  
G-3'

Aat II Bsp HI Sfi I

## 【0091】

このように、エキソヌクレアーゼを保護するための3'突出部を作成する目的で、制限酵素Aat IIかSfi Iのうち何れかを使用することができる。修飾操作の最後に定方向のクローニングを行う目的で、本例では、統計的にはライブラリー中をより高い頻度で切断されると思われるので、ここで使用したタグベクターpMM106H中のNco Iクローニング部位と適合する粘着末端を作出し、本プール中の11の何れの遺伝子の内部も切断しないので、我々はBsp HIを使用することを選択した。明らかに、原則的としては、タグベクターがプロモーターの下流にある均等なクローニング部位を含有していれば、制限部位をコードする任意のプライマーを使用することができる。Sfi Iは、8bpの認識配列を有し、このため、ある遺伝子内のSfi I部位のランダムな発生頻度が、Bsp HIのような6bp認識配列の頻度(1/4096)と比べてずっと低い(1/6.5 $\times$ 10<sup>4</sup>)ので、より大きなライブラリーフォーマットにおいてこの点で著しい利点を有す

るであろう。

#### 【0092】

タグベクターpMM106Hは「ATG」ベクターである、すなわち、5' クローニング部位(NcoI)が、ネイティブタンパク質を発現するためのリボソーム結合部位(RBS)の下流に位置するATG開始コドンと重なっている。しかしながら、ここに記載した操作では、我々は、開始コドンに共通の制限部位を有するクローニングされた遺伝子には頼らない。代わりに、我々は、単に、クローニングされた遺伝子自体によって翻訳の開始に必要なシグナルが提供されるように、mRNAを生成するための転写を開始するベクターにコードされたプロモーターに頼っている。このように、この例では、元のプール中の全ての遺伝子は、ATGに位置するクローニング部位の存在又は不存在にかかわらず、RBSが直前に存在する開始コドンと有する。プライマー「STフォワード」は、11の最初のクローン全てで、RBSの上流に結合するので、制限部位をコードする何れかのプライマーを用いたその後の修飾後クローニングは、それらの元のRBSとATGとともに、タグベクターの中に新しく修飾された遺伝子を導入し、このため、翻訳の開始が確実となるであろう。cDNAライブラリーフォーマットでは、全ての完全長のcDNAが、真核細胞の翻訳開始シグナルを含有するそれ自身の5' 未翻訳領域(UTR)を有すると思われる点で、同じ状況が当てはまる。続いて、この場合に適切な翻訳の開始を得るためには、転写開始シグナルをこのようにもう一度与える真核細胞ベクターの中に、その5' UTRとともに、修飾されたcDNAをクローニングすることのみが必要である。それ故、この例で使用したプライマーと均等な万能PCRプライマー群を使用することができる。

#### 【0093】

以下の修飾を用いて、例1に記載したように修飾操作を実施した。プライマー「STフォワード」と「STリバース」を用いる最初のPCR増幅のテンプレートとして、11の遺伝子全ての等モルのプールを使用し、その後、SfiI酵素は8bpの認識配列を有し、11の遺伝子のうち何れの遺伝子の内部も切断しないので、SfiIで断片を消化して5' 末端を保護した。アニーリング工程では、オリゴミックスA(例1参照)を使用した。第2のPCR増幅後に、修飾された断片を2つのポットに分け、これをBpmIとSapIで別個に消化した。統計的には、何れのライブラリー中の遺伝子も、僅かな割合で、SapI部位(7bp認識配列; ランダムな発生確率=1/16,384)又はBpmI部位(6bp認識配列; ランダムな発生確率=1/4,096)の何れかを含有していると思われるが、両者を含有する割合はずっと少ないであろう(ランダムな発生確率=1/6.7×10<sup>7</sup>)。2つのII型制限酵素は、このように、任意のある完全長の遺伝子の特異的な修飾が、その遺伝子内の1又は他の制限部位の存在によって除外されないことを効果的に確実にするために、別個に使用した。

#### 【0094】

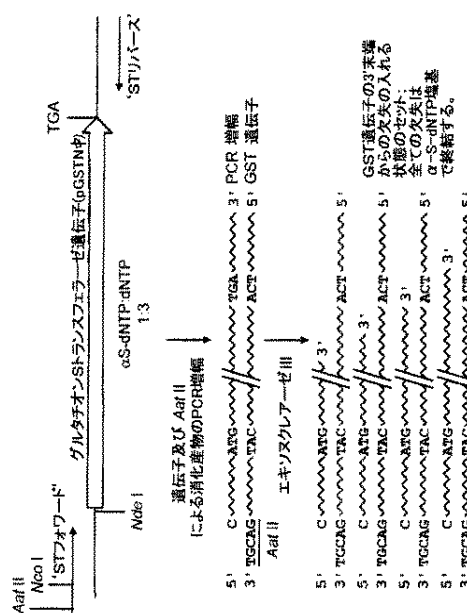
続いて、マング・ビーンヌクレアーゼによる処理及びBspHIによる消化のために、前記2つのポットからの消化された断片をプールした。得られた断片を4つの異なるサイズ範囲に、ゲルで精製し、より小さな挿入物が優先的に連結されるのを避けるために、ベクターpMM106H(それ自身、NcoIとHpaIで完全に消化され、ゲルで精製された)に別々に連結した。UV光(365nm)下で、形質転換された細胞を可視化し、ウェスタンブロットによる分析のために、肉眼で、緑の蛍光を発するコロニーを選別した。形質転換されたコロニーの総数の約30%が緑の蛍光を発し、そのうち、73%が、抗Hisタグ抗体によって認識されるタンパク質を発現していた。深い96ウェルのブロック中の液体培地1.5mLの中に、190の緑のHis陽性コロニーを植え付け、一晚増殖させた。遠心によって細胞を採集し、凍結融解/リゾチームによって溶解した。続いて、ニッケルNTAでコートされた96ウェルプレートの各ウェルに粗可溶化液を加え、洗浄によって未結合のタンパク質を除去して、His付加された組換えタンパク質をウェルに固定化した。続いて、例2に記載したアッセイを用いて固定化したタンパク質のNF-κB活性をアッセイし、黄色の呈色の出現によって、陽性の「ヒット」を含有するウェルを同定した。3つのクローンが、陽性の「κBモチーフ」DNA結合活性を示した。該陽性

【0095】

【図面の簡単な説明】

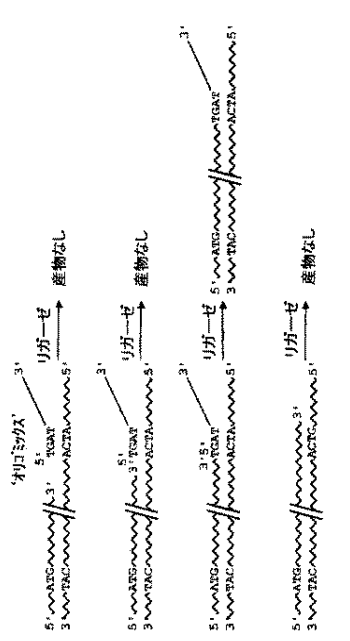
【図1 e】 GSTによって触媒された、グルタチオンと1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼンとの間の反応を示す図。

【図1b】

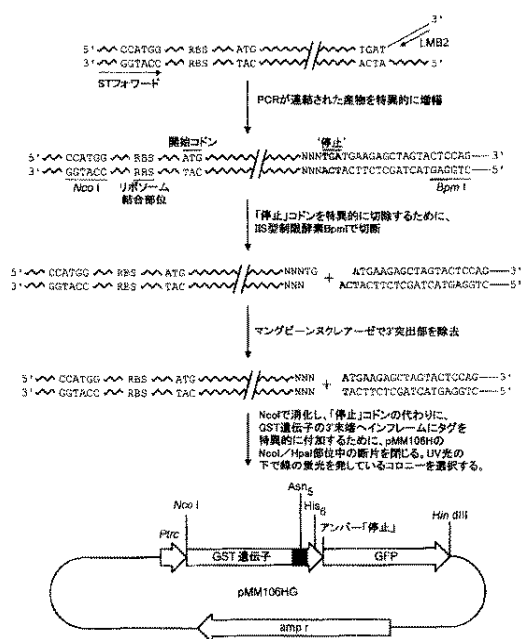




【図1c】

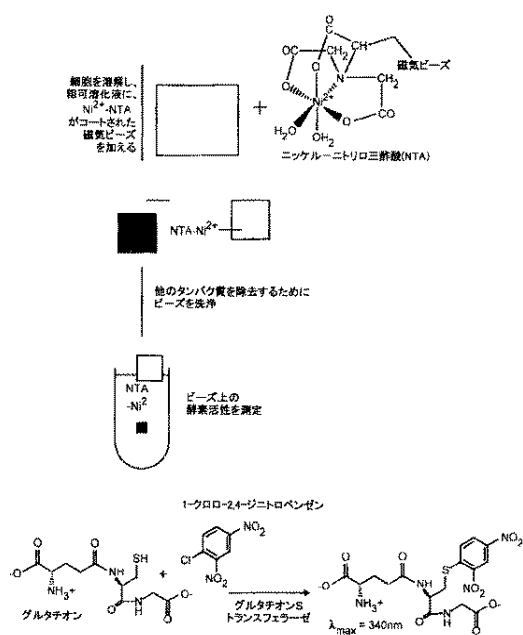


【図1d】



【図1e】

液体培地中で各コロニーを増殖させ、発現を誘導する



(51) Int.Cl. F I  
G O 1 N 33/50 (2006.01) G O 1 N 33/50 Z  
G O 1 N 33/15 (2006.01) G O 1 N 33/15 Z

(31) 優先権主張番号 0019888.7

(32) 優先日 平成12年8月11日(2000.8.11)

(33) 優先権主張国 英国(GB)

(74) 代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(72) 発明者 ブラックバーン、ジョナサン・マイケル

イギリス国、シービー2・4エーティー、ケンブリッジ、バブラハム、バブラハム・ホール、ザ・  
バブラハム・バイオインキュベーター、センス・プロテオミック・リミテッド内

(72) 発明者 サザーランド、ジョン・デビッド

イギリス国、エスケー12・1イーエス、チェシャー、ポイントン、ニューステッド・クローズ  
7

(72) 発明者 サマダー、ミタリ

イギリス国、シービー4・3エルティー、ケンブリッジ、チャッツワース・アベニュー 40

(72) 発明者 マルダー、ミッチェル・アンネ

イギリス国、シービー5・8エイチ4、ケンブリッジ、ベシュ・ロード 82

(72) 発明者 コズロースキー、ローランド・ゼット

イギリス国、シービー2・4エーティー、ケンブリッジ、バブラハム、バブラハム・ホール、ザ・  
バブラハム・バイオインキュベーター、センス・プロテオミック・リミテッド内

審査官 山村 祥子

(56) 参考文献 国際公開第00/004382 (WO, A1)

国際公開第99/039210 (WO, A1)

PANDEY AKHILESH, NATURE, 2000年 6月15日, V405 N6788

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53-579

G01N 37/00

C12N 15/09

C12Q 1/68