

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4781628号

(P4781628)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 Z N A D

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 F

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 37/00 1 O 2

請求項の数 19 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2003-549912 (P2003-549912)
(86) (22) 出願日 平成14年12月5日 (2002.12.5)
(65) 公表番号 特表2005-512055 (P2005-512055A)
(43) 公表日 平成17年4月28日 (2005.4.28)
(86) 国際出願番号 PCT/GB2002/005499
(87) 国際公開番号 W02003/048768
(87) 国際公開日 平成15年6月12日 (2003.6.12)
審査請求日 平成17年12月2日 (2005.12.2)
(31) 優先権主張番号 60/335,806
(32) 優先日 平成13年12月5日 (2001.12.5)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/410,815
(32) 優先日 平成14年9月16日 (2002.9.16)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504216376

センス プロテオミック リミテッド
イギリス国 オックスフォードシャー オ
ーエックス5 1ピーエフ オックスフォ
ード ヤーントン サンディー レーン
ベグブローク サイエンスパーク
Begbroke Science Pa
rk, Sandy Lane, Yarn
ton Oxford, Oxfordshi
re OX5 1PF, United K
ingdom

(74) 代理人 100147485

弁理士 杉村 憲司

(74) 代理人 100119530

弁理士 富田 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対立遺伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

表面を含むタンパク質アレイであって、該表面上には、空間的に規定された位置に少なくとも2つのタンパク質部分が配置されており、該タンパク質部分は、同じ染色体遺伝子座に位置される目的とするDNA配列の天然に存在する改変体または目的とするDNA配列の選択的スプライス転写物のタンパク質部分である、タンパク質アレイであって、該タンパク質アレイは、同じ実験において、すべてのタンパク質が一緒にアッセイされることを可能にするものである、タンパク質アレイ。

【請求項2】

請求項1に記載のタンパク質アレイであって、前記1つ以上のタンパク質部分が、目的とするDNA配列の天然に存在する改変体または選択的スプライス転写物の、合成等価物に由来する、タンパク質アレイ。

【請求項3】

請求項1に記載のタンパク質アレイであって、前記少なくとも2つのタンパク質部分が、目的とする野生型遺伝子により発現されるタンパク質部分を、その1つ以上の天然に存在する変異を含む1つ以上の遺伝子により発現される少なくとも1つのタンパク質部分とともに含む、タンパク質アレイ。

【請求項4】

請求項3に記載のタンパク質アレイであって、前記変異が、ミスセンス変異、単一ヌクレオチド多型、欠失変異、および挿入変異からなる群より選択される、タンパク質アレイ

(2) 遺伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

。

【請求項5】

請求項1～4のうちのいずれか1項に記載のタンパク質アレイであって、前記タンパク質部分が、疾患状態に係るタンパク質、薬物代謝に係るタンパク質、または特徴付けられていないタンパク質を含む、タンパク質アレイ。

【請求項6】

請求項1～5のうちのいずれか1項に記載のタンパク質アレイであって、前記タンパク質部分が、野生型p53およびその対立遺伝子改変体またはその選択的スプライス転写物をコードする、タンパク質アレイ。

【請求項7】

請求項1～5のうちのいずれか1項に記載のタンパク質アレイであって、前記タンパク質部分が、薬物代謝酵素をコードする、タンパク質アレイ。

【請求項8】

請求項7に記載のタンパク質アレイであって、前記薬物代謝酵素が、野生型p450およびその対立遺伝子改変体またはその選択的スプライス転写物である、タンパク質アレイ。

。

【請求項9】

タンパク質アレイを作製する方法であって、該方法は、

a) 同じ染色体遺伝子座に位置される目的とするDNA配列の2つ以上の天然に存在する改変体または目的とするDNA配列の選択的スプライス転写物のDNAコード配列であるDNAコード配列を提供する工程；

b) 該コード配列を発現させて、1つ以上の個別のタンパク質部分を提供する工程；

c) 該タンパク質部分を精製する工程；

d) 該タンパク質部分を、表面上の空間的に規定された位置に配置して、アレイを生じる工程；

を包含する、方法であって、該タンパク質アレイは、同じ実験において、すべてのタンパク質と一緒にアッセイされることを可能にするものである、方法。

【請求項10】

請求項9に記載の方法であって、前記工程c)およびd)が、組み込まれたタグを介して前記アレイ上の前記タンパク質部分を同時に精製および単離することによって1つの工程中に合わされている、方法。

【請求項11】

請求項9に記載の方法であって、前記工程c)が省略されており、そして前記個別のタンパク質部分が、発現宿主細胞由来の他のタンパク質とともに存在する、方法。

【請求項12】

請求項9に記載の方法であって、前記目的とするDNA配列が、疾患状態に係るタンパク質、薬物代謝に係るタンパク質、または特徴付けられていないタンパク質をコードする、方法。

【請求項13】

請求項12に記載の方法であって、前記目的とするDNA配列が、p53をコードする、方法。

【請求項14】

請求項12に記載の方法であって、前記目的とするDNA配列が、薬物代謝酵素をコードする、方法。

【請求項15】

請求項14に記載の方法であって、前記薬物代謝酵素が、野生型p450およびその対立遺伝子改変体またはその選択的スプライス転写物である、方法。

【請求項16】

目的とするDNA配列の天然に存在する改変体または選択的スプライス転写物の表現型の決定における、請求項1～8のうちのいずれか1項に記載のアレイの使用であって、該

(3) 遺伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

DNA配列は、該DNA配列に由来する少なくとも1つのタンパク質部分により示され、かつ該タンパク質部分は、該アレイ上に存在する、使用。

【請求項17】

1つ以上のタンパク質と相互作用する分子について1組のタンパク質部分をスクリーニングする方法であって、該方法は、

a) 1つ以上の試験分子を、請求項1～8のうちのいずれか1項に記載のアレイと接触させる工程であって、該アレイは、該1組のタンパク質部分を保有する、工程；および

b) 該アレイ上で1つ以上の試験分子と1つ以上のタンパク質との間の相互作用を検出する工程

を包含する、方法。

【請求項18】

1組のタンパク質部分のメンバーの相対的特性を同時に決定する方法であって、該方法は、

a) 該1組のタンパク質部分を保有する請求項1～8のうちのいずれか1項に記載のアレイを、1つ以上の試験物質と接触させる工程；および

b) 該アレイ上で、該試験物質と該組のメンバーとの相互作用を観察する工程を包含する、方法。

【請求項19】

請求項18に記載の方法であって、前記タンパク質部分のうちの1つ以上が薬物代謝酵素であり、該酵素は、補助タンパク質との接触または化学処理により活性化される、方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

単一ヌクレオチド多型 (SNP) は、生物のDNA間における一塩基の差異である。これは、同一の同胞 (sibling) またはクローンを除く個体間における表現型変動の遺伝子成分の多くの基礎をなす。この変動は、疾患に対する素因、疾患の発症年齢、疾患の重篤度、および処置に対する応答などの特徴を含むので、SNPの同定および目録作成は、「遺伝子医学」をもたらす [Chakravarti, A. Nature 409 822-823 (2001)]。薬理ゲノム学 (pharmacogenomics) のような分野は、治療プログラムを個々の人物に調整するために、SNPと、薬物処置に対する応答との間の相関関係を確立することを目的とする。より広範には、鎌状赤血球貧血およびアルツハイマー病のような状態およびHIV抵抗性および移植拒絶のような問題における特定のSNPの役割が、十分に認識されている。しかし、SNPとその表現型との間の相関関係は、通常は、集団データの統計学的分析から誘導され、観察される表現型変動の分子機構を解明する試みは、ほとんどなされない。高スループット配列決定プロジェクトの出現が、ヒトゲノムの完全配列を決定することを目的とした [The International Human Genome Mapping Consortium, Nature 409 860-921 (2001); Venter, J. C. Science 291 1304-1351 (2001)] 時まで、2,000-3,000個のSNPしか同定されていなかった。より最近、142万個のSNPが、ヒト配列を付随して論文において、研究者のコンソーシアムによって目録作成された [The International SNP Map Working Group, Nature 409 928-933 (2001)]。このうち、6,000個が、遺伝子中に存在した (「コード」SNP)。コードSNPは、それがタンパク質のアミノ酸配列を変化させるか否かによってさらに分類され得、変化が生じる場合には、タンパク質機能が影響されて、表現型変動を生じ得る。従って、この大量の改変体配列の表現型を迅速に決定し得る装置および方法論について、未だ満たされていない必要性が存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0002】

本発明者らは、本明細書中において、高度に相同性であるDNAコード配列または関連するDNAコード配列のタンパク質産物を、並列様式でアッセイするためのタンパク質アレイおよびその使用を記載する。

【0003】

「高度に相同性または関連する」によって、共通の配列を共有し、かつ1つ以上の天然に存在する変異（例えば、単一ヌクレオチド多型、欠失、もしくは挿入）によってのみ異なるDNAコード配列、またはハプロタイプ（ハプロタイプは、通常は特定の遺伝子の文脈における、染色体上の変化もしくは変異の組み合わせである）と考えられるDNAコード配列が、意味される。このような高度に相同性であるDNAコード配列または関連するDNAコード配列は、一般には、同じ遺伝子の天然に存在する改変体である。

【0004】

本発明によるアレイは、表面上に空間的に規定されたパターンで配置された複数（例えば、2つ以上）の個別のタンパク質をある形式で有し、その形式によって、そのタンパク質の特性（例えば、活性または機能）が、そのアレイに問い合わせることによって並列して調査またはアッセイされ得る。

【0005】

本発明に従うタンパク質アレイ、および変異（例えば、コードSNP、すなわち、発現タンパク質をなお生じるSNP変異）から生じるタンパク質機能の表現型変化をアッセイするためのその使用は、SNPについての既存のDNAベース技術および他の変異分析とは完全に異なり、そしてそれを超える利点を有する[Shi, M. M Clin Chem 47:164~72 (2001) に概説される]。これらの後者の技術としては、新規なSNPを同定するための高スループット配列決定法および電気泳動法、または診断技術（例えば、高密度オリゴヌクレオチドアレイ）[例えば、Lindblad-Toh, K. Nat Genet 24 381~6 (2000)]、または既知のSNPに対する目的とする個別の遺伝子のプロファイリングを可能にする高スループット短読取り（short-read）配列決定技術[例えば、Buetow, K. H. Proc Natl Acad Sci USA 98 581~4 (2001)]が挙げられる。重要なことには、本明細書中に記載される本発明とは対照的に、多型の表現型効果は、DNAレベルでアッセイされただけである場合には、未知のままである。

【0006】

実際、コードSNPがコードするタンパク質に対するそのコードSNPの影響は、比較的少数の例外を除いて、特徴付けられていない。これらのSNPの影響に対する目録作成された多くのSNPのほとんど機能的ではないデータを伴うタンパク質の例としては、p53、p10（両方とも癌に関連する）、およびシトクロムP450（薬物代謝）が挙げられる。生成される大量のSNPデータを取り扱うために必要とされるに十分に高スループットに、SNPがコードするタンパク質の機能性を調査し得る方法は、現在はあるとしてもごくわずかしかな存在しない。バイオインフォマティクスまたはコンピューターモデリングが、特に結晶構造が利用可能な場合には可能であるが、生じる仮説は、実験により（すなわち、生化学的アッセイを介して）なお確認される必要がある。しかし頻繁には、その変異の役割は、バイオインフォマティクス分析またはコンピューターベース分析の後でも、不明のままである。従って、本発明により提供されるタンパク質アレイは、SNPの機能分析への最も強力な経路を提供する。

【0007】

関連するDNA分子（例えば、1つ以上の単一ヌクレオチド多型により異なるDNA分子）由来のタンパク質を、試験管形式で個別のアッセイすることが可能であるが、この作業の連続的性質および関与する大きなサンプル容量により、このアプローチは煩雑かつ魅力のないものになる。関連するタンパク質をマイクロタイタープレート中または顕微鏡スライド上にてアレイ作製することによって、多くの種々のタンパク質（数百個または数千個）が、ほんの小さなサンプル容量（マイクロアレイにおける場合はわずか数μlだけで）を

(5) 遺伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

使用して同時アッセイされ得、これにより、たとえば、SNPの機能分析が、経済的に実行可能になる。すべてのタンパク質が、同じ実験において一緒にアッセイされ得、このことは、物質の差次的取扱いに起因する誤差の原因を減少する。さらに、それらのタンパク質を固体支持体に直接つなげると、結合濃度を測定する前に未結合リガンドを洗い流すことを必要とする（これは、溶液ベースアッセイまたは単一液相アッセイにおいて利用可能ではない特徴である）結合アッセイを、容易にする。

【0008】

本発明のアレイにより提供される、当該分野で現在公知である装置および方法を超える特定の利点は、以下の通りである：

- ・密接に関連するタンパク質（例えば、コードSNPに由来するタンパク質）を、コードする機能について大量に並列分析すること
- ・既存の方法よりも良好でない場合には、既存の方法に少なくとも匹敵する分析の感度
- ・以前には可能ではなかった様式での定量的な比較機能分析が可能であること
- ・タンパク質：タンパク質相互作用、タンパク質：核酸相互作用、タンパク質：リガンド相互作用、またはタンパク質：低分子相互作用、および翻訳後修飾との、インサイチュ「オンチップ（on-chip）」での適合性
- ・本発明に従う並列タンパク質アレイが、スポット密度とは無関係であること
- ・マイクロアレイ形式は、高価な可能性があるリガンドを小容量使用して分析を実行するのを可能にすること
- ・本発明に従う並列タンパク質アレイにより提供される情報は、薬物開発分野、薬理ゲノム学の分野、および診断分野にとって極めて価値があること
- ・他の有用な並列タンパク質アレイが、目的とするDNA配列の非天然（合成）変異に由来するタンパク質を含み得る。そのようなアレイは、そのようにして生成される改変体タンパク質と他のタンパク質、核酸、および他の分子（例えば、リガンドまたは候補/試験低分子）との間の相互作用を調査するために使用され得る。そのような変異誘発を実行するための適切な方法は、Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, R E, Moore, DD, Siedman, JG, Smith JAおよびStuhl, K. により編集された、Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻、第8章に記載される。

【0009】

従って、1つの局面において、本発明は、表面を含むタンパク質アレイを提供し、この表面上には、空間的に規定された位置に少なくとも2つのタンパク質部分が配置されており、そのタンパク質部分は、目的とするDNA配列の天然に存在する改変体のタンパク質部分である。

【0010】

本明細書中にて規定されるタンパク質アレイは、表面上に一定パターンで存在する、空間的に規定されたタンパク質部分の配置である。好ましくは、このタンパク質部分は、直接的または間接的のいずれかで、この表面に付着されている。この付着は、非特異的（例えば、表面上への物理的吸着によって、または非特異的共有結合相互作用の形成によって）であり得る。好ましい実施形態において、このタンパク質部分は、各タンパク質部分に付着している共通マーカ一部分を介して、表面上に付着している。別の好ましい実施形態において、このタンパク質部分は、その表面につながれている小胞またはリポソームに取り込まれ得る。

【0011】

本明細書中に規定される表面は、平坦領域または等高な（contoured）領域であり、その領域は、化学処理によってコート/誘導体化されていても、されていなくてもよい。例えば、その領域は、

ガラススライド、

1つ以上のビーズ（例えば、当該分野で公知の磁性ビーズ、誘導体化ビーズ、および/または標識ビーズ）、

(6) 遺伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

ポリプロピレンスライドまたはポリスチレンスライド、
ポリプロピレンマルチウェルプレートまたはポリスチレンマルチウェルプレート、
金対象物、シリカ対象物、または金属対象物、
ニトロセルロース製膜、PVDf 製膜、ナイロン製膜、またはホスホセルロース製膜
であり得る。

【0012】

ビーズが使用される場合、個々のタンパク質、タンパク質対、または改変体タンパク質のプール（例えば、「ショットガンスクリーニング」用。目的とするタンパク質が存在し得るタンパク質群を個別に同定するため；そのような群は、その後分離されそしてさらに調査される（コンビナトリアル化学の分野で公知のプール方法と同様））が、そのアレイの空間的定義または分離を提供するために、個別のビーズに結合され得る。その後、そのビーズは、区画された様式（例えば、マイクロタイタープレートのウェル中または別個の試験管中）で、別個にではあるが並列して、アッセイされ得る。

【0013】

従って、本発明に従う表面を含むタンパク質アレイは、種々のタンパク質を保有する一連の別個の固相表面（例えば、ビーズ）として存在し得、そのアレイは、実験において別個の表面の空間的に規定されたパターンまたは配置により形成される。

【0014】

好ましくは、その表面のコートリングは、非特異的なタンパク質吸収に抵抗し得る。その表面コートリングは、それ自体は、多孔性であっても、非孔性であってもよい。さらに、好ましい実施形態において、その表面コートリングは、各タンパク質部分上のマーカー部分との特異的相互作用を、直接的または間接的（例えば、表面に結合したタンパク質もしくはペプチドもしくは核酸を介して）のいずれかで提供する。以下の実施例に記載される本発明の実施形態は、捕捉表面としてSAM2™膜（Promega, Madison, Wisconsin, USA）を使用するが、種々の他の表面、ならびに当該分野で公知のマイクロアレイ形式またはマイクロウェル形式の表面が、使用され得る。

【0015】

タンパク質部分は、一般的には、遺伝子またはその遺伝子の天然に存在する改変体であるDNA配列によりコードされる、タンパク質またはポリペプチドである。そのタンパク質部分は、コードされたタンパク質の形態を取り得るか、またはアッセイにおいてそのアレイへの結合または分析を容易にするために、さらなるアミノ酸（そのタンパク質部分が由来するDNA配列によって元々はコードされていない）を含み得る。その天然に存在する遺伝子によりコードされるアミノ酸配列のみを、さらなる配列なしで有するタンパク質の場合、そのようなタンパク質は、その改変体間の共通特徴によってそのアレイに結合され得る。例えば、1組の改変体タンパク質が、結合タンパク質を介して、またはその組中の個々のタンパク質の不変部分または共通部分に結合し得る抗体を介して、そのアレイに付着され得る。好ましくは、本発明に従うタンパク質部分は、N末端またはC末端のいずれかで、そのアレイへの付着を容易にするためのマーカー部分で（そのタンパク質をコードするDNA配列と、タグをコードするDNA配列との組み合わせを介して）タグ化されたタンパク質である。

【0016】

アレイのパターン中の各位置は、例えば、
・単一タンパク質型のサンプル（モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー、もしくはより高次のマルチマーの形態）、または
・相互作用分子に結合した単一タンパク質型のサンプル（例えば、核酸分子、抗体、他のタンパク質、もしくは低分子）
のいずれかを含み得る。その相互作用分子は、それ自体が、さらなる分子と相互作用し得る。例えば、ヘテロマータンパク質の1つのサブユニットが、そのアレイに付着され得、そして第2のサブユニットまたはサブユニット複合体が、付着したタンパク質サブユニットとの相互作用を介して、そのアレイに繋がれ得る。次に、その第2のサブユニットまた

はサブユニット複合体は、その後、さらなる分子（例えば、候補薬物または抗体）、または

・ 合成分子に結合した単一タンパク質型のサンプル（例えば、ペプチド、化合物）、または

・ 2つの異なる改変体タンパク質もしくは「ハプロタイプタンパク質」のサンプル（例えば、各々が、変異または多型の異なる相補体を保有する（例えば、「タンパク質1」は、SNP「A」を保有し3塩基対欠失「X」を保有するDNA配列に由来し、「タンパク質2」は、SNP「A」、SNP「B」および3塩基対挿入「Y」を保有するDNA配列に由来する）。そのような配置は、個体における2つの異なるタンパク質改変体のヘテロ接合性の存在を模倣し得る。

【0017】

好ましくは、各位置にあるタンパク質部分は、実質的に純粋であるが、特定の環境において、2個と100個との間の個数の異なるタンパク質部分の混合物が、少なくとも1つのタンパク質部分がタグ化されているアレイパターンで、各位置に存在し得る。従って、1つより多くの改変体DNA配列の発現に由来するタンパク質が、目的とする改変体を含む組を決定するために1組の改変体を大量に初期スクリーニングするために、単一位置に付着され得る。

【0018】

下記の実施例に記載される本発明の実施形態は、その表面上のタンパク質を精製するためにビオチンタグを使用するが、そのアレイの機能性は、使用されるタグとは無関係である。

【0019】

「目的とするDNA配列の天然に存在する改変体」は、共通配列を共有し、かつ天然に存在する（すなわち、集団中に存在し、人工的には導入されていない）1つ以上の単一ヌクレオチド多型、欠失、もしくは挿入、またはハプロタイプであると考えられる配列（ハプロタイプは、通常は特定の遺伝子の文脈における、染色体上の改変体特徴の組み合わせである）によってのみ異なる、タンパク質コードDNA配列として、本明細書中で定義される。一般には、そのようなDNA配列は、それが共通する染色体位置に位置し、かつ類似するタンパク質（異なる表現型を有し得る）をコードするという点で、同じ遺伝子に由来する。換言すると、そのような改変体は、一般的には、1つ以上の変異を含む同じ遺伝子の天然に存在するバージョン、またはその合成等価物であって、異なるコドンを有するが同じ「野生型」タンパク質もしくは集団中に存在することが既知であるような改変体タンパク質をコードするものである。

【0020】

有用なことには、集団中に既知のすべての変異を有するDNA分子が、本発明のアレイに結合する1組のタンパク質部分を生成するために使用される。必要に応じて、そのアレイは、変異の部分集合（例えば、既知のすべての生殖系列変異もしくは遺伝性変異、または臨床的に関連する変異もしくは臨床的に重要な変異の部分集合）を保有するDNA分子に由来する改変体タンパク質の部分集合を含み得る。本明細書中で規定される関連するDNA分子は、生じる発現タンパク質を生成するために導入された単なる共通タグ配列だけよりも多く関連している。それは、そのDNA分子の関連性と関連するそのようなタグに追加された配列である。その関連する配列は、一般的には、遺伝子の天然コード配列、および変異により生じる改変体形態である。実際には、本発明のアレイは、1つのDNA分子の配列において、別の（またはよりしばしば、野生型コード配列（もしくは集団中の最も一般的な改変体））DNA分子と、1～10個、1～7個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個の別個の位置において異なる（すなわち、変異している）DNA分子に由来する、タンパク質部分を保有する。各々の別個の配列位置（例えば、塩基対342（この位置は、単一塩基であり得る）もしくは「塩基対502～塩基対525」（この位置は、塩基領域であり得る）のような別個の位置）における差異または変異は、塩基変化（例えば、「G」から「A」への置換）のような点変異であり得る。これは、野

(8) 遺伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

生型配列中の1つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている「ミスセンス」変異をもたらし得る。「単一ヌクレオチド多型」は、単一のヌクレオチドの変異である。あるいは、この変異は、1～200個、1～100個、1～50個、1～20個、または1～10個の塩基の、欠失または挿入であり得る。例を与えるために、挿入変異は、ハンティングトン病のような「3つ組 (triplet) 反復」障害において見出される—このような挿入変異に対応するタンパク質改変体は、その遺伝子の種々の変異体形態に由来し得、そして、その表現型の調査を可能にするために、このアレイに付着され得る。

【0021】

従って、関連するDNA分子に由来するタンパク質は、構造が非常に異なり得ることが、予期される。例えば、そのDNA分子を短縮する変異を受けた関連するDNA分子は、フレームシフトを導入するか、または終止コドンを生型コード配列全体にわたって部分的に導入し、より小さいタンパク質産物またはより短いタンパク質産物を生じ得る。同様に、変異は、その改変体タンパク質が、さらなる構造（例えば、反復ドメインまたは多数のさらなるアミノ酸）をそのタンパク質の末端もしくはそのタンパク質配列内のいずれかに有するようにさせ得る。そのようなタンパク質（関連するDNA配列に由来する）は、本発明の範囲内に包含される。

【0022】

上記のように、目的とするDNA配列の野生型遺伝子（またはその天然に存在する改変体）の合成等価物によりコードされるタンパク質部分を保有するアレイもまた、本発明の範囲内に包含される。

【0023】

また、改変体（すなわち、変異した）配列を有し、差次的な翻訳前プロセッシングを受けている生成物（例えば、選択的スプライス転写物）または差次的翻訳後プロセッシングを受けている生成物（例えば、グリコシル化が、1つの発現タンパク質中の特定のアミノ酸にて生じるが、基礎となるDNA配列中のコドン変化に起因して、別の発現タンパク質においては生じず、グリコシル化アミノ酸を存在させなくする）を生じる関連するDNA分子に由来するタンパク質部分を保有するアレイも、本発明の範囲内に包含される。

【0024】

一般に、本発明に従う関連するDNA分子は、同じ染色体遺伝子座に位置する遺伝子に由来する。すなわち、その関連するDNA分子は、天然の変異の結果として異なる1つの遺伝子の単一コピーに由来する同じタンパク質コード配列の異なるバージョンである。

【0025】

そのタンパク質の野生型（または集団中の最も一般的な改変体DNA配列によりコードされるタンパク質）が、関連するDNA分子に由来するタンパク質の相対活性が比較され得る参照物として役立つように、そのアレイ上のタンパク質部分の1つとして、好ましくは含まれる。そのアッセイのアウトプットは、変異した遺伝子を含む関連するDNA分子が、

- (1) 野生型タンパク質と匹敵する機能を有するタンパク質
 - (2) 野生型よりも低いレベルもしくは高いレベルの機能を有するタンパク質
 - (3) 検出可能な機能を有さないタンパク質
 - (4) 変化した翻訳後修飾パターンを有するタンパク質
 - (5) 余分な成分（例えば、ペプチド、抗体、もしくは低分子薬物候補）の添加により改変され得る活性を有するタンパク質
 - (6) 翻訳後修飾（例えば、チップ上でインサイチュでの、例えば、リン酸化）により改変され得る活性を有するタンパク質
 - (7) アッセイにおいて種々の環境条件（例えば、イオン強度、温度、もしくはpH）下で変化した機能を有するタンパク質
- をコードするか否かを示す。

【0026】

本発明のアレイのタンパク質部分は、疾患状態に關係するタンパク質、薬物代謝に關係

するタンパク質を含み得るか、または特徴付けられていないタンパク質であり得る。1つの好ましい実施形態において、そのタンパク質部分は、野生型p53およびその対立遺伝子改変体をコードする。別の好ましい実施形態において、そのアレイは、薬物代謝酵素（好ましくは、野生型p450およびその対立遺伝子改変体）をコードするタンパク質部分を含む。

【0027】

本発明のアレイに付着したタンパク質改変体の数は、天然に存在する改変体コード配列の数、または人工的に生成するために十分に実験的、商業的、もしくは臨床的に興味深い改変体コード配列の数によって、決定される。野生型タンパク質および単一改変体を保有するアレイは、調査者にとって有用である。しかし、実際に、高スループットアッセイについてのこのようなアレイの適切性を利用するために、1～10000個、1～1000個、1～500個、1～400個、1～300個、1～200個、1～100個、1～75個、1～50個、1～25個、1～10個、または1～5個の関連するDNA分子が、アレイ上のそのコードタンパク質によって示されることが、予期される。例えば、p53の遺伝子（本明細書中に記載される実施例のうちの1つの対象物）の場合、約50個の既知の生殖系列変異または遺伝性変異、および100個より多くの既知の体細胞変異が、現在存在する。個体は、当然、2つの異なる生殖系列変異を遺伝し得る。従って、p53改変体タンパク質アレイは、異なる位置において各々単離されている50個の生殖系列変異に由来するタンパク質、異なる位置において各々単離されている（かまたは、各々の位置に10個の群の状態）800個の体細胞コード変異の臨床的に重要な部分集合（タンパク質が発現され得る場合）に由来するタンパク質、および異なる位置に各々位置する50個の生殖系列変異の可能なすべての対合組み合わせに由来するタンパク質を、保有し得る。従って、本発明のアレイは、1000個より多くの異なる天然に存在する変異を含む個別のDNA分子を有用に示し得、従って、単独で位置するかまたは他の改変体とともに、それに由来するタンパク質改変体のより多くの（例えば、10000個以上の）別個のサンプルまたは「スポット」を保有し得ることが、観察され得る。

【0028】

第2の局面において、本発明は、タンパク質アレイを作製する方法を提供し、この方法は、

- a) 目的とするDNA配列の2つ以上の天然に存在する改変体由来するDNAコード配列を提供する工程；
 - b) そのコード配列を発現させて、1つ以上の個別のタンパク質部分を提供する工程；
 - c) そのタンパク質部分を精製する工程；
 - d) そのタンパク質部分を、表面上の空間的に規定された位置に配置して、アレイを生じる工程；
- を包含する。

【0029】

上記の工程c)およびd)は、好ましくは、1つの工程中に合わされている。これは、「表面捕捉」によってなされ得る。「表面捕捉」によって、下記の実施例において記載されるように、組み込まれたタグを介して上記アレイ上のタンパク質部分を同時に精製および単離することが、意味される。さらに、上記工程c)は省略され得る。なぜなら、このタンパク質調製物が、単離されたタグ化タンパク質の位置において純粋であることは必要ではないからである。このタグ化タンパク質は、そのアレイが部分を構成するアッセイによって純粋性が必要ではない場合には、宿主生成細胞の粗溶解物から分離される必要はない。

【0030】

そのアレイのタンパク質部分を生成するように発現されるDNA分子は、当該分野で公知の技術（例えば、Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Siedman, JG, Smith, JAおよびStruhl, K. により編集された、Current Protocols in Molecular

Biology, 第1巻、第8章を参照のこと)を使用して、作製され得る。クローン化DNAのインビトロ操作が容易であると、変異(例えば、SNP)を、標準的な分子生物学的技術(例えば、野生型遺伝子をテンプレートとして使用するPCR変異誘発)によって作製することが、可能である。従って、その変異(例えば、SNP)の身元の知見(しばしば、電子データベースにおいて入手可能)のみが、タンパク質アレイ製造において必要とされ、DNA分子を含む実際の変異は、必要ではない。目的とするタンパク質をコードする野生型遺伝子が、まず、適切な宿主における発現用のDNAベクター中にクローン化される。発現宿主は、E. coliに限定される必要がないこと—酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞が使用され得ることが、当業者によって理解される。真核生物宿主の使用が、調査中のタンパク質が翻訳後修飾(例えば、グリコシル化)を受けることが公知である場合には、望ましくあり得る。発現およびタンパク質活性を確認した後、野生型遺伝子は、望ましいSNPを導入するように変異される。SNPの存在は、再クローニング後の配列決定によって、確認される。

【0031】

そのアレイを作製するために、クローンは、マイクロタイタープレート形式(しかし、包括的ではない)にて増殖され得る。これは、スライドまたはプレート形式へのアレイ作成のための便利でありかつ高スループット形式を提供する形式での、サンプルの並列処理を可能にする。タンパク質発現が誘導され、その後、クローンが、アレイ作製のために処理される。これは、アフィニティクロマトグラフィによるそのタンパク質の精製、または組換えタンパク質に対して選択的である表面(「捕捉表面」)上にアレイ作製する準備ができてい溶解物の調製を包含し得る。従って、このDNA分子は、N末端またはC末端のいずれかにおいてマーカー部分でタグ化されたタンパク質部分を得るために、融合タンパク質として発現され得る。本明細書中に記載されるように、このようなタグは、そのタンパク質を精製するため、またはその表面もしくはそのアレイにタンパク質を付着するために、使用され得る。簡便には、そして好ましくは、そのタンパク質部分は、発現宿主溶解物から同時精製され、そしてマーカー部分によってアレイに付着される。生じたタンパク質アレイは、その後、すべてのタンパク質の機能を並列してアッセイするため、従って、高スループット様式でアッセイするために、使用され得る。

【0032】

第3の局面において、本発明は、関連するDNA分子由来の1組のタンパク質部分のメンバーの相対的特性を同時の決定する方法を提供し、この方法は、本明細書中に記載のアレイを提供する工程、そのアレイを試験物質と接触させる工程;およびそのアレイ上で、その試験物質と各組のメンバーとの相互作用を観察する工程、を包含する。

【0033】

1つの実施形態において、本発明は、タンパク質の機能を回復もしくは破壊する化合物(例えば、有機低分子)について関連するDNA分子由来の1組のタンパク質部分をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、特定のSNPまたは他の変異を保有する集団の部分集合について、治療的利点または治療的不利点を有する化合物を明らかにし得る。他の実施形態において、その試験物質は、

- ・ 関連するDNA分子に由来する1組のタンパク質部分における相対的タンパク質：タンパク質相互作用を決定するためのタンパク質
 - ・ 相対的タンパク質：DNA相互作用またはタンパク質：RNA相互作用を決定するための核酸分子
 - ・ 相対的タンパク質：リガンド相互作用を決定するためのリガンド
- であり得る。

【0034】

本発明のアレイの問い合わせから得られた結果は、定量的(例えば、結合定数または触媒定数 K_D および K_M を測定する)、半定量的(例えば、タンパク質量に対する結合量を規格化する)、または定性的(例えば、機能性 対 非機能性)であり得る。リガンドがいくつか(例えば、二つ以上)の濃度で添加される場合、複製アレイに対するシグナルを

定量化することにより、スポットにおけるタンパク質の結合親和性および活性濃度の両方が決定され得る。これは、互いおよび野生型のSNPの比較を可能にする。このレベルの情報は、以前にアレイから得られていない。全く同一の方法論が、アレイされたタンパク質に対する薬物の結合を測定するために、使用され得た。

【0035】

例えば、定量的な結果は、 K_D および B_{max} （それらは、リガンドとタンパク質との間の相互作用の親和性、およびリガンドそれぞれに対する結合部位の数を記載する）は、タンパク質アレイのデータから誘導され得る。簡潔には、各個々のタンパク質スポットに結合するリガンドの定量化量または相対量のいずれかが、アッセイ溶液における異なる濃度のリガンドで測定され得る。タンパク質の量と結合されたリガンド量との間での直線関係を推定すると、このアッセイで使用されるある範囲のリガンド濃度について、各スポットに結合するリガンド（相対）量は、方程式1、再配列または誘導に一致し得る。

【0036】

結合したリガンド = $B_{max} / ((K_D / [L]) + 1)$ （方程式1）

[L] = アッセイで使用されたリガンド濃度。

【0037】

本発明の各局面の好ましい特徴は、互いの局面について、必要な変更を加えてに規定されたとおりである。

【0038】

本発明のさらなる特徴および詳細は、以下のタンパク質アレイ、p53タンパク質SNPアレイおよびp450アレイの特定の実施形態および本発明（参考として図を用いた例として示される）に従うその使用記載から明らかである。

【実施例】

【0039】

（実施例1：SNP含有遺伝子によってコードされるタンパク質の機能解析のためのタンパク質アレイの使用—p53タンパク質SNPアレイ）

腫瘍抑制タンパク質p53における変異は、約50%の癌と関連しており、この遺伝子の1000以上のSNPが認められている。腫瘍細胞中のp53遺伝子の変異（体細胞変異）、または癌に対する疾病素質を有する家族のゲノム（生殖細胞系変異）でのp53の変異は、分子機構との関連性ではなく、状況と遺伝子型との間での関連性を与える。SNPをコードする機能的な特徴に対して、タンパク質アレイの有用性を示すために、本発明者らは、46の生殖細胞系変異（SNP）を用いて、野生型のヒトp53をアレイにした。次いで、これらのタンパク質の生化学活性を、試薬またはリガンドの少量のサンプルを用いて、即座にそして並行して比較し得る。アレイにされるタンパク質は、DNA結合（公知のp53キナーゼにより、翻訳後に「チップ上（on-chip）」でリン酸化された）に対して、機能的であることを示し、そして公知のp53の相互作用タンパク質（MDM2）と相互作用し得る。これらの多くのSNPに対して、これは、p53機能に対する変異の効果の第一の機能的特徴であり、そして大規模な並行様式において生化学活性分析において、タンパク質マイクロアレイの有用性を説明する。

【0040】

（p53 SNPアレイの構築のための材料および方法）

野生株p53 cDNAを、プライマーP53F（5' atg gag gag ccg g cag tca gat cct ag3'）およびプライマーP53R（5' gat cgc ggc cgc tca gtc agg ccc ttc tg 3'）を用いて、HeLa細胞cDNAライブラリーからPCRによって増幅し、そしてポリヒスチジンタグおよびE. coli AccB遺伝子由来のBCCPDメインをコードする配列の下流でE. coli 発現ベクターへ連結した。製造業者の説明書により、この連結混合物を、コンピテントXL1Blue細胞（Stratagene）へ化学的に形質転換した。このp53 cDNA配列を配列決定によって調べ、そして、p53に対するSWISS-PROTエントリー（登録番号P04637）を含まれるような、野生型p5

3 タンパク質配列に対応することを見出した。

【0041】

(p53変異体群の構築)

p53の変異体を、逆PCR反応でのテンプレートとして、野生型p53配列を含むプラスミドを用いて作製した。プライマーを設計し、その結果、正方向プライマーを5'でリン酸化し、そして、5'末端において単一ヌクレオチド多型(SNP)を用いて開始し、その後p53配列の20~24ヌクレオチドを得た。逆方向プライマーを、SNP前の20~24ヌクレオチドに対して相補的であるように設計した。PCRをPwoポリメラーゼを用いて実施し、これによってp53を含むベクター全体に相当する、平滑末端産物を作製した。PCR産物をゲルで精製し、環状プラスミドを形成するために連結し、そして、クローニングの効率を増大させるために、親テンプレートDNAを制限エンドヌクレアーゼDpnI (New England Biolabs)で消化した。連結産物をXL1Blue細胞へ形質転換し、そして、変異p53遺伝子を、所望される変異の存在に対する配列決定およびPCRにより導入される二次性変異がないことにより確認した。

【0042】

(E. coliでのp53の発現)

p53プラスミドを含むXL1Blue細胞のコロニーを、48ウェルブロック(QIAGEN)中で、アンピシリン(70μg/ml)を含む2mlのLB培地でインキュベートし、振とうインキュベーターにて37℃で一晩中増殖させた。40μlの一晩中培養を、48ウェルブロックで、別の2mlのLB/アンピシリンを接種するために使用し、約0.4の最適濃度(600nm)に到達するまで、37℃にて増殖させた。次いで、IPTGを50μMになるまで添加し、引き続き30℃で4時間誘導した。次いで、細胞を遠心分離によって回収し、細胞ペレットを-80℃で保管した。タンパク質の調製のために、細胞ペレットを室温で融解し、40μlのp53緩衝液(25mM HEPES pH7.6、50mM KCl、10%グリセロール、1mM DTT、1mg/mlウシ血清アルブミン、0.1% Triton X100)および10μlの4mg/mlリゾチームを添加し、この細胞ペレットを再懸濁するためにボルテックスした。細胞破片を、4℃で10分間、13000rpmでの遠心分離により回収する前に、溶解を室温で30分間、振とう機でのインキュベーションにより促進した。可溶性タンパク質の清澄な上清を取り出し、そしてすぐに使用するか、または-20℃で保管した。

【0043】

(ウェスタンブロッティング法)

可溶性タンパク質サンプルを、4~20% Tris-Glycineゲル(NOVEX)でロードする前に、5分間、SDS含有緩衝液中で煮沸し、45分間200Vで泳動させた。タンパク質をPVDF膜(Hybond-P, Amersham)へトランスファーし、標準的な技術を用いて各種のエピトープの存在に対してプローブした。ヒスチンタグの検出のために、膜を5% Marvel/PBSTでブロックし、1/1000倍希釈の抗RGSHis抗体(QIAGEN)を一次抗体として使用した。ビオチンタグの検出のために、膜をSuperblock/TBS(Pierce)でブロックし、Superblock/TBS/0.1% Tween20で1/2000倍に希釈したStreptavidin-HRP結合体(Amersham)を用いてプローブした。RGSHis抗体に対する二次抗体は、Marvel/PBSTで1/2000倍希釈した抗マウスIgG(Fc特異的)HRP結合(Sigma)であった。広範囲にわたる洗浄後、結合されたHRP結合を、ECLPlus(Amersham)およびHyperfilm ECL(Amersham)またはDAB染色(Pierce)のいずれかを用いて検出した。

【0044】

(DNAゲルシフトアッセイ)

発現されたp53のDNA結合機能を、従来のゲルシフトアッセイを用いてアッセイした。オリゴDIGGADD45A(5' DIG-gta cagaac atg tct

aag cat gct ggg gac-3') およびオリゴGADD45B (gtc ccc agc atg ctt aga cat ggt ctt g tac 3') を最終濃度を25 μ Mにして、dsDNAと共にアニールした。1 μ lの透明な溶解産物、0.2 μ lのアニール化DIG標識化GADD45オリゴおよび1 μ lのポリdI/dC競合DNA (Sigma) を含む結合反応を、20 μ lのp53緩衝液の中で組み立てた。反応系を室温で30分間インキュベートし、氷上で冷却し、そして、5 μ lを既にプレラン6%ポリアクリルアミド/TBEゲル (NOVEX) でロードした。正に荷電したニトロセルロース (Roche) ヘトランスファーする前に、ゲルを4℃で90分間100Vにて泳動した。膜をBuffer I (100mM マレイン酸、150mM NaCl、pH7.0) 中の0.4% Blocking Reagent (Roche) で30分間ブロックし、HRP (Roche) 結合体化抗DIG Fabフラグメントを用いて、DIG標識化DNAの存在に対してプローブした。結合されたHRP結合体をECL PlusおよびHyperfilm ECL (Amersham) を用いて検出した。

【0045】

(p53リン酸化アッセイ)

p53のリン酸化を、精製カゼインキナーゼII (CKII, Sigma) を用いて実施した。このキナーゼは、セリン392位置で野生型p53をリン酸化することが以前に示されていた。リン酸化反応は、20 μ l p53緩衝液中に、2 μ lのp53溶解産物、10mM MgCl₂、100 μ M ATPおよび0.1U CKIIを含有した。反応系を30℃で30分間インキュベートし、反応産物を4~20%NOVEXゲルを通して分離し、PVDF膜ヘトランスファーした。p53のリン酸化を、Marvel/TBSTで1/1000倍希釈した、セリン392位置でのp53リン酸化に対して特異的な抗体 (Cell Signalling Technology) を用いて検出した。二次抗体は、抗ウサギHRP結合体 (Cell Signalling Technology) であり、1/2000倍で使用した。

【0046】

(MDM2相互作用アッセイ)

MDM2のN末端部分 (アミノ酸17~127) のcDNAを、cDNAライブラリーから増幅し、E. coli発現ベクターにおいて、HisタグおよびFLAGタグをコードする配列の下流ヘクローン化した。プラスミドを、正しいMDM2配列について配列決定により調べ、E. coli培養物の誘導は、予測されるサイズのHisタグ化およびFLAGタグ化の可溶性タンパク質を示した。MDM2とp53変異体群との間の相互作用を試験するために、溶解産物を含む10 μ l p53、溶解産物を含む10 μ l MDM2、300mM NaCl、0.1% Tween20および1% (w/v) ウシ血清アルブミンを含む500 μ l リン酸緩衝生理食塩水中の20 μ l 抗FLAGアガロースを含む結合反応系を組み立てた。反応系を室温で1時間、振とう機でインキュベートし、FLAG結合性複合体を5000rpmで2分間の遠心分離により回収した。PBSTでの広範囲にわたり洗浄した後、FLAG結合性複合体をSDSサンプル緩衝液中で変性させ、ウェスタンブロットした。ビオチン化p53の存在を、Streptavidin/HRP結合体で検出した。

【0047】

(p53マイクロアレイの組み立ておよびp53マイクロアレイアッセイ)

p53変異体群の清澄溶解物を384ウェルプレートヘロードし、そして、16ピンマイクロアレイヘッドと特注ロボット (custom built robot) (K-Biosystems, UK) を用いて、SAM2™膜 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 上へプリントした。各溶解産物を各アレイ上に4回スポットし、そして、各スポットを3回上記の膜へプリントした。プリント後、アレイをp53緩衝液で湿らせ、30分間、5% Marvel/p53緩衝液でブロックした。p53緩衝液で3回×5分洗浄した後、アレイをアッセイのために準備した。

【0048】

DNA結合アッセイのために、5 μ lのアニール化Cy3標識化GADD45オリゴを、500 μ l p53緩衝液へ添加した。プローブ溶液を室温で30分間アレイ全体を洗浄し、そしてp53緩衝液で3回×5分洗浄した。次いで、アレイを乾燥し、Affymetrix428アレイスキャナーでスキャンするために、スライドガラス上にのせた。Cy3スキャンした画像の定量化を、ImageNeソフトウェアを用いて実行した。

【0049】

リン酸化アッセイのために、10 μ l CKIIを、320 μ l p53緩衝液および80 μ l Mg/ATP混合物中で、30℃で30分間、このアレイとインキュベートした。次いで、アレイをTBSTで3回×5分洗浄し、Marvel/TBSTで1/1000倍希釈した抗ホスホセリン392抗体を、1時間添加した。TBSTで3回×5分洗浄した後、抗ウサギ二次抗体を1時間、1/2000希釈で添加した。結合した抗体をECLPlusおよびHyperfilmで検出した。

【0050】

MDM2相互作用アッセイのために、1 μ lの精製Cys3標識MDM2タンパク質を、室温で1時間、500 μ lのPBS/300mM NaCl/0.1% Tween20/1% BSA中でアレイとインキュベートした。同じ緩衝液中で3回×5分洗浄した後、アレイを乾燥し、スライドガラスにのせ、そしてDNA結合アッセイに関してCys3蛍光を分析した。

【0051】

(結果)

(E. coliでのp53の発現および変異体群の構築)

全長p53オープンリーディングフレームを、HeLa細胞cDNAライブラリーからPCRによって増幅し、ベクターpQE80L (E. coli遺伝子ACCB由来のBCCPドメインを、すでにクローンしている) 中のtacプロモーターの下流へクローン化した。次いで、結果としてp53は、そのN末端でHisタグ化およびビオチンタグ化され、そして図1は、誘導したE. coli培養物からの可溶性タンパク質のWestern blot分析を示す。Hisタグ化されたビオチンタンパク質に対するクリアなシグナルが、約66 kDaにあり、そして同じサイズのバンドをp53特異的抗体pAb1801 (データは示さない) によって検出する。このタンパク質をコードするプラスミドを、完全に配列決定し、野生型p53 cDNA配列であることが示された。このプラスミドを、変異体群を構築するためのテンプレートとして使用し、図1はまた、これらの変異体の選択発現の分析を示し、単一ヌクレオチド多型に対して予測されるように全長タンパク質を示し、そしてこの変異が終止コドンでコードするタンパク質を切断した。変異体はまた、所望する変異の存在および二次変異がないことを確認するために、配列決定をした。

【0052】

本発明者らは、SNPアレイの本実施例においてHisタグおよびビオチンタグを使用しているが、他のアフィニティタグ (例えば、FLAG、myc、VSV) もクローン化タンパク質を精製するために、使用され得る。E. coli以外の発現宿主もまた、所望される場合、使用され得る (例えば、酵母、昆虫細胞、哺乳細胞)。

【0053】

また、このアレイは、p53での天然に生じる生殖系SNPに焦点をあてたが、他の実施形態は、天然に生じるSNP (「合成性」変異) または一つを超えるSNPを含む野生型タンパク質のバージョンに必ずしも制限されない。他の実施形態は、片方の末端もしくは両方の末端 (ネスト化セット) から欠失される、タンパク質のバージョンを包含し得る。このようなアレイは、タンパク質: リガンド相互作用のマッピングおよび未知タンパク質の機能的ドメインの叙述において有用である。

【0054】

(E. coliにより発現されたp53は、DNA結合に対して機能的である)

本発明者らのp53の機能性を示すために、本発明者らは、P53で結合することが以

前に示されているDNAオリゴを用いて、電気泳動移動度シフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay) を実施した。図2は、これらのゲルシフトアッセイからの実施結果を示し、野生型p53および変異体R72P、変異体P82Lならびに変異体R181CによるDNA結合を示している。これらの変異がp53のDNA結合性ドメイン外であるので、初めの2つの変異体は、なおもDNAと結合すると予想される。従来のゲルベースアッセイを用いたDNA結合が示されているので、本発明者らは、次いで、表面上にアレイされたp53に対する同一機能を示したかった。図3Cは、SAM2™膜 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 上にアレイしたp53変異体群に対するCy3標識DNAの結合の結果を示す。本発明者らは、SNPアレイの本実施例においてSAM2™膜を使用しているが、タンパク質をアレイするのに使用し得る他の表面には、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、金スライドまたはシリカスライド、ポリプロピレンマルチウェルプレートまたはポリスチレンマルチウェルプレート、あるいはニトロセルロース、PVDfおよびナイロン膜のような他の多孔性表面上が挙げられるが、これらに制限されない。特に、SAM2™膜は、ビオチン化分子をとらえ、そして変異体群細胞溶解物からのビオチン化p53タンパク質を精製する。アレイから非結合性DNAを洗浄後、結合性DNAをAffymetrix DNAアレイスキャナーを用いて視覚化した。図3で見られ得るように、表面上にアレイした場合、ゲルシフトアッセイでDNAを結合した同一変異体はまた、ほとんどのDNAと結合した。実際、DNA結合アッセイについては、マイクロアレイアッセイは、従来のゲルシフトアッセイよりもより高い感受性があるようだった。これは、おそらく、ゲルシフトアッセイにおいて、ゲル電気泳動の間、DNA：タンパク質複合体は結合を保持しなければならず、そして、弱い複合体はこの工程の間に解離し得るためである。また、使用されたSAM2™膜の3次元マトリックスは、収容効果を有し得る。p53タンパク質量は、Hisタグタンパク質に対してプローブした同一のマイクロアレイによって示されている場合、各スポット上で等量であり、(図3B)。

【0055】

(リン酸化試験のためのp53アレイの使用法)

翻訳後修飾に対するSNP効果の試験を例示するために、本発明者らは、カゼインキナーゼIによるp53アレイのリン酸化へ注目することを選択した。この酵素は、セリン392でp53をリン酸化することが以前に示されており、そして、本発明者らは、この事象を試験するために、市販の抗p53リン酸化セリン392特異的抗体の使用法を作製した。図4は、p53野生株およびS392Aクローン由来の、可溶性タンパク質調製物についてのキナーゼ反応のWesternブロット分析を示す。レーン1は、CKIによる野生型p53のリン酸化を示し、バックグラウンドシグナルは、CKIをこの反応(レーン2)から削除した場合である。レーン3およびレーン4は、S392Aに対する対応結果を示す(予測された通り、CKIによるリン酸化に対するバックグラウンドシグナルのみを示す)。次いで、このアッセイをマイクロアレイ形式(図5に見られ得るように、全ての変異体群に対するリン酸化反応が、S392A変異体および残基392前を切断した変異体を除外することを示す)で適用した。

【0056】

(タンパク質：タンパク質相互作用を試験するためのp53アレイの使用法)

SNPタンパク質アレイでのタンパク質：タンパク質相互作用の試験を例示するために、p53タンパク質アレイとMDM2との相互作用を調査した。図6は、抗FLAGアガロースに結合した場合、FLAG標識MDM2は、野生型p53を崩壊することを示す。しかし、W23A変異体は、FLAGアガロースに結合したMDM2によって崩壊さず、この残基がp53/MDM2相互作用に重要であると以前に示されている(Bottger, A., Bottger, V., Garcia-Echeverria, C. ら, J. Mol. Biol. (1997) 269:744-756)と考えられる。次いで、このアッセイをマイクロアレイ形式で実施し、そして、図7は、このアレイの結果を示す。Cy3標識タンパク質は、W23A変異体スポットおよびW23G変異体スポットから離れ

た全てのスポットにて検出される。

【0057】

本発明者らは、ヒトp53タンパク質機能に対する46個の生殖系変異体の効果の特徴付けるために、新規のタンパク質チップ技術を使用した。アレイしたタンパク質を、His標識抗体およびp53特異的抗体の双方で検出し得る。このアレイを、p53状態の診断に対して関係を有し得る変異特異的抗体をスクリーンするために使用し得る。

【0058】

本発明者らは、従来のゲルベースアッセイによる野生型タンパク質の機能を示し得、そして、マイクロアレイ形成で実施するアッセイと類似の結果を達成している。実際に、DNA結合アッセイについては、マイクロアレイアッセイは、従来のゲルシフトアッセイよりもより感受性があることを表した。これらのアレイは、50%グリセロール中に-20℃で保管し得、そして、1ヶ月後、DNA結合に対する機能がまだあることを示した（データは示していない）。

【0059】

CKIIリン酸化アッセイの結果は、予測される通りであり、残基392においてセリンを含む全てのタンパク質についてリン酸化が検出された。この分析は、p53をリン酸化するキナーゼに対するスクリーン、または、例えば、他の変異体ではなくいくつかの変異体（それ自身、癌において潜在的な標的を表し得る）を差次的にリン酸化するキナーゼに対するスクリーンに拡大され得ることは明らかである。

【0060】

MDM2相互作用アッセイは、再度、タンパク質アレイ形式の有効性を示し、野生型およびp53変異体に対する結果は、従来の崩壊アッセイを用いて得られた結果を反映している。これらの結果はまた、本発明者らのタンパク質アレイが、タンパク質：タンパク質の相互作用を検出するために使用され得ることを示す。潜在的にはこれらのアレイは、現在の方法を用いては不可能な、高いスループット様式において、タンパク質：タンパク質の相互作用に対する定量的な結合データ（すなわち、 K_D 値）を得るために使用され得る。MDM2タンパク質を、想定されるタンパク質プロフィールの実験のため、アレイボード上の粗E. coli溶解物を崩壊することは、例えば、細胞抽出物を異なるタンパク質から調製した場合、異なる発蛍光団で標識し、そして、タンパク質の相互作用種量での差異を捜すために同一アレイに双方をハイブリダイズしたということである。

【0061】

実際に、以下の実施例2において、出願人は、これらのアッセイが定量的なデータを得るために使用され得るということを示す。

【0062】

（実施例2 p53タンパク質マイクロアレイでのDNA結合の定量化）

（方法）

（DNA結合アッセイ）GADD45プロモーターエレメント配列（5'-gtacag aac atg tct aag cat gct ggg gac-3' および 5'-gtc ccc agc atg ctt aga cat gtt ctg tac-3'）を有するオリゴヌクレオチドを、 $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP（Amersham Biosciences、Buckinghamshire、UK）およびT4キナーゼ（Invitrogen、Carlsbad、CA）を用いて放射線標識し、p53緩衝液中でアニールし、次いで、Nucleotide Extractionカラム（Qiagen、Valencia、CA）を用いて精製した。複合オリゴを、UV分光測光法によって定量化し、2.5倍の希釈系列をp53緩衝液で作製した。500 μl の各希釈系列を室温で30分間、マイクロアレイと共にインキュベートし、次いで、非結合性DNAを除去するために、p53緩衝液で3回（5分/回）洗浄した。次いで、マイクロアレイを、スキヤニングする前に、一晚、ホスホイメージャー（phosphorimager）プレート（Fuji、Japan）に曝露した。ImaGeneソフトウェア（Bio Discovery、Marina del Rey、CA）は、スキヤンしたイメージ

を定量化するために使用した。各DNA濃度での全ての変異体に対する複製値を、単純双曲線性濃度-反応曲線 $R = B_{max} / ((K_D / L) + 1)$ に適合した (R は相対的計数における反応であり、そして L は nM のDNA濃度である)。

【0063】

(結果)

(GADD45プロモーターエレメントDNAに対するp53の結合)複製p53マイクロアレイ (GADD45プロモーターエレメントの配列に相当する) を、様々の濃度で、 ^{33}P 標識複合DNAの存在下でインキュベートした (図8A)。マイクロアレイを、ホスホイメージャーを用いてイメージし、そして個々のスポットを定量化した。この検出方法での非直線性を調節するために、データを検定曲線に対して標準化し、そして、バックグラウンドを減算した。全ての変異体に対する増幅値をプロットし、そして、 K_d 値および B_{max} 値双方の計算を与える非直線性回帰分析で分析した。

【0064】

【表1】

表1

変異	DNA結合 B_{max} (%野生型)	K_d (nM)	MDM2	CKII
野生型	100 (90-110)	7 (5-10)	+	+
W23A	131 (119-144)	7 (5-10)	-	+
W23G	84 (74-94)	5 (3-9)	-	+
R72P	121 (110-132)	9 (7-13)	+	+
P82L	70 (63-77)	7 (5-10)	+	+
M133T	ND		+	+
Q136X	結合なし		+	-
C141Y	ND		+	+
P151S	ND		+	+
P152L	31 (23-38)	18 (9-37)	+	+
G154V	ND		+	+
R175H	ND		+	+
E180K	31 (21-41)	12 (4-35)	+	+
R181C	88 (81-95)	11 (8-13)	+	+
R181H	48 (40-57)	11 (6-21)	+	+
H193R	21 (16-26)	22 (11-42)	+	+
R196X	結合なし		+	-
R209X	結合なし		+	-
R213X	結合なし		+	-
P219S	21 (14-30)	10 (3-33)	+	+
Y220C	ND		+	+
S227T	101 (94-110)	7 (5-9)	+	+
H233N	60 (52-68)	5 (3-8)	+	+
H233D	70 (58-84)	7 (3-14)	+	+
N235D	32 (25-40)	27 (15-49)	+	+
N235S	46 (36-56)	9 (4-20)	+	+
S241F	38 (30-47)	19 (10-37)	+	+
G245C	ND		+	+
G245S	44 (38-51)	11 (7-18)	+	+
G245D	ND		+	+
R248W	107 (95-120)	12 (8-17)	+	+
R248Q	85 (77-95)	17 (12-23)	+	+
I251M	ND		+	+
L252P	22 (12-32)	16 (4-63)	+	+
T256I	32 (22-41)	14 (6-34)	+	+
L257Q	26 (19-35)	17 (7-44)	+	+
E258K	ND		+	+
L265P	ND		+	+
V272L	ND		+	+
R273C	70 (56-85)	20 (11-37)	+	+
R273H	59 (40-79)	54 (27-106)	+	+
P278L	ND		+	+
R280K	54 (40-70)	21 (9-46)	+	+
E286A	32 (23-41)	22 (10-46)	+	+
R306X	結合なし		+	-
R306P	90 (81-100)	7 (5-11)	+	+
G325V	73 (67-79)	7 (5-10)	+	+
R337C	88 (80-95)	6 (4-8)	+	+
L344P	結合なし		+	-
S392A	121 (107-136)	10 (6-14)	+	-

図8Bは、7 nMの野生型アフィニティーと推測する、野生型p53 (高いアフィニティー)、R273H (低いアフィニティー) およびL344P (非結合性) に対するDNA結合を示す。

【0065】

(結論)

(DNA結合) DNA結合データの定量化分析は、野生型および変異体p53に対するアフィニティー (K_D) および相対的な最大結合値 (B_{max}) の双方で生じたマイクロ

アレイから得た。タンパク質機能マイクロアレイは、以前にこの方法で使用されておらず、そのため、このデータは、並列の様式で、データの質および量を獲得することにより有用性を示す。スポットにおけるアフィニティタグ化タンパク質の量に対して結合データを標準化するアプローチは、大きなデータセットを分析する手段を速く提供する「Zhu, H. ら、Global analysis of protein activities using proteome chips. Science 293, 2101–2105 (2001)」が、マイクロアレイ化タンパク質の種々の特異的活性は考慮にされず、シグナルが飽和状態または非飽和状態の条件下で記録されるかどうかにも考慮にされない。定量化分析はここで実施し、GADD45 DNA結合に従う群へ変異体の機能的分類を与えた：ほぼ野生型アフィニティを示す；減少した安定化を表す（低い B_{max} ）；減少したアフィニティを示す（高い K_d ）；および完全な活性消失を示す（表1）。

【0066】

DNAに対するほぼ野生型アフィニティを有するタンパク質は、一般的に、DNA結合ドメインの外側に位置する変異を有し、R72P、P82L、R306PおよびG325Vを含む。R337Cは、p53のオリゴマー化状態に影響を及ぼすことが知られているが、本明細書中で使用されるアッセイ温度にて、大部分はテトラマーであると考えられる「Davison, T. S., Yin, P., Nie, E., Kay, C. & Arrowsmith, C. H. Characterisation of the oligomerisation defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like syndrome. Oncogene 17, 651–656 (1998)」ここで測定されたアフィニティと一致する。対照して、結合の全ての消失は、予測された通り、未熟の終止コドン（Q136X、R196X、R209XおよびR213X）およびタンパク質をモノマー化する変異（L344P「Lomax, M. E., Barnes, D. M., Hupp, T. R., Picksley, S. M. & Camplejohn, R. S. Characterisation of p53 oligomerisation domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members. Oncogene 17, 643–649 (1998)」およびテトラマー化ドメイン欠損性R306X）を誘導する変異において観察された。

【0067】

DNA結合ドメインにおいて、出願人は、一般的に変異は、顕著な除外例R181C/H、S227TおよびH233N/DとのDNAの結合性を減少するかまたは排除するかということを見出した；これらは、タンパク質とDNAとの境界からはなれた全ての溶媒暴露位置であり、そして野生型結合を示す。タンパク質とDNAとの境界に存在する変異R248Q/W、R273C/HおよびR280Kは、野生型（表1）より2～7倍高い K_d 値を有す低いアフィニティ（特異的なタンパク質とDNAとの相互作用の消失、あるいは変異化残基の最適以下のパッケージを通じた位置的な妨害、のいずれかを有す）を表した。

【0068】

多くの残りの変異体は、適切なスポットに存在する、タンパク質の量に従って標準化した場合、相当に減少した特異的な活性（明らかに低い B_{max} 値）を表す群へ分かれる。いくつかの変異体に対して、DNAの結合性は、このような水準に折衷し（しかし、結合は認められる）、それは正確な定量化ではなく、例えば、P151SおよびG245Cのバックグラウンド率への低いシグナルに起因する。他の変異体、例えばL252Pに対して、低いシグナル強度は、測定可能な K_d 値を産出したが、広い信頼限度を有する。

【0069】

目的のDNA配列の天然に存在する改変体（例えば、フェーズ1またはフェーズ2から

のタンパク質をコードする酵素を代謝する薬剤（DME））のから誘導された、少なくとも二つのタンパク質部分を含む、タンパク質アレイに対する本発明の適応性をさらに示すために、本発明は、p450アレイに対する基準を用いてさらに例示される。フェーズ1 DMEは、チトクロムp450およびフラビンモノオキシゲナーゼ（FMO）を含み、そしてフェーズ2 DMEはUDPグリコシルトランスフェラーゼ（UGT）、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、スルホトランスフェラーゼ（SULT）、N-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）、薬物結合核受容体およびトランスポータータンパク質薬物を含む。

【0070】

好ましくは、全ての相補性、またはヒトDMEの重要な比率が本発明のアレイで表される。このようなアレイは、（現在、Swiss Protデータベースに記載される、括弧内の数）：全てのヒトP450（119）、FMO（5）、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ（UGT）（18）、GST（20）、スルホトランスフェラーゼ（SULT）（6）、N-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）（2）、薬物結合核受容体（33）およびトランスポータータンパク質薬物（6）を含む。このタンパク質リストは、ヒトゲノム配列決定プロジェクト（基質特異的に転換し得るP450に対して生じる公知のスプライス改変体、または機能およびp450ならびにフェーズ2 DMEの双方に特異的な基質に影響を及ぼす公知の多型）と特徴付けるため、これらを含んでいない。

【0071】

例えば、異なる人種集団の間で、P450 2C9、P450 2D6およびP450 3A4における各種の対立遺伝子での発生頻度に大きな差異があることが、知られている（表2、3および4を参照のこと）。これらの対立遺伝子は、酵素速度論、基質特異性、部位選択的および産物プロフィール（多数の産物が産出される場合）に影響を及ぼす潜在性を有している。本開示で記載されるタンパク質のアレイは、特定の薬物に対してこれらの差異のさらなる詳細な試験を可能にし、そして潜在的な問題を予測するのに役立ち、また、臨床試験に対して使用される集団を効果的に計画するのに役立つ。

【0072】

【表2-1】

表2. P450 2D6 対立遺伝子頻度

P450	対立遺伝子	変異	対立遺伝子頻度	人種群	試験群	基準
2D6	*1	W.T.	26.9%	中国人	113	(1)
			36.4%	ドイツ人	589	(2)
			36%	白人	195	(3)
			33%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*2	R296C; S486T	13.4%	中国人	113	(1)
			32.4%	ドイツ人	589	(2)
			29%	白人	195	(3)
			27.1%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*3	フレームシフト	2%	ドイツ人	589	(2)
			1%	白人	195	(3)
			1.9%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*4	3'UTR領域 欠損	20.7%	ドイツ人	589	(2)
			20%	白人	195	(3)
			16.6%	ヨーロッパ人	1344	(4)
			1.2%	エチオピア人	115	(5)
2D6	*5	欠失	4%	白人	195	(3)
			6.9%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*6	3'UTR領域 欠損	0.93%	ドイツ人	589	(2)
			1.3%	白人	195	(3)
2D6	*7	H324P	0.08%	ドイツ人	589	(2)
			0.3%	白人	195	(3)
			0.1%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*9	K281del	2%	白人	195	(3)
			2.7%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*10	P34S; S486T	50.7%	中国人	113	(1)
			1.53%	ドイツ人	589	(2)
			2%	白人	195	(3)

【0073】

【表2-2】

			1.5%	ヨーロッパ人	1344	(4)
			8.6%	エチオピア人	115	(5)
2D6	*12	G42R; R296C; S486T	0%	ドイツ人	589	(2)
			0.1%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*14	P34S; G169R; R296C; S486T	0.1%	ヨーロッパ人	1344	(4)
2D6	*17	T107I; R296C; S486T	0%	白人	195	(3)
			0.1%	ヨーロッパ人	1344	(4)
			9%	エチオピア人	115	(5)
			34%	アフリカ人	388	(6)

全ての他のP450対立遺伝子改変体は、0.1%以下の頻度で生じる(4)。

【0074】

【表3】

表3 P450 2C9対立遺伝子頻度

P450	対立遺伝子	変異	対立遺伝子頻度	人種群	試験群	基準
2C9	*1	W.T.	62%	白人	52	(7)
2C9	*2	R144C	17%	白人	52	(7)
2C9	*3	I359L	19%	白人	52	(7)
2C9	*4	I359T	x%	日本人	X	(8)
2C9	*5	D360E	0%	白人	140	(9)
			3%	アフリカ人 アメリカ人	120	(9)
2C9	*7	Y358C	x%		X	Swiss Prot

【0075】

【表4】

表4 P450 3A4'対立遺伝子頻度

P450	対立遺伝子	変異	対立遺伝子頻度	人種群	試験群	基準
3A4	*1	W.T.	>80%		X	
3A4	*2	S222P	2.7%	白人	X	(10)
			0%	アフリカ人	x	(10)
			0%	中国人	x	(10)
3A4	*3	M445T	1%	中国人	X	(10)
			0.47%	ヨーロッパ人	213	(11)
			4%	白人	72	(12)
3A4	*4	I118V	2.9%	中国人	102	(13)
3A4	*5	P218R	2%	中国人	102	(13)
3A4	*7	G56D	1.4%	ヨーロッパ人	213	(11)
3A4	*8	R130Q	0.33%	ヨーロッパ人	213	(11)
3A4	*9	V170I	0.24%	ヨーロッパ人	213	(11)
3A4	*10	D174H	0.24%	ヨーロッパ人	213	(11)
3A4	*11	T363M	0.34%	ヨーロッパ人	213	(11)
3A4	*12	L373F	0.34%	ヨーロッパ人	213	(11)
3A4	*13	P416L	0.34%	ヨーロッパ人	213	(11)
3A4	*15	R162Q	4%	アフリカ人	72	(12)
3A4	*17	F189S	2%	白人	72	(12)
3A4	*18	L293P	2%	アジア人	72	(12)
3A4	*19	P467S	2%	アジア人	72	(12)

【0076】

【数1】

参考文献

1. Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q. Y., Bertilsson, L., Sjoqvist, F. & Ingelman-Sundberg, M. (1994) *Mol Pharmacol* 46, 452-9.
2. Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. & Roots, I. (1997) *Am J Hum Genet* 60, 284-95.
3. Griesse, E. U., Zanger, U. M., Brudermanns, U., Gaedigk, A., Mikus, G., Morike, K., Stuvén, T. & Eichelbaum, M. (1998) *Pharmacogenetics* 8, 15-26.
4. Marez, D., Legrand, M., Sabbagh, N., Guidice, J. M., Spire, C., Lafitte, J. J., Meyer, U. A. & Broly, F. (1997) *Pharmacogenetics* 7, 193-202.
5. Aklillu, E., Persson, I., Bertilsson, L., Johansson, I., Rodrigues, F. & Ingelman-Sundberg, M. (1996) *J Pharmacol Exp Ther* 278, 441-6.
6. Dandara, C., Masimirembwa, C. M., Magimba, A., Sayi, J., Kaaya, S., Sommers, D. K., Snyman, J. R. & Hasler, J. A. (2001) *Eur J Clin Pharmacol* 57, 11-7.
7. Aithal, G. P., Day, C. P., Kesteven, P. J. & Daly, A. K. (1999) *Lancet* 353, 717-9.
8. Imai, J., Ieiri, I., Mamiya, K., Miyahara, S., Furuumi, H., Nanba, E., Yamane, M., Fukumaki, Y., Ninomiya, H., Tashiro, N., Otsubo, K. & Higuchi, S. (2000) *Pharmacogenetics* 10, 85-9.
9. Dickmann, L. J., Rettie, A. E., Kneller, M. B., Kim, R. B., Wood, A. J., Stein, C. M., Wilkinson, G. R. & Schwarz, U. I. (2001) *Mol Pharmacol* 60, 382-7.
10. Sata, F., Sapone, A., Elizondo, G., Stocker, P., Miller, V. P., Zheng, W., Raunio, H., Crespi, C. L. & Gonzalez, F. J. (2000) *Clin Pharmacol Ther* 67, 48-56.
11. Eiselt, R., Domanski, T. L., Zibat, A., Mueller, R., Presecan-Siedel, E., Hustert, E., Zanger, U. M., Brockmoller, J., Klenk, H. P., Meyer, U. A., Khan, K. K., He, Y. A., Halpert, J. R. & Wojnowski, L. (2001) *Pharmacogenetics* 11, 447-58.
12. Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R. J., Mohrenweiser, H. W. & Goldstein, J. A. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* 299, 825-31.
13. Hsieh, K. P., Lin, Y. Y., Cheng, C. L., Lai, M. L., Lin, M. S., Siest, J. P. & Huang, J. D. (2001) *Drug Metab Dispos* 29, 268-73.

(実施例3：野生型H. sapiensシトクロームP450酵素CYP2C9、CYP2D6およびCYP3A4のクローニング)

ヒトシトクロームP450は、N末端に保存領域を有し、これは、脂質の会合を促進する疎水性領域、酸性領域または「終止転移 (stop transfer)」領域 (膜へさらに供給されるタンパク質を止める)、および部分的に保存されたプロリンリピートを含む。P450の三つのバージョンを、これらのドメインに対する欠失を伴って生成され、N末端の欠失は以下に示す。

【0077】

【化1】

構築物	バージョン	N末端欠失
T009-C2 3A4	プロリン	-34 AA
T009-C1 3A4	終止転移	-25 AA
T009-C3 3A4	疎水性タンパク質	-13 AA
T015-C2 2C9	プロリン	-28 AA
T015-C1 2C9	終止転移	-20 AA
T015-C3 2C9	疎水性タンパク質	-0AA
T017-C1 2D6	プロリン	-29 AA
T017-C2 2D6	終止転移	-18 AA
T017-C3 2D6	疎水性タンパク質	-0 AA

ヒトCYP2D6を、特定の順方向プライマーおよび逆方向プライマー（T017FおよびT017R）を用いて、脳cDNAライブラリー（Clontech）、心臓cDNAライブラリー（Clontech）および肝臓cDNAライブラリー（Clontech）のプールからPCRによって増幅した。このPCR産物をpMD004発現ベクターに、N末端His-BCCPタグを用いてインフレームで、逆方向プライマーに存在するNot1制限部位を用いて、クローンした。C末端タグベクターpBJW102.2（図9AおよびB）における発現に対してCYP2D6を変換するために、5'末端でのSfi1クローニング部位に取り込みさせたプライマーを使用し、そして、C末端タグとのインフレームの融合を可能にするために、3'末端での終止コドンを除いた。T017CF1、T017CF2またはT017CF3のいずれかとプライマーT017CRとは、CYP2D6のN末端から、それぞれ、29アミノ酸、18アミノ酸および0アミノ酸の欠失を可能にした。

【0078】

プライマー配列は、以下の通りである：

【0079】

【化2】

T017F:	5'-GCTGCACGCTACCCACCCAGGCCCCCTG-3'.
T017R:	5'-TTGCGGCCGCTCTTCTACTAGCGGGGCACAGCACAAAGCTCATAG-3'
T017CF1:	5'-TATTCCTCACTGGCCATTACGGCCGCTGCACGCTACCCACCCAGGCCCCCTG-3'
T017CF2:	5'- TATTCCTCACTGGCCATTACGGCCGCTGGACCTGATGCACCGCGCCCAACGCTGGGC TGCACGCTACCCACCCAGGCCCCCTG-3'
T017CF3:	5'-TATTCCTCACTGGCCATTACGGCCATGGCTCTAGAAGCACTGGTGCCCTGGCCG TGATAGTGGCCATCTTCCTGCTCTGGTGGACCTGATGCACCGCGCCCAACGC-3'
T017CR:	5'-GCGGGGCACAGCACAAAGCTCATAGGG-3'

PCRを0.5μMの各プライマー、125～250μM dNTP、5ngのテンプレートDNA、1×反応緩衝液、1～5単位のポリメラーゼ（Pfu、Pwo、または「Expand long template」ポリメラーゼ混合物）を含む50μ量で実施し、PCRサイクルは、95℃ 5分、95℃ 30秒、50～70℃ 30秒、72℃ 4分×35サイクル、72℃ 10分、または伸長（Expand）の場合は、68℃を伸長工程に使用した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動によって取り除き、正確なサイズのこれらの産物をゲルから切り出し、そしてその後、ゲル抽出キットを用いて精製した。次いで、精製されたPCR産物をSfi1またはNot1のいずれかを用いて消化し、調製したベクター骨格へ連結した（図9C）。正確な組換えクローンを、細菌培養物のPCRスクリーニングによって、Westernブロッティング、およびDNA配列分析によって決定した。

【0080】

CYP3A4およびCYP2C9を、CYP2D6に類似の方法によって、cDNAライブラリーからクローンした。N末端ベクターへのクローニングに対し、CYP3A4およびCYP2C9を増幅するためのプライマー配列は、以下の通りである：

【0081】

【化3】

2C9

T015F: 5'-CTCCCTCCTGGCCCCACTCCTCTCCAA-3'
 T015R: 5'-TTTGGCGCCGCTCTCTATCAGACAGGAATGAAGCACAGCCTGGTA-3'

3A4

T009F: 5'-CTTGAATTCCAGGGCCACACCTCTG-3'
 T009R: 5'-TTTGGCGCCGCTCTCTATCAGGCTCCACTTACGGTGCCATCCCTTGA-3'

C末端タグベクターにおける発現に対して、N末端クローンを変換するためのプライマーは、以下の通りである：

【0082】

【化4】

3A4

T009CF1: 5'-TATTCTCACTGGCCATTACGGCCCTATGGAACCCATTACATGGACTTTTAA
 AGAAGCTTGGAAATCCAGGGCCACACCTCTG-3'
 T009CF2: 5'-TATTCTCACTGGCCATTACGGCCCTTGGAAATCCAGGGCCACACCTCTG-3'
 T009CF3: 5'-TTCTCACTGGCCATTACGGCCCTCTCTGGCTGTACAGCTGGTGCTCCTCTATCT
 ATATGGAACCCATTACATGGACTTTTAAAGG-3'
 T009CR: 5'-GGCTCCACTTACGGTGCCATCCCTTGAC-3'

2C9

T015CF1: 5'-TATTCTCACTGGCCATTACGGCCAGACAGAGCTCTGGGAGAGGAAACTCCCTC
 CTGGCCCCACTCCTCTCCAG-3'
 T015CF2: 5'-TATTCTCACTGGCCATTACGGCCCTCCCTCCCTGGCCCCACTCCTCTCCAG-3'
 T015CR: 5'-GACAGGAATGAAGCACAGCTGGTAGAAGG-3'

2C9の全長または2C9の疎水性ペプチド(C3)バージョンを、テンプレートとして2C9終止転移クローン(C1)および以下のプライマーを用いて、逆PCRによって生成した。：

【0083】

【化5】

2C9-hydrophobic-peptide-F:
 5'-CTCTCATGTTTGCCTCTCTCTTCACTCTGGAGACAGCGCTCTGGGAGAGGAAACTC-3'
 2C9-hydrophobic-peptide-R:
 5'-ACAGAGCACAGGACCACAAGAGAATCGGCCGTAAGTGCCATAGTTAATTCTC-3'

(実施例4：NADPHシトクロームP450還元酵素のクローニング)

NADPHシトクロームP450還元酵素を、胎児肝臓cDNA (Clontech) から増幅し、PCRプライマー [NADPH還元酵素 F1 5'-GGATCGACA TATGGGAGACTCCACGTTGGACAC-3'; NADPH還元酵素 R1 5'-CCGATAAGCTTATCAGCTCCACACGTTCCAGGGAG-3'] を、遺伝子の5' Nde I 部位および3' Hind III 部位を取り込み、クローニングを可能にした。このPCR産物をpJW45発現ベクターへクローンし(図10AおよびB)、二つの終止コドン、Hisタグが翻訳されないことを確実にするために、逆方向プライマー上に含ませた。正確な組換えクローンを、細菌培養物のPCRスクリーニングによって、および配列決定によって決定した。

【0084】

(実施例5：H. sapiensシトクロームP450 CYP2C9、CYP2D6 およびCYP3A4の多型改変体のクローニング)

一旦、正確な野生型CYP450(図11、12および13)をクローンし、そして配列分析によって確認し、表5に示した2C9、2D6および3A4の天然に存在する多型を、逆PCRのアプローチ(実施例3に記載されるCYP2D6の開始クローニングと同じ方法で、直線PCR産物として増幅し、そしてクローンしたCYP2D6*10を除く

によって作製した。各場合において、異なる人種集団において観察された場合、順方向逆PCRプライマーは、多型ヌクレオチドに対して野生型ヌクレオチドを置換するために、5'位置に1bp mismatchesを含んだ。

【0085】

【表5】

シトクロームP450多型性	コード化アミノ酸置換
CYP2C9*1	野生型
CYP2C9*2	R144C
CYP2C9*3	I359L

CYP2C9*4	I359T
CYP2C9*5	D360E
CYP2C9*7	Y358C
CYP2D6*1	野生型
CYP2D6*2	R296C, S486T
CYP2D6*9	K281del
CYP2D6*10	P34S, S486T
CYP2D6*17	T107I, R296C, S486T
CYP3A4*1	野生型
CYP3A4*2	S222P
CYP3A4*3	M445T
CYP3A4*4	I118V
CYP3A4*5	P218R
CYP3A4*15	R162Q

表5: クローン化P450 2C9、2D6および3A4の多型性形態

以下のPCRプライマーを使用した。

【0086】

【化6】

```

CYP2C9*2F: 5'-TGTGTTCAAGAGGAAGCCCGCTG-3'
CYP2C9*2R: 5'-GTCCTCAATGCTGCTCTTCCCCATC-3'
CYP2C9*3F: 5'-CTTGACCTTCTCCCCACCAGCCTG-3'
CYP2C9*3R: 5'-GTATCTCTGGACCTCGTGCACCAC-3'
CYP2C9*4F: 5'-CTGACCTTCTCCCCACCAGCCTG-3'
CYP2C9*4R: 5'-TGATCTCTGGACCTCGTGCAC-3'
CYP2C9*5F: 5'-GCTTCTCCCCACCAGCCTGC-3'
CYP2C9*5R: 5'-TCAATGTATCTCTGGACCTCGTGC-3'
CYP2C9*7F: 5'-GCATTGACCTTCTCCCCACCAGC-3'
CYP2C9*7R: 5'-CACCACGTGCTCCAGGTCTCTA-3'

CYP2D6*10AF1: 5'-
                TATTCTCACTGGCCATTACGGCCGTGGACCTGATGCACCGGCGCCAACGCT
                GG GCTGCACGCTACTCACCAGGCCCTTGC-3'

CYP2D6*10AR1: 5'-
                GCGGGGCACAGCACAAAGCTCATAGGGGGATGGGCTCACCAGGAAAGCAAA
                G-3'

CYP2D6*17F: 5'-TCCAGATCCTGGGTTCGGGC-3'
CYP2D6*17R: 5'-TGATGGGCACAGCGGGCGGTC-3'

CYP2D6*9F: 5'-GCCAAGGGGAACCTGAGAGC-3'
CYP2D6*9R: 5'-CTCCATCTCTGCCAGGAAGGC-3'

CYP3A4*2F: 5'-CCAATAACAGTCTTTCCATTCTC-3'
CYP3A4*2R: 5'-GAGAAAGAAATGGATCCAAAAATC-3'

CYP3A4*3F: 5'-CGAGGTTTGCTCTCATGACCATG-3'
CYP3A4*3R: 5'-TGCCCAATGCAGTTTCTGGGTCCAC-3'
CYP3A4*4F: 5'-GTCTCTATAGCTGAGGATGAAG-3'
CYP3A4*4R: 5'-GGCACTTTTCATAAATCCCACTG-3'
CYP3A4*5F: 5'-GATTCCTTCTCTCAATAACAGTC-3'
CYP3A4*5R: 5'-GATCCAAAAATCAAATCTTAAA-3'
CYP3A4*15F: 5'-AGGAAGCAGAGACAGGCAAGC-3'
CYP3A4*15R: 5'-GCCTCAGATTTCTCACCAACAC-3'

```

(実施例6: P450 3A4の発現および精製)

E. coli XL-10金 (Stratagene) を、P450 3A4の発現培養のための宿主として使用した。スターター培養物を、100mg/L アンピシリンを補充したLB培地で一晩中培養した。0.5L Terrific Broth培地+100mg/L アンピシリンおよび1mMチアミン、ならびに極微量のエLEMENTを、1/100倍の一晩スターター培養物と共にインキュベートした。フラスコを、細胞密度OD₆₀₀が0.4になるまで、37℃で振とうし、次いで、 δ -アミノレブリン酸 (ALA) を、30℃で20分間、0.5mMで細胞に添加した。この細胞に、50 μ M ビオチンを補充し、次いで、IPTGの最適濃度 (30~100 μ M) と共にインキュベートし、次いで、30℃で一晩中振とうした。

【0087】

0.5Lの培養物からのE. coli細胞を、50mlアリコートへ分割し、細胞を遠心分離によってペレット化し、そしてこの細胞ペレットを-20℃で保管した。各ペレットからの細胞を、5ml緩衝液A (100mM EDTAを含む100mM Tris緩衝液pH8.0)、10mM β -メルカプトエタノール、10 $\times$ プロテアーゼインヒビターカクテルのストック-Roche 1836170、0.2mg/ml Lysozyme) 中に再懸濁することにより、溶解した。15分の氷上でのインキュベーション後、40mlの氷冷却の脱イオン水を、再懸濁した細胞ペレットに各々添加し、混合した。20mM 塩化マグネシウムおよび5 μ g/ml DNase Iを添加した。この細胞を、氷上で30分間、緩やかに振とうしながらインキュベートし、その後、この溶解したE. coli細胞を30分間4000rpmで遠心分離することによってペレット化した。

この細胞ペレットを10 mlの緩衝液B (10 mM β -メルカプトエタノールを含む100 mM Tris緩衝液 (pH 8.0)、および10×プロテアーゼインヒビターカクテルのストック-Roche 1836170) 中での再懸濁によって洗浄し、その後、4000 rpmで遠心分離した。次いで、膜結合タンパク質を、2 ml緩衝液C (50 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、10×プロテアーゼインヒビターカクテルのストック-Roche 1836170、10 mM β -メルカプトエタノール、0.5 M NaClおよび0.3% (v/v) Igepal CA-630) の添加により溶解し、4℃で15分間、10,000 gでの遠心分離前に、30分間穏やかに振とうしながら氷上でインキュベートし、次いで、この上清 (図14) をTalon樹脂 (Clontech) に適用した。

【0088】

Ni-NTAアガロース (Qiagen) の0.5 ml カラムを、使い捨ての重力カラムに注入し、5カラム容量の緩衝液Cを用いて平衡化させた。上清をこのカラムに適用し、その後、このカラムを、4カラム容量の緩衝液D+200 mM イミダゾール溶出前に、4カラム容量の緩衝液C、4カラム容量の緩衝液D (50 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、10×プロテアーゼインヒビターカクテルのストック-Roche 1836170、10 mM β -メルカプトエタノール、0.5 M NaClおよび20% (v/v) グリセロール) および4カラム容量の緩衝液D+50 mMイミダゾールを用いて連続的に洗浄した (図15)。0.5 ml分画を回収し、そして、タンパク質を含む分画をブールし、等分し、そして-80℃で保管した。

【0089】

(実施例7: P450へのヘム取り込みの決定)

精製P450を、10 mM KCNの存在下および10 mM KCNの非存在下において、20 mM リン酸カリウム (pH 7.4) で0.2 mg/ml濃度に希釈し、吸光度スキャンを600~260 nmで測定した。結合ヘムの百分率を、吸光係数 $\epsilon_{420} = 1000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ に基づいて計算した。

【0090】

(実施例8: NADPHシクロームP450還元酵素を用いたリボソームへのシクロームP450酵素の再形成およびアッセイ)

クロロホルム中に、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリンの1:1:1の混合物を、溶解し、乾固するまで蒸発させ、そしてその後、20 mM リン酸カリウム (pH 7.4) に10 mg/mlとなるように再懸濁することによって、リボソームを調製する。精製P450 2D6 (20 pmol)、NADPH P450還元酵素 (40 pmol)、シクロームb5 (20 pmol)の混合物に、最終用量が10 μ lになるよう、4 μ gのリボソームを添加し、37℃で10分間ブレインキュベートする。

【0091】

リボソーム中へのシクロームP450酵素の再形成後、リボソームを、黒色96ウェルプレート (HEPES/KOH (pH 7.4、50 mM)、NADP+ (2.6 mM)、グルコース-6-リン酸 (6.6 mM)、MgCl₂ (6.6 mM) およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (0.4単位/ml) を含む) 中で、アッセイ緩衝液で100 μ lまで希釈する。アッセイ緩衝液はまた、アッセイされるシクロームP450アイソフォームに対する適切な蛍光基質を含む: P450 2D6に対してAMMC、P450 3A4に対してジベンジルフルオレセイン (DBF) またはレソルフィン (resorufin) ベンジルエーテル (BzRes)、および2C9に対してジベンジルフルオレセイン (DBF) が使用され得る。この反応を、「終止溶液 (stopping solution)」 (Trisで緩衝化した80%アセトニトリル) の添加により終了し、そして、生成物を蛍光プレートリーダーで、適切な波長フィルターセットを用いて読みとる (図16)。

【0092】

P450はまた、例えば、補酵素および再生溶液の両方の代わりに、200 μ M クメンヒドロペルオキシドの添加により、化学的に活性化され得る(図17)。

【0093】

さらに、蛍光で測定されるターンオーバー率は、インヒビターの存在下において測定され得る。

【0094】

(実施例9：固定化P450 CYP3A4に結合する薬物の検出)

精製CYP3A4(50mM HEPES/0.01% CHAPS中の10 μ g/ml、pH7.4)を、ストレプトアビジン固定化プレート(Exiqon)(100 μ l/ウェル)に置き、氷上で1時間振とうした。このウェルを吸引し、50mM HEPES/0.01% CHAPSで2回洗浄した。固定化タンパク質に結合した[³H]ーケトコナゾールを、シンチレーションカウンターによって直接に決定した。飽和実験を、50mM HEPES(pH7.4)、0.01% CHAPSおよび10% Super block(Pierce)中において、[³H]ーケトコナゾール(5Ci/mmol、American Radiochemicals Inc.、St. Louis)を用いて実施した(図18)。100 μ lの最終アッセイ容量において、リガンドの6つの濃度を、結合アッセイ(25~1000nM)で使用した。100 μ M ーケトコナゾールにより置換される場合、特異的な結合を規定した。各測定を二重で実施した。室温で1時間のインキュベーション後、ウェルの内容物を吸引し、このウェルを150 μ l氷冷却アッセイ緩衝液を用いて3回洗浄した。100 μ l MicroScint 20(Packard)を、各ウェルに添加し、そして、このプレートをPackard TopCountマイクロプレートシンチレーションカウンターで計数した(図18)。

【0095】

(実施例10：タグ化し、固定化したCYP3A4の化学的な活性化)

CYP3A4を、実施例9に記載するように、ストレプトアビジン固定化プレートに固定化し、次いで、ジベンジルフルオレセインおよび種々の濃度(0~300 μ M)のクメン過酸化水素と共にインキュベートした。エンドポイントアッセイは、タグ化し固定化したCYP3A4が化学的な活性化を用いたターンオーバーアッセイにおいて、機能的であるということを示した(図19)。

【0096】

(実施例11：リボソームまたはミクロソームのゲルカプセル化によるP450の固定化)

リボソームまたはミクロソーム中のNADPHシトクロームP450還元酵素との、シトクロームP450酵素の再形成後、次いで、これらは、例えば、アガロース、ポリウレタンまたはポリアクリルアミドのようなゲルマトリックス内のカプセル化により、表面上に固定化され得る。

【0097】

例えば、低い融解温度(LMT)(1% w/v)のアガロースを、200mM リン酸カリウム(pH7.4)に溶解した。次いで、これを加熱ブロック(heating block)上で37℃まで冷却した。次いで、シトクロームP450 3A4、シトクローム b5およびNADPHシトクロームp450還元酵素を含むミクロソームを、LMTアガロースへ希釈し、その結果、50 μ lのアガロースは、20pmol P450 3A4、40pmol NADPHシトクロームP450還元酵素および20pmol シトクロームb5を含んだ。次いで、50 μ lのアガロースミクロソームを黒色96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、室温で、凝固させた。

【0098】

各ウェルにおいて、100 μ lのアッセイ緩衝液を添加し、このアッセイを、従来の再形成アッセイについて、上記(例えば、実施例8)に記載されるようにして行った。作製されたデータから、BzRes酸化の基本動態とーケトコナゾール阻害の基本動態との比較

を行い(図6)、これは、CYP3A4の活性はゲルカプセル化後も残存したことを示した。

【0099】

【表6】

	カプセル化されたゲル	可溶性
BzRes酸化		
K_M (μM)	49 (18)	20 (5)
$V_{\max}$ (可溶性%)	50 (6)	100 (6)
ケトコナゾール阻害		
IC_{50} (nM)	86 (12)	207 (54)

表6 溶液中およびアガロース中でカプセル化されたシトクロームP450 3A4ミクロソームの、Bz Rez酸化およびケトコナゾールによる阻害に対する動態学的パラメーターの比較

BzResに対する K_M および $V_{\max}$ の推定のために、320 μM までの種々の濃度のBzResの存在下で、アッセイを実施した。ケトコナゾール阻害を、5 μM から3倍希釈を7回行ったケトコナゾールを用いて、50 μM BzResで実施した。括弧内の値は、曲線フィッティングから得られた標準誤差を示す。

【0100】

固定化P450の活性を、7日間にわたって評価した(図20)。同一条件下で保管された同一のタンパク質調製物のアリコート(ゲルでカプセル化される場合を除く)をまた、同一期間にわたってアッセイし、このことは、ゲルカプセル化が、P450活性に対して有意な安定性を与えることを示した。

【0101】

(実施例12: 活性に対する3A4多型の影響の定量的決定)

精製シトクロームP450 3A4アイソフォーム*1、*2、*3、*4、*5および*15(約1 μg)を、ケトコナゾールの非存在下および存在下において、BzResおよびクメン過酸化水素(200 μM)存在下で、96ウェル黒色マイクロタイタープレート中で、200mM KPO_4 緩衝液(pH7.4)で最終容量を100 μl にし、室温にて、インキュベートした。各濃度のBzResまたは各濃度のケトコナゾールについて、最低2回行った。

【0102】

レスルフィン形成を、蛍光の増加(各々520nmの励起および発光フィルターならびに580nmの励起ならびに発光フィルター)で長期にわたり測定し、初期率を進行曲線から計測した(図21)。

【0103】

BzResの K_M^{app} および $V_{\max}^{app}$ の推定のために、バックグラウンド率を、初期率から始めに減算し、次いで、BzRes濃度に対してプロットし、そして曲線を従来のMichaelis-Menton動態に記載するように適合した:

$$V = V_{\max} / (1 + (K_M / S))$$

ここでVおよびSは、それぞれ、初期率および基質濃度である。次いで、 $V_{\max}$ 値をシトクロームP450濃度に対して標準化し、そして野生型酵素に調整した(表7)。

【0104】

ケトコナゾールの IC_{50} の推定のために、バックグラウンド率を、初期率から始めに減算し、次いで、%非阻害率に変換し、ケトコナゾール濃度に対してプロットした(図22)。 IC_{50} 阻害曲線を以下の方程式を用いて適合した:

$$V = 100 / (1 + (I / IC_{50}))$$

ここでVおよびIは、それぞれ、初期率および阻害剤濃度である。得られたデータは、表7に示す:

【0105】

【表7】

	$V_{\max}$ BzRes	K_M BzRes (μM)	IC_{50} ケトコナゾール (μM)
3A4*WT	100 (34)	104 (25)	0.91 (0.45)
3A4*2	65 (9)	62 (4)	0.44 (0.11)
3A4*3	93 (24)	54 (13)	1.13 (0.16)
3A4*4	69 (22)	111 (18)	0.88 (0.22)
3A4*5	59 (16)	101 (11)	1.96 (0.96)
3A4*15	111 (23)	89 (11)	0.59 (0.20)

表7 シトクロームP450 3A4アイソフォームのケトコナゾールによるBzResターンオーバーおよびその阻害に対する動態学的パラメーター

パラメーターを、図21および22でのデータに対するMichaelis-Mentonおよび IC_{50} 阻害曲線の適合から得た。括弧内の値は、曲線適合から得た標準誤差である。

【0106】

(実施例13: 固定化CYP3A4多型のアレイベースのアッセイ)

シトクロームP450多型は、特定の低分子を用いた活性において、微妙な差異を同定するために、アレイフォーマットを用いて並列でアッセイされ得る。例えば、精製シトクロームP450 3A4アイソ型*1、*2、*3、*4、*5および*15は、実施例11に記載されるように、NADPHシトクロームP450還元酵素を用いたリボソームに対して、個々に再形成され得る。次いで、結果として生じたりボソーム調製物を、LMPアガロースへ希釈し得、実施例11に記載されるように、黒色96ウェルマイクロタイタープレートの個々のウェルへ固定化し得る。

【0107】

次いで、固定化タンパク質を、各ウェルに、BzRes+/-ケトコナゾールを含む100 μl のアッセイ緩衝液を添加することによって、実施例11に記載されるようにアッセイし得る。

【0108】

化学的な活性化(実施例12に記載されるように)もまた、アレイ形式で使用し得る。例えば、精製シトクロームP450 3A4アイソフォーム*1、*2、*3、*4、*5および*15を、NADPHシトクロームP450還元酵素なしで、リボソームに、個々に再形成し得、そして、その結果として生じたりボソームを、実施例11に記載されるように、アガロースでのカプセル化を通して固定化し得る。次いで、各ウェルでのシトクロームP450活性を、各ウェルに、BzResおよびクメン過酸化水素(200 μM)、+/-ケトコナゾールを含む100 μl の200mM KPO_4 緩衝液(pH7.4)を添加することにより、実施例12に記載されるように測定し得る。

【0109】

要約すると、本発明者らは、コードされたタンパク質の生物学的活性についてSNPを大量に平行して、ハイスループットスクリーニングするための新規のタンパク質アレイ技術を開発している。その適応性を、野生型p53の各種の機能の分析およびp53の46のSNPバージョンの各種の機能の分析、ならびにp450の対立遺伝子改変体の機能の分析を通じて示した。同一表面検出法およびアッセイ検出法は、現在開発中の他のさらなる種々のアレイに適用し得る。本明細書中で試験している小さいサイズのタンパク質の回収に起因して、本発明者のアレイのスポット密度は、比較的小さく、そして各タンパク質を4重でスポットした。現在、ロボットのスポット能力を用いて、10,000タンパク質/アレイ以上を含むスポット密度に増加することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】図1は、p53変異体群の発現を示す。ヒト野生型p53をコードするプラスミドまたは示された変異体をコードするプラスミドを含むE. coli細胞を、30℃で4時間、誘導した。細胞を、リゾチームおよびTriton X100の添加により溶解し、清澄な溶解産物をウェスタンブロットによって分析した。Hisでタグ化された全長、ビオチン化p53に相当するバンドは、約70kDaで電気泳動する。

【図2】図2は、p53を発現したE. coliのDNA結合機能を示すための、ゲルシフトアッセイを示す。野生型p53 (wt) または示した変異体を含む1 μ lの清澄なE. coli溶解産物を、250 nM DIG標識DNAおよび0.05 mg/ml ポリdI/dC競争物 (competitor) DNAと合わせた。-veコントロールは、DNAのみを含んだ。結合DNAおよび遊離DNAを6%ゲル (NOVEX) に通して分離し、正に荷電させた膜 (Roche) に移し、そして抗DIG HRP結合抗体 (Roche) を用いてDIG標識DNAを検出した。DNA:p53複合体を矢印で示す。

【図3】図3は、p53 DNA結合アッセイに対するマイクロアレイデータを示す。Affymetrix 428アレイスキャナーでスキャンする前に、溶解産物を、A) に詳細されるようにストレプトアビジン捕捉膜上に、4×4パターンでアレイし、B) Cy3標識抗ヒスチジン抗体またはC) Cy3標識GADD45 DNAを用いてプローブした。

【図4】図4は、p53のCKIIリン酸化を示す。p53野生型 (wt) または示した変異体タンパク質を含む2 μ lのE. coli溶解産物を、30℃で30分間、ATPを含む緩衝液中においてカゼインキナーゼIIと共にまたはカゼインキナーゼIIなしでインキュベートした。反応物をウェスタンブロットし、セリン392でのリン酸化をリン酸化特異的抗体を用いて検出した。

【図5】図5は、CKIIリン酸化アッセイに対するマイクロアレイデータを示す。p53アレイを30℃で1時間、CKIIおよびATPと共にインキュベートし、セリン392でのリン酸化に対して分析した。短縮型変異体Q136X、R196X、R209X、R213X、R306Xおよびアミノ酸変異体L344PならびにS392Aを除き、アレイ上の全てのタンパク質に対して、リン酸化を検出した。

【図6】図6は、溶液相MDM2相互作用アッセイを示す。溶解産物を含む10 μ lのp53を、合計容量500 μ lにおいて、溶解産物および20 μ l 抗FLAGアガロースを含む10 μ lのMDM2と共にインキュベートした。室温で1時間インキュベーションした後、抗FLAGアガロースを遠心分離によって回収し、広範囲にわたり洗浄し、そしてウェスタンブロッティングによって結合されたタンパク質を分析した。p53タンパク質をStrept/HRP結合体によって検出した。

【図7】図7は、MDM2相互作用に対するマイクロアレイのデータを示す。p53アレイを、室温で1時間、精製Cy3標識MDM2タンパク質とともにインキュベーションし、DNAアレイスキャナー (Affymetrix) を用いて、結合性MDM2タンパク質を検出した。MDM2タンパク質は、W23A変異体およびW23G変異体とは別の、全てのメンバーのアレイに結合した。

【図8】図8Aは、複製P53マイクロアレイが様々の濃度で、³³P標識二重鎖DNA (GADD45プロモーターエレメントの配列に相当する) の存在下において、インキュベートされ、そして、リン酸イメージャーを用いて画像化し、その結果、個々のスポットが定量化され得たことを示す。図8Bは、野生型p53 (高い親和性)、R273H (低い親和性) およびL344P (非結合剤) と結合するDNAを示し、野生型は7 nMの親和性と予測する。

【図9A】図9Aは、C末端BCCPヘキサヒスチジン構築物の発現に対するpBJW102.2のプラスミドマップを示す。

【図9B-1】図9Bは、pBJW102.2のDNA配列を示す。

【図9B-2】図9Bは、pBJW102.2のDNA配列を示す。

【図9C】図9Cは、開始コドンからのpBJW102.2のクローニング部位を示す。ヒ

トP450、NADPHシトクロームP450還元酵素、ならびにシトクロームb5 ORF、およびその短縮型を、Dra III/Sma Iで消化したpBJW102、2ベクターに連結した。

【図10A】図10Aは、pJW45のベクターマップを示す。

【図10B-1】図10Bは、ベクターpJW45の配列を示す。

【図10B-2】図10Bは、ベクターpJW45の配列を示す。

【図11】図11Aは、ヒトP450 3A4オープンリーディングフレームのDNA配列を示す。図11Bは、全長ヒトP450 3A4のアミノ酸配列を示す。

【図12】図12Aは、ヒトP450 2C9オープンリーディングフレームのDNA配列を示す。図12Bは、全長ヒトP450 2C9のアミノ酸配列を示す。

【図13】図13Aは、ヒトP450 2D6オープンリーディングフレームのDNA配列を示す。図13Bは、全長ヒトP450 2D6のアミノ酸配列を示す。

【図14】図14は、E. coliからの精製シトクロームP450 3A4のウェスタンブロットおよびクマシー染色ゲルを示す。精製シトクロームP450 3A4からのサンプルをSDS-PAGEで泳動し、クマシーを用いてタンパク質を染色したか、またはニトロセルロース膜上にウェスタンブロットし、ストレプトアビジンHRP結合体を用いてプローブし、そしてDAB染色を用いて視覚化した：レーン1：全細胞レーン2：溶解産物レーン3：溶解させたE. coli細胞レーン4：E. coli細胞洗浄液からの上清レーン5：E. coli細胞洗浄液からのペレットレーン6：膜可溶後の上清レーン7：膜可溶後のペレットレーン8：分子量マーカー：175、83、62、48、32、25、16.5、6.5Kda

【図15】図15は、シトクロームP450 3A4のNi-NTAカラム精製のクマシー染色ゲルを示す。カラム精製の全てのステージからのサンプルを、SDS-PAGEで泳動した。レーン1：マーカー175、83、62、48、32、25、16.5、6.5Kdaレーン2：膜可溶物からの上清レーン3：カラムフロースルー(Flow-Through)レーン4：緩衝液Cの洗浄液レーン5：緩衝液Dの洗浄液レーン6および7：緩衝液Dの洗浄液+50mM イミダゾールレーン8~12：緩衝液Dの溶出液+200mM イミダゾール

【図16】図16は、基質AMMCを用いた再構築アッセイにおいて、シトクロームP450 2D6に対する活性のアッセイを示す。組換え型のタグ化CYP2D6を、NADPH-シトクロームP450還元酵素を用いたリポソーム中で再構築後に、AMMCをターンオーバーする能力により、市販のCYP2D6と比較した。

【図17】図17は、クメン過酸化水素活性化シトクロームP450 3A4による、BzResからのレソルフィン(resorufin)形成速度を示す。シトクロームP450 3A4を、160μMまでの漸増BzRes濃度の存在下で、クメン過酸化水素活性化と共に溶液中でアッセイした。

【図18】図18は、固定化されたCYP3A4およびCYP2C9に対する[³H]ケトコナゾールの結合平衡を示す。CYP3A4の場合において、データポイントは、4つの実験における、平均±標準偏差である。非特異的な結合を、100μM ケトコナゾールの存在下で決定した(データは示していない)。

【図19】図19は、ストレプトアビジン表面上に固定化させたCHP活性化P450 3A4による、DBFの蛍光への変換を包含する、タグ化された固定化P450の化学的な活性化を示す。

【図20】図20は、アガロースカプセル化マイクロソームの安定性を示す。シトクロームP450 2D6+NADPHシトクロームP450還元酵素を含むマイクロソーム、およびシトクロームb5を、アガロースで希釈し、96ウェルプレートに配置した。AMMCターンオーバーを、4℃で、すぐに、2日後、および7日後に計測した。

【図21】図21は、シトクロームP450 3A4アイソフォームによるBzResのターンオーバーを示す。シトクロームP450 3A4アイソフォームWT、*1、*2、*3、*4、*5および*15(約1μg)を、BzRes(0~160μM)およびク

メン過酸化水素 (200 μ M) 存在下で、200 mM KPO_4 緩衝液 (pH 7.4) 中で、室温にてインキュベートした。レソルフィンの形成を経時的に測定し、速度を進行曲線から計測した。従来のミカエリス-メンテン動態に記載する曲線をデータに適合した。

【図22】図22は、ケトコナゾールによるシトクロームP450 3A4アイソフォームの阻害を示す。シトクロームP450 3A4アイソフォームWT、* 1、* 2、* 3、* 4、* 5および* 15 (約1 μ g) を、BzRes (50 μ M)、クメン過酸化水素 (200 μ M) およびケトコナゾール (0、0.008、0.004、0.2、1、5 μ M) の存在下において、200 mM KPO_4 緩衝液 (pH 7.4) 中で、室温にてインキュベートした。レソルフィンの形成を経時的に測定し、速度を進行曲線から計測した。I_{C50} 阻害曲線をデータに適合した。

【図1】

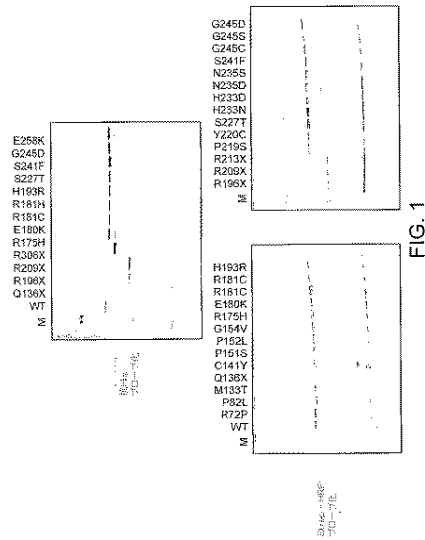


FIG. 1

【図3A】

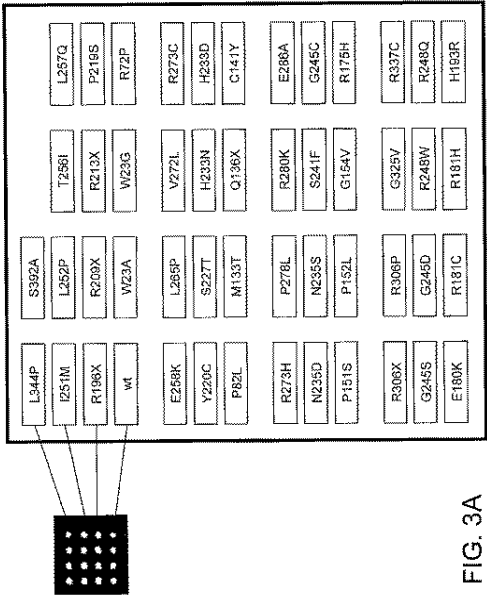


FIG. 3A

【図2】

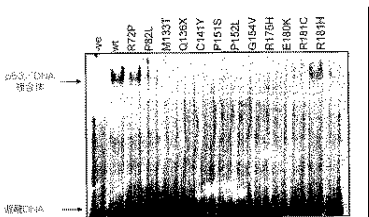


FIG. 2

(34) 伝子変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

【図3B】

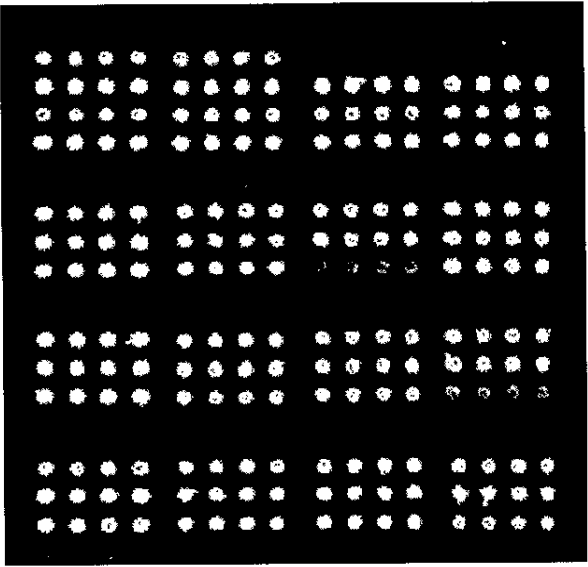


FIG. 3B

【図3C】

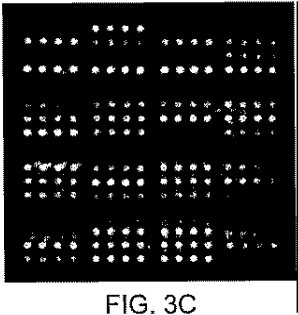


FIG. 3C

【図4】

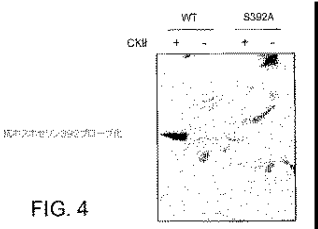


FIG. 4

【図5】

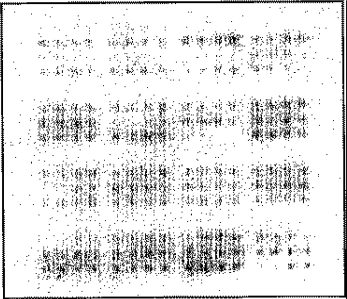


FIG. 5

【図6】

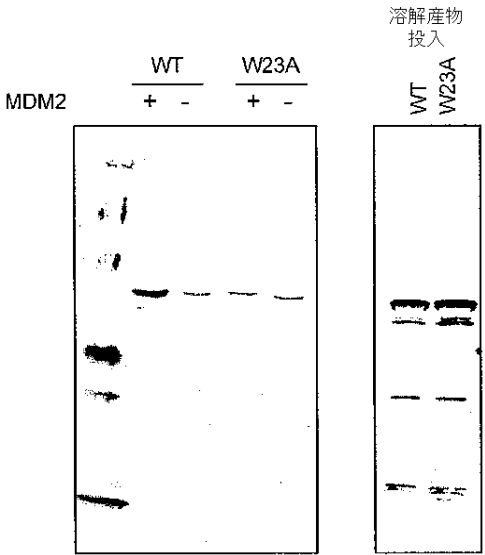


FIG. 6

(35) 異変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

【図7】

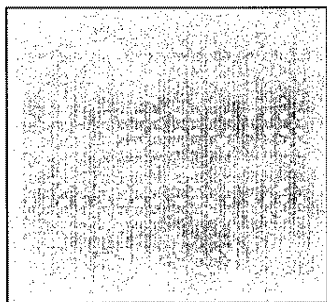


FIG. 7

【図8】

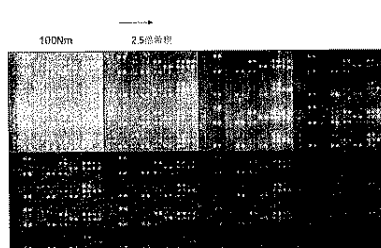


FIG. 8A

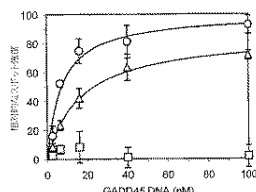


FIG. 8B

【図9A】

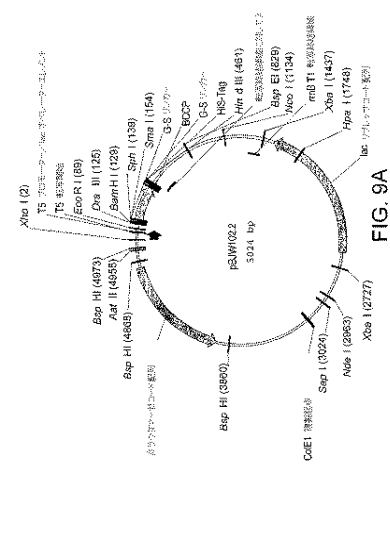


FIG. 9A

【図9B-1】

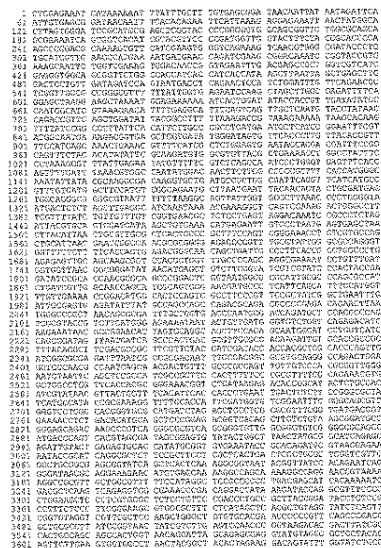


FIG. 9B

【図9B-2】



FIG. 9B 続き

(36) 伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

【图9C】

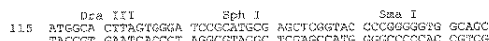


FIG. 9C

【 ㄨ10A 】

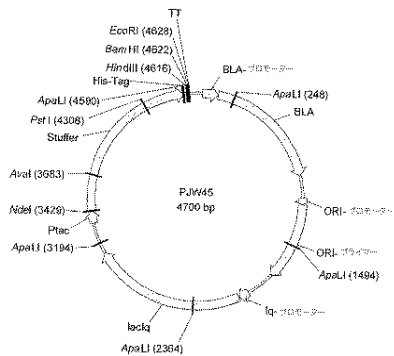


FIG. 10A

【図10B-1】

[illegible]

FIG. 10B

【☒10B-2】

[illegible]

FIG. 10B 續前

【図11A】

1	ATGGGCTGCA	TCCGAGACTT	GCGCTGGAAA	ACCAGCTTTC	TCTGGGCTTT	CAGCGTGGX
2	CTCCCTATTC	TTATATGATG	CAATACACAT	GAGCTTATTA	AGAGCTGATG	AATCTCGGGG
3	CGACGATGCT	CTGCTTTTAT	CTGCTGATTA	TTGCGTACAT	ATAAGSGGCT	TGTGATGTTT
4	CTGCTGATGCT	CTGCTGATTA	TGCTATGATG	TTGCTGATTA	TTATGATGAT	TGACAGCTCT
5	GGCTCTGATG	CCGAGGAGCG	TTTGGGCTCA	GTGGGATGTA	TGAAAGGATG	CATCTTCATA
6	CAACTGATGA	AGGCTGATGA	CGATGATGCA	CAATGCTGAT	CTGACAGCTG	CAGACGAGGA
7	AGGCGGAGAG	GGGCTGATGA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CAGACATCTG
8	ATGGATGATG	CTGCTGATTA	ACAGCTTATG	GTGACATCTG	ACCTCTGATG	CAGATCTGAT
9	CTGCTGATTA	CGATCTTCTG	ATCTGCTGAT	TTGAGATGTT	TTATTTTGGA	TGCACTTTTT
10	CTGCTGATTA	AGCTGATGAT	TTGCTGATTA	TAATCTGATG	AAAGGATGAT	AGAGATGATG
11	CTGCTGATTA	CAGATGATGA	CGAGGATGAT	TTGCTGATG	TGATGATGAT	CTGCTGATTA
12	CTGCTGATTA	CGATGATGAT	CGATGATGAT	ACGATGATG	CTGCTGATG	CGATGATGAT
13	ATCTTATTTT	TTGCTGATTA	TGAGATGATG	CGAGGATGAT	TAATGATGAT	CTGCTGATTA
14	CTGCTGATTA	ACCTGATGAT	CGATGATGAT	CTGCTGATG	TAATGATGAT	CTGCTGATTA
15	ATGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	AGATCTGATG	CTGCTGATTA
16	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
17	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
18	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
19	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
20	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
21	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
22	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
23	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
24	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
25	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
26	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
27	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
28	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
29	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
30	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
31	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
32	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
33	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
34	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
35	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
36	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
37	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
38	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
39	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
40	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
41	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
42	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
43	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
44	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
45	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
46	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
47	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
48	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
49	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
50	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
51	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
52	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
53	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
54	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
55	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
56	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
57	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
58	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
59	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
60	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
61	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
62	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
63	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
64	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
65	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
66	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
67	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
68	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
69	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
70	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
71	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
72	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
73	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
74	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
75	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
76	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
77	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
78	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
79	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
80	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
81	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
82	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
83	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
84	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
85	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
86	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
87	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
88	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
89	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
90	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
91	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
92	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
93	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
94	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
95	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
96	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
97	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
98	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
99	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA
100	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATTA	CTGCTGATG	CTGCTGATG	CTGCTGATTA

FIG. 11A

【図11B】

1)	MLPFDJLME	WILLIAMS	LYLYTCH	GLPKKLSZPC	FFILPITGMI	LSYKSPQPM
6)	DMXCHXNYK	WYGFYDQGP	VLAITDPM	KLWFEZC	WYKXGSLST	WYKXGSLST
12)	AEDEWZNRG	SLGSPSTGP	KLMUVVITA	OYGTUJHML	WYKXGSLST	WYKXGSLST
18)	MMYITSTFR	VNDLNLGSD	DFEYMKTKL	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST
24)	FRVETVTRP	KSVKMRKRP	LSDTQVQVQ	FLOMIDNCP	WYKXGSLST	WYKXGSLST
30)	FLFRAGTST	SEKSPFMIE	LKNDWQWQ	LGSTIDVSN	NHAPPTZTG	LMQWYLMQ
36)	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST
42)	KXKMDKDEY	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST
48)	GLGKPEKTY	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST	WYKXGSLST

FIG. 11B

【図12A】

[illegible]

FIG. 12A

【図12B】

1	MDGAMVWLC	ACTGCTSLW	ROSGSGKGL	FGFPLVPIG	MIQTGTNOL	SNSVTHLRY
61	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS
121	RIHRSRSTST	RIHRSRSTST	RIHRSRSTST	RIHRSRSTST	RIHRSRSTST	RIHRSRSTST
181	ITPFRKTHY	QVQVLMKIK	IMNKLTKIK	PIGLNGLIK	PTDTPYDYS	SKLKLKIK
241	RIYSLRGVSE	ROSGSGKGL	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS
301	PTSTSLRSL	LLKLLRSTP	ARQVSEIEN	IGKSNPSGO	DSBMYPTDA	VWVQVYDYS
361	LPTSLRSLR	TDKLEPRLT	IKGTLTILS	LTSVLMKIK	FPPNPEPDI	HLGEGENIK
421	RSKSTFESFA	SKRACVGEAL	IKGTLTILS	SLTLMKIK	LDNKLWDTL	YPMGFSVSE
481	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS
541	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS
601	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS	QVPTVYDYS

FIG. 12B

(37) 遺伝子改変体のためのタンパク質アレイおよびその使用

【図13A】

```

1 ATGGGGGCTAG AAGGAGTGGT GCGCTGGCC GTCATAGTGG CACATCTGCC GCTCTGGGFB
61 GACCTGATGC ACAGGGGCGCA ACGCTGGGCT GCGAGCTAGC CACAGAGGCC CCGCGGACFB
121 CCGGGGCGCG GGAATCTGGT GATGTGGAG TCGAGAGACA CACCTACTG CTTCGACCA
181 TCGGGGCGCG GCTTGGGGA GCTTGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
241 CTCATGGGCG TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG CTGGTGGGCC ACGGAGAGGA CACCGGCGGAC
301 GCGCGGCGCG TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
361 GCGGGGCGCG GCTTGGGGA GCTTGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
421 AACTTGGGCG TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
481 TCGGGGCGCG TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
541 GCGGGGCGCG GCTTGGGGA GCTTGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
601 GCTTGGGCGCT TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
661 GCGGGGCGCG GCTTGGGGA GCTTGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
721 TCGGGGCGCG TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
781 ACGTGGGCGCT TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
841 AAGGGGCGCG GGAATCTGGT GATGTGGAG TCGAGAGACA CACCTACTG CTTCGACCA
901 GACCTACTG CTTCGACCA GCTTGGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
961 ATGATCTGGT ACGTGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
1021 GCGGGGCGCG GCTTGGGGA GCTTGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
1081 CATGGGCGCG GCTTGGGGA GCTTGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
1141 GACCTACTG CTTCGACCA GCTTGGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
1201 TCGGGGCGCG TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
1261 TCGGGGCGCG TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
1321 GCTTGGGCGCT TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA
1381 CTGAGAGGCC GCTTGGGAG CCGAGAGTGG CTGAGAGGCC GCTTGGGAG
1441 TTGGGCGCT TCGGGGCGCT GCGGGGCGCG GCTTGGGAG CACCTACTG CTTCGACCA

```

FIG. 13A

【図13B】

```

1 NGELALVELA VIVATLLLV DMHRRQWMA ARTTGGGCGT GCGGALHVO FQNTFYCTDQ
61 DRRSGGCGCG GGAATCTGGT GATGTGGAG TCGAGAGACA CACCTACTG CTTCGACCA
121 JARYGEARWE DRRSGGCGCG GGAATCTGGT GATGTGGAG TCGAGAGACA CACCTACTG
181 AVSNTASLT DRRSGGCGCG GGAATCTGGT GATGTGGAG TCGAGAGACA CACCTACTG
241 LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ
301 DRRSGGCGCG GGAATCTGGT GATGTGGAG TCGAGAGACA CACCTACTG CTTCGACCA
361 DRRSGGCGCG GGAATCTGGT GATGTGGAG TCGAGAGACA CACCTACTG CTTCGACCA
421 LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ
481 FAPJASPSY LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ LSGQATUTQ

```

FIG. 13B

【図14】

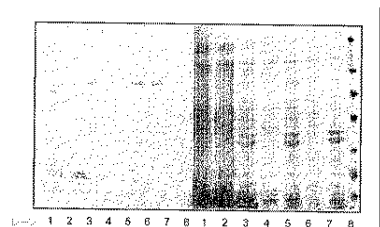


FIG. 14

【図15】

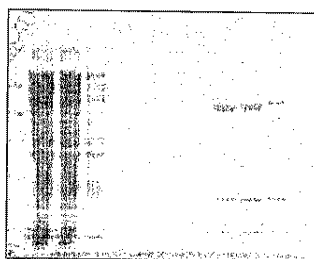


FIG. 15

【図16】

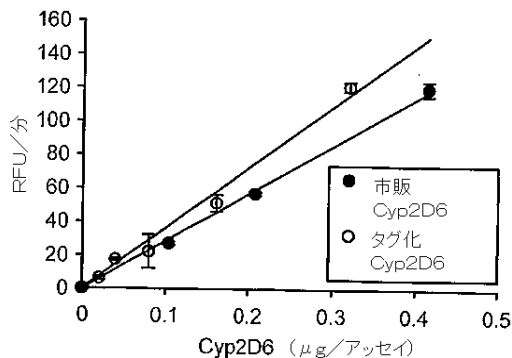


FIG. 16

【図17】

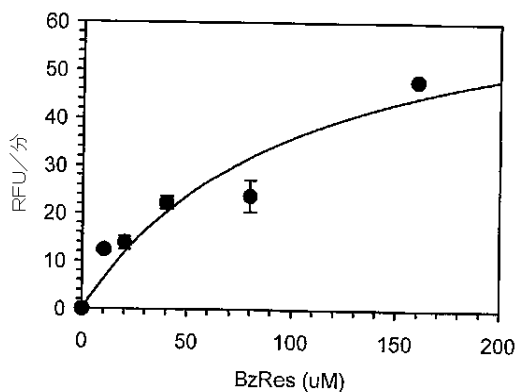


FIG. 17

【図18】

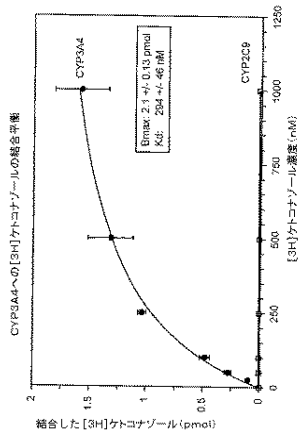


FIG. 18

【図19】

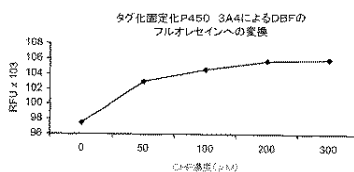


FIG. 19

【図20】

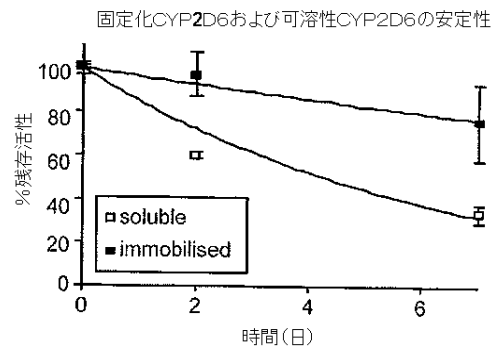


FIG. 20

【図21】

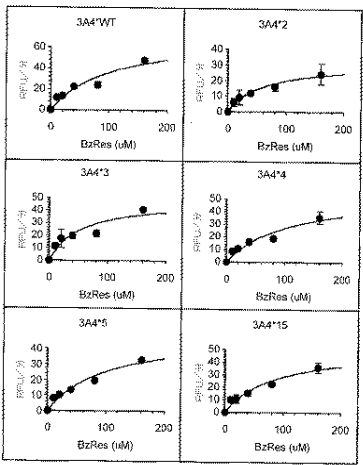


FIG. 21

【図22】

【配列表】

0004781628000001.app

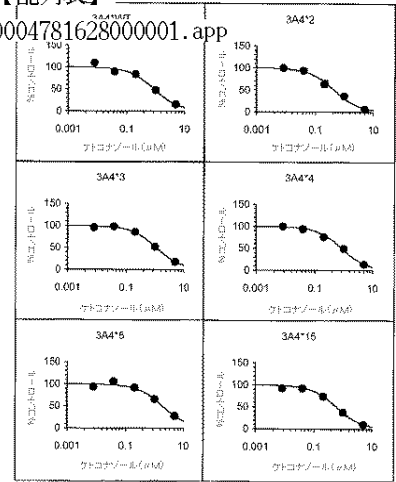


FIG. 22

- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (72)発明者 ボウテル, ジョナサン マーク
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,
センス プロテオミック リミテッド
- (72)発明者 ゴッドバー, ベンジャミン レズリー ジェームス
イギリス国 シービー2 4エーティー ケンブリッジシャイアー, バブラハム, バブラハム
ホール, センス プロテオミック リミテッド
- (72)発明者 ハート, ダレン ジェームス
イギリス国 シービー2 4エーティー ケンブリッジシャイアー, バブラハム, バブラハム
ホール, センス プロテオミック リミテッド
- (72)発明者 ブラックバーン, ジョナサン デービッド
イギリス国 シービー3 0エイチエス ケンブリッジ, ウッドラークロード 36

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 国際公開第01/029220 (WO, A1)
国際公開第00/004390 (WO, A1)
国際公開第01/057198 (WO, A1)
国際公開第01/083827 (WO, A1)
特開2001-128691 (JP, A)
特表2003-512057 (JP, A)
特表2002-520621 (JP, A)
特表2003-521922 (JP, A)
特表2004-511753 (JP, A)
特開2000-184888 (JP, A)
特表2004-527229 (JP, A)
特表平05-505241 (JP, A)
Mutant conformation of p53 precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library., Journal of molecular biology, (1992) 225, p577-583., 1992年
Chapter 18. Cytochrome P450 CYP2D6., Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. 1999, 1999年

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - G01N 33/98
C12N 15/09
G01N 37/00