

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5339387号
(P5339387)

(45) 発行日 平成25年11月13日(2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月16日(2013.8.16)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 21/80 (2006.01)	GO 1 N 21/80	
GO 1 N 33/58 (2006.01)	GO 1 N 33/58	Z
GO 1 N 33/84 (2006.01)	GO 1 N 33/84	A
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z

請求項の数 11 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-526793 (P2011-526793)	(73) 特許権者	503360115
(86) (22) 出願日	平成22年8月10日(2010.8.10)		独立行政法人科学技術振興機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/063787		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02011/019082	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成23年2月17日(2011.2.17)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成24年2月7日(2012.2.7)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	特願2009-185639 (P2009-185639)		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成21年8月10日(2009.8.10)	(72) 発明者	宮脇 敦史
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		埼玉県和光市丸山台2-2-10-103
		(72) 発明者	片山 博幸
			埼玉県朝霞市本町1-33-48-202
		審査官	廣田 健介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オートファジーの測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内のオートファジーをインビトロで測定する方法であって、リソソームまたは液胞内での分解酵素活性に耐性があり、pHが酸性から中性の環境下で変性または失活せず、かつ、酸性域と中性域の環境に置かれたときに励起スペクトルを変化させることができるが蛍光スペクトルのピーク波長がほぼ一定である単一の蛍光蛋白質をプローブ試薬として使用して、オートファジーに関連したpHの変化に依存した蛍光プローブ試薬の蛍光特性の変化を測定し、これによってオートファジーの存在または活性を測定することを含む、ただし該蛍光特性の変化を2波長励起1波長蛍光測定によって行い、このとき2つの異なる励起波長で蛍光強度を測定しそのレシオ(比率)を決定することを特徴とする、ならびに、前記蛍光蛋白質が、*Comptonia* sp. 蛍光蛋白質由来の蛍光蛋白質 *mKeima* および *dKeima*、ならびに、*mKeima* または *dKeima* と同等の前記特性を有する、かつ、*mKeima* または *dKeima* のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の置換を有するアミノ酸置換変異体からなる群から選択される蛍光蛋白質であることを特徴とする、前記方法。

【請求項2】

前記オートファジーの存在または活性が、前記細胞内でリソソームまたは液胞内へ移行したプローブ試薬の存在またはその量として測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記酸性から中性の環境が、少なくともpH4~8の環境である、請求項1または2に

記載の方法。

【請求項 4】

前記蛍光蛋白質が、目的の内在性蛋白質と結合されたコンジュゲートの形態で前記細胞内に存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記内在性蛋白質が、疾患関連蛋白質である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記蛍光蛋白質が、オルガネラへ選択的に移行させるための移行シグナル配列と結合されたコンジュゲートの形態で前記細胞内に存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記蛍光蛋白質が、該蛍光蛋白質をコードする DNA を含む発現ベクターの形態で前記細胞内に導入される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記蛍光蛋白質が、目的の内在性蛋白質と、リンカーを介して、結合されたコンジュゲートの形態で前記細胞内に存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記コンジュゲートが、該コンジュゲートをコードする DNA を含む発現ベクターの形態で前記細胞内に導入されて存在する、請求項 4 ~ 6 および 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

オートファジー異常を原因とする疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、該疾患と関連する細胞に、リソソームまたは液胞内での分解酵素活性に耐性があり、pH が酸性から中性の環境下で変性または失活せず、かつ、酸性域と中性域の環境に置かれたときに励起スペクトルを変化させることができるが蛍光スペクトルのピーク波長がほぼ一定である単一の蛍光蛋白質を含むプローブ試薬と、候補薬剤とを導入し、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて、該細胞のオートファジー活性を測定し、該活性が対照と比べて増加したとき該候補薬剤が治療効果を有すると決定することを含むことを特徴とする、ならびに、前記蛍光蛋白質が、*Comptonia* (*Montipola* sp.) 蛍光蛋白質由来の蛍光蛋白質 *mKeima* および *dKeima*、ならびに、*mKeima* または *dKeima* と同等の前記特性を有する、かつ、*mKeima* または *dKeima* のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸の置換を有するアミノ酸置換変異体からなる群から選択される蛍光蛋白質であることを特徴とする、前記方法。

【請求項 11】

前記疾患が、神経変性疾患である、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オートファジーの測定方法に関する。

本発明はまた、上記測定方法を利用してオートファジー異常関連疾患の治療薬をスクリーニングするための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

オートファジーは、真核細胞に普遍的にみられる細胞質成分の分解経路である。オートファジーはそのメカニズムから、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの 3 つに分類されているが、いずれの経路でも細胞質成分は最終的にリソソーム（酵母や植物では液胞）に取り込まれ、そこに存在する分解酵素により分解される。分解を受ける細胞質成分としては、蛋白質などの分子にとどまらず、ミトコンドリアや小胞体などといったオルガネラも含まれる。オートファジーは栄養成分の飢餓によって誘導されるため、細胞質成分の分解物の再利用による細胞への栄養成分の補給が

10

20

30

40

50

そのおもな役割と考えられてきたが、最近、蛋白質やオルガネラの品質管理、細菌感染、抗原提示、さらには細胞死や癌化など、多様な生命現象に関わることが明らかになってきた。また、細胞内で蓄積、凝集する異常な蛋白質の分解、除去にも関わるため、このような異常蛋白質の蓄積による細胞死によって発症するとされるハンチントン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患にも関係することが示唆されている (Deretic, V. and Klionsky, D. J., *Scientific American*, Vol. 298, p. 74 - 81, 2008)。このような状況で、これらの生命現象のメカニズムの解明や関連する疾患の治療法の開発のために簡便で精度の高いオートファジーの測定法の開発が望まれている。

従来、オートファジーは電子顕微鏡による細胞の観察や、放射性同位元素で標識された蛋白質の分解、オートファジーが起こることで特異的に活性化するように仕組まれた酵素の活性を測定するなどといった手法で測定されてきたが、いずれもオートファジーに特異的なものではなかったり、操作が煩雑で熟練と時間を要したりしていた。

最近では、GFPで代表される蛍光蛋白質の応用技術の発展により、オートファジーに関与する蛋白質を蛍光蛋白質で標識し、その動態を顕微鏡イメージングやフローサイトメトリといった蛍光法で計測する手法が一般化されてきた。このような手法により、オートファジーが起きた細胞で簡便に測定できるようになった。

マクロオートファジーでは、まず細胞質の一部が隔離膜と呼ばれる膜によって取り囲まれ、直径約1 μm のオートファゴソームと呼ばれる小胞が形成される。その後、オートファゴソームがリソソームと融合することで、取り込まれた細胞質成分が分解される。これまでに見つかっているオートファジーに関与する蛋白質の中には、LC3のようにオートファゴソームの形成に関わり、その膜に局在するものが知られている。そこでこのような蛋白質を蛍光蛋白質と融合させて細胞に発現させ、その小胞状構造への集積や、リソソームでの分解による蛍光強度の減少をモニタすることで、オートファジーの測定が行われている (Mizushima, N., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol. 36, p. 2491 - 2502, 2004およびShvets, E. et al., *Autophagy*, Vol. 4, p. 621 - 628, 2008)。

しかし、オートファゴソームの形成はマクロオートファジーにのみ見られる現象のため、この方法ではミクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーの検出は行えない。ミクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーでは、オートファゴソームのような輸送用の小胞形成は行われず、細胞質成分が直接リソソームに取り込まれるとされているが、マクロオートファジーほど研究が進んでおらず、有効な測定法が存在していないのが現状である。したがって、細胞内で起きているすべてのタイプのオートファジーの総量を知ることができない。

一方で、細胞質のpHが7付近の中性であるのに対し、オートファジーで細胞質成分の分解が行われるリソソームや液胞内のpHが4付近の酸性であることを利用して、分解酵素に耐性をもつ蛍光プローブ試薬の、リソソームや液胞への移行にともなうpHの変化に依存した蛍光特性の変化からオートファジーを検出する方法がある。すべてのタイプのオートファジーで、細胞質成分は最終的にリソソームや液胞に取り込まれるため、この方法ではオートファジーの総量を測定することができる。この方法の例として、Rosadoら (Rosado, C. J. et al., *Autophagy*, Vol. 4, p. 205 - 213, 2008) は、環境のpHの変化に依存せず比較的一定の蛍光を発する蛍光蛋白質 (DsRed.T3) と、pHが酸性に向かうと蛍光強度が弱くなる蛍光蛋白質 (super ecliptic pHluorin) をリンカーとなるペプチドを介して連結させた形のプローブ試薬を使用している。DsRed.T3は赤色 (587 nm) の、super ecliptic pHluorinは緑色 (508 nm) の蛍光を発する蛍光蛋白質である。このプローブを細胞質に発現させ、他の細胞質成分とともにリソソームに取り込まれたときのpHの変化を2色の蛍光強度のレシオの変化として計測することでオートファジー活性が測定されている。

しかし、上記のRosadoらの場合2つの蛍光蛋白質を使用しているため、標識とし

でのサイズが大きくなり、ある対象とする蛋白質に融合させたときには、立体的な障害によりその活性や局在を阻害する可能性が大きいこと、2つの蛍光蛋白質が細胞内のプロテアーゼで切断されてしまったときに不正なシグナルを発するおそれがあること、2つの蛍光蛋白質の細胞内でのフォールディング速度や退色などによる消光特性などpHに依存しない蛍光特性にも差があることから、レシオの値がその時々の実験条件で変わってしまう可能性が大きいこと、レシオの変化がsuper ecliptic pHluorinの蛍光の変化にのみ依存しているため、大きな変化を得ることができないことなどから、精確なオートファジーの活性の測定が困難であるという問題がある。

【発明の概要】

【0003】

上記背景技術に記載した事情により、簡便で精度の高いオートファジーの測定法の開発が望まれている。

本発明者らは、今回、細胞が示す、蛋白質やオルガネラなどの細胞質成分の分解系であるオートファジーの活性をより精確に測定する方法を見出した。具体的には、オートファジーが、細胞質成分が、pHが中性である細胞質から酸性であるリソソームや液胞に取り込まれる反応であることを利用して、そこでの分解活性に耐性があり、pHの変化に応じてスペクトルを変化させる単一の蛍光蛋白質をプローブ試薬として使用することを特徴とする、細胞内のオートファジーの新規測定法を見出した。すなわち、酸性と中性で蛍光強度を逆方向に変化させるスペクトルをもつ単一の蛍光蛋白質をプローブ試薬とすることで、細胞のオートファジーの活性をより精確に測定することができる。

したがって、本発明は、以下のように要約される。

(1) 細胞内のオートファジーをインビトロで測定する方法であって、リソソームまたは液胞内での分解酵素活性に耐性があり、pHが酸性から中性の環境下で変性または失活せず、かつ、酸性域と中性域の環境に置かれたときに励起スペクトルまたは蛍光スペクトルを変化させることができる単一の蛍光蛋白質をプローブ試薬として使用して、オートファジーに関連したpHの変化に依存した蛍光プローブ試薬の蛍光特性の変化を測定し、これによってオートファジーの存在または活性を測定することを含む、ただし該蛍光特性の変化を2波長励起1波長蛍光測定または1波長励起2波長蛍光測定によって行い、このとき2つの異なる励起波長または2つの異なる蛍光波長で蛍光強度を測定しそのレシオ(比率)を決定することを特徴とする、上記方法。

(2) 上記オートファジーの存在または活性が、上記細胞内でリソソームまたは液胞内へ移行したプローブ試薬の存在またはその量として測定される、上記(1)に記載の方法。

(3) 上記酸性から中性の環境が、少なくともpH4~8の環境である、上記(1)または(2)に記載の方法。

(4) 上記蛍光蛋白質が、コモンサンゴ(Montipolia sp.)由来の蛍光蛋白質またはそれと同等の蛍光特性をもつその変異体である、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 上記蛍光蛋白質が、目的の内在性蛋白質と、場合によりリンカーを介して、結合されたコンジュゲートの形態で前記細胞内に存在する、上記(1)~(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 上記内在性蛋白質が、疾患関連蛋白質である、上記(5)に記載の方法。

(7) 上記蛍光蛋白質が、オルガネラへ選択的に移行させるための移行シグナル配列と結合されたコンジュゲートの形態で上記細胞内に存在する、上記(1)~(4)のいずれかに記載の方法。

(8) 上記蛍光蛋白質または上記コンジュゲートが、該蛍光蛋白質またはコンジュゲートをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で上記細胞内に導入される、上記(1)~(7)のいずれかに記載の方法。

(9) オートファジー異常を原因とする疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、該疾患と関連する細胞に、リソソームまたは液胞内での分解酵素活性に耐性があり、pH

10

20

30

40

50

が酸性から中性の環境下で変性または失活せず、かつ、酸性域と中性域の環境に置かれたときに励起スペクトルまたは蛍光スペクトルを変化させることができる単一の蛍光蛋白質を含むプローブ試薬と、候補薬剤とを導入し、上記(1)~(8)のいずれかに記載の方法を用いて、該細胞のオートファジー活性を測定し、該活性が対照と比べて増加したとき該候補薬剤が治療効果を有すると決定することを含む、上記方法。

(10) 上記疾患が、神経変性疾患である、上記(9)に記載の方法。

本発明により、分解に強い耐性があり、酸性と中性で蛍光強度をそれぞれ逆方向に変化させる、単一の蛍光蛋白質をプローブ試薬として使用することにより、従来の2つの蛍光蛋白質を組み合わせ使用したときと比べて、オートファジーの活性をより大きな蛍光強度のレシオ(ratio;比率)の変化として捕らえられるようになった。これにより、わずかな活性量の差をより明確に識別できるようになる。また、2つの蛍光蛋白質のフォールディング速度や消光速度などといった特性の違いによって生じる測定上の問題が解消されることから、より定量的なオートファジーの測定が行えるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、mKeimaの励起スペクトルのpHによる変化を示す。図1Aは、mKeima(コモンサゴ(Montipolasp.)由来の単量体の蛍光蛋白質)の励起スペクトル、蛍光スペクトルとそのpH依存性を示す。図1Bは、mKeimaの励起ピークレシオ(586nm/440nm)のpH依存的変化を示す。図1Cは、図1AからpH7.0(細胞質のpH)、4.0(リソソームのpH)の各励起ピークを抜粋したものを示し、pH依存的な励起ピークの変化が観察される。

図2は、MEF細胞でのオートファジーの検出例を示す。図2A,B,Cは、MEF細胞にmKeimaをトランスフェクションし、24時間後の蛍光像を示す。具体的には、438/24フィルターで励起した蛍光像(A)、550DF30フィルターで励起した蛍光像(B)、およびB/Aのレシオ画像(C)をそれぞれ示す。図から、オートファジーにより酸性のリソソームに移行したmKeimaからのシグナルが観察される。図2Dは、細胞質またはリソソームからのmKeimaシグナルのレシオ値(550nm/438nm)を示す。

図3は、MEF細胞でのマイトファジーの検出例を示す。図3A,B,Cは、2xCOX8mKeimaを発現するMEF細胞を2mM FCCP+1mg/ml Oligomycinで処理し、マイトファジーを誘導した。具体的には、438/24フィルターで励起した蛍光像(A)、550DF30フィルターで励起した蛍光像(B)、B/Aのレシオ画像(C)をそれぞれ示す。図3Dは、ミトコンドリアまたはリソソームからのmKeimaシグナルのレシオ値(550nm/438nm)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0005】

以下に、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、細胞内のオートファジーを測定する方法であって、リソソームまたは液胞内での分解酵素活性に耐性があり、pHが酸性から中性の環境下で変性または失活せず、かつ、酸性域と中性域の環境に置かれたときに励起スペクトルまたは蛍光スペクトルを変化させることができる単一の蛍光蛋白質をプローブ試薬として使用して、オートファジーに関連したpHの変化に依存した蛍光プローブ試薬の蛍光特性の変化を測定し、これによってオートファジーの存在または活性を測定することを含む方法を提供する。

<オートファジー>

背景技術の欄に記載したように、オートファジー(autophagy;「自食作用」ともいう)は、細胞が自らの蛋白質、オルガネラ(例えば、ミトコンドリアや小胞体等)などの細胞質成分を分解する仕組みであり、そのメカニズムから、マクロオートファジー、ミクロオートファジーおよびシャペロン介在性オートファジーの3つに分類される。本発明の方法は、細胞内で起こるこれらのオートファジー活性の総量を精確に測定することを可能にする。

10

20

30

40

50

本明細書において「オートファジー活性」は、細胞内のクリアランス（浄化）能を指す。オートファジー活性がより高いとき、生細胞においてクリアランスが機能しているといえる。また、オートファジーが正常に機能しているとき、細胞の恒常性が維持されると考えられる。

マクロオートファジーは、栄養成分の飢餓状態、蛋白質の過剰産生、異常蛋白質の蓄積などのストレスを細胞が受けると、そのような蛋白質、オルガネラなどの細胞質成分とリン脂質とが細胞質内に集積しオートファゴソームが形成され、動物細胞の場合にはオートファゴソームと細胞内リソソームが膜融合を起こしてオートリソソームが形成され、一方、酵母や植物細胞の場合にはオートファゴソームと液胞とが膜融合し、その結果、リソソームや液胞内で、そこに存在する蛋白質分解酵素によって細胞質成分が分解される、かような分解経路である。

10

ミクロオートファジーは、過剰産生蛋白質や異常蛋白質などの細胞質成分を、膜融合を介さずに、直接、リソソームや液胞に取り込み分解する、かような分解経路である。

シャペロン介在性オートファジーは、シャペロンが過剰産生蛋白質や異常蛋白質などの細胞質成分に結合することによって、細胞質成分がリソソームや液胞内に取り込まれ、その内部で分解される、かような分解経路である。

最近の研究によって、オートファジーは、蛋白質やオルガネラの品質管理、細菌感染、抗原提示、細胞死、癌化、胚発生など、多様な生命現象に関わることが明らかになっているし、また、細胞内で蓄積、凝集する異常な蛋白質の分解や除去にも関わるといわれている。さらにまた、そのような異常蛋白質の蓄積による細胞死によって発症するとされるハンチントン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患にも関係することが指摘されている。オートファジー活性の精確な測定が、このような疾患に対する病因や治療法の解明などに結びつくかもしれない。

20

< 蛍光蛋白質 >

本発明の方法では、プローブ試薬として単一の蛍光蛋白質を使用することを特徴とする。この蛍光蛋白質は、(i) リソソームまたは液胞内での分解酵素活性に耐性があり、(ii) pHが酸性から中性の環境下で変性または失活せず、かつ、(iii) 酸性域と中性域の環境に置かれたときに励起スペクトルまたは蛍光スペクトルを変化させることができるという特性を有する。

上記特性(i)は、本発明の方法がオートファジーを測定することにあるので、その測定に使用するプローブ試薬がリソソームや液胞内で分解されるようでは精確な測定を妨げることになるため、分解酵素活性に耐性を有している。

30

上記特性(ii)は、細胞では、細胞質内が中性域のpHであるのに対して、リソソームや液胞内が酸性域のpHであり、本発明で使用されるプローブ試薬は中性域から酸性域の細胞内環境に置かれるため、このような環境下で変性または失活されてはならない。

上記特性(iii)は、プローブ試薬が酸性域と中性域の環境に置かれたときに、酸性域と中性域とで蛍光強度を逆方向に変化させるスペクトルをもつ、かような特性である。図1Aをみると、約500nmにpHの変化に依存せずに蛍光強度がほぼ一定である等吸収点または等蛍光点が存在しており、その波長の前後でpHの変化に依存して蛍光強度を逆方向に変化していることがわかる(図1C)。このようなスペクトルの波形から、等吸収点または等蛍光点をはさんだ適当な2波長で蛍光強度の測定を行うことによって、レシオメトリック(比率測定)法による蛍光測定が可能となるし、また、2波長で互いの蛍光強度が逆方向に変化するため、大きなレシオ(比率)の変化を得ることができる。

40

上記特性をもつ蛍光蛋白質は、以下のものに限定されないが、例えばコモンサンゴ(*Montipora* sp.)由来の蛍光蛋白質(Keima)、例えばその単量体Keima(mKeima)または二量体Keima(dKeima)、それらと同等の蛍光特性をもつその変異体、例えばdKeima-RedTM(Amalgam社、MBL社など; Kogure, T. et al., (2006) Nat. Biotechnol. 24: 577-581)などを含む。

ここで「同等の蛍光特性」とは、特に上記(iii)の特性を指すが、本発明で使用可

50

能な上記変異体は、上記(i)および(ii)の特性も有しているべきである。

例えば、後述の実施例1に記載されるように、mKeimaの励起スペクトルは、pH 4.0では586nm、7.0では440nmの励起のピークをもつこと、約500nmに等吸収点を持ち、この波長の前後でpHに依存して蛍光強度が互いに逆方向に変化する。一方、蛍光波長は620nmにピークをもち、これはpH4-10の間でほぼ一定である。

その他、dKeima-Redの場合、最大励起波長が440nmであり、最大蛍光波長が616nmであり、その等吸収点が約550nm付近に存在する。

蛍光蛋白質の場合、それにアミノ酸残基の置換などの変異を導入することによって天然型蛋白質と異なる蛍光特性を付与することがよく行われる。このような置換は、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換であり、これはそれぞれ、電気的、構造的、疎水性/極性などのいずれかの化学的または物理的性質の同じアミノ酸間または異なるアミノ酸間での置換をいう。例えば疎水性アミノ酸にはGly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Proなどが含まれ、極性アミノ酸にはAsn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cysなどが含まれ、酸性アミノ酸にはAsp, Gluが含まれ、塩基性アミノ酸にはArg, Lys, Hisが含まれ、芳香族アミノ酸にはPhe, Tyr, Trp, Hisが含まれる。置換は、PCR法と組み合わせてもよい部位特異的突然変異誘発法(Sambrookら, Molecular Cloning, 第2版, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Mark, D. F.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5662-5666 (1984))を使用するかあるいは市販の変異導入用キット(例えば, Mutan-super Express Kmキット(Takara))を利用して行うことができる。

スペクトル特性を変えるには蛋白質に、蛍光を有し安定性が増した構造変化を起こすことが望ましく、そのためには非保存的アミノ酸置換が好ましい。いずれにしても、本発明で使用される蛍光蛋白質は、上記(i)、(ii)および(iii)の特性を備えているべきであり、種々の新規および公知の蛍光蛋白質のなかから、実施例1<mKeimaの励起スペクトル>に例示したような実験を行うことによって、図1Aに示すようなスペクトル特性をもつ蛍光蛋白質を選抜することができる。

本発明で使用される蛍光蛋白質は、天然からの精製蛋白質、組換え蛋白質、化学合成(ペプチド合成)された蛋白質のいずれでもよいが、比較的多量に製造可能であるという点で組換え蛋白質が好ましい。

組換え蛋白質は、慣用の遺伝子組換え技術を用いて製造することができる(Sambrookら, Molecular Cloning, 第2版, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ausubelら, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, 等)。

蛍光蛋白質をコードするDNAは、その蛋白質を発現する生物細胞からクローニングされる。すなわち、該DNAの一次構造が知られている場合には、その部分配列に基づくプライマーを合成し、前記細胞のcDNAライブラリーを鋳型にしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによって目的のDNAを増幅し、それを適当なベクター(例えば、プラスミド、ファージ、コスミド等)に組み込んでクローニングすることができる。

蛍光蛋白質は、エシェリキア属(大腸菌など)、バチルス属(バチルス・ズブチリスなど)、ブレヴィバチルス属(バチルス・プレビスなど)、シュードモナス属などの原核細胞およびそれらの細胞に適するプラスミドベクターを用いる遺伝子組換え技術にて製造することができる。

大腸菌プラスミドとして、例えば、pBluescriptシリーズ、pUC18、p

UC19などのpUCシリーズ、pBR322などのpBRシリーズ、pQE-30、pQE-60などのpQEシリーズ、pMAL-C2、pMAL-p2などのpMALシリーズなどのプラスミドを非限定的に使用することができる。

ベクターには、プライマー、複製開始点、SD（シャイン・ダルガルノ）配列、終止コドン、ターミネーター、ポリA配列、マルチクロニングサイトなどを適宜含むことができる。マルチクロニングサイトには、複数の制限酵素認識サイトが含まれるため、目的のDNAを挿入するときに便利である。また、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えば、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、等）などの選択マーカールを含むことができる。さらにまた、必要に応じて、蛋白質の精製を容易にするために、Hisタグ（例えば、(His)₆~(His)₁₀）をコードするDNAを、目的の蛍光蛋白質をコードするDNAの5'末端または3'末端に結合し、融合蛋白質として発現させてもよい。

プロモーターの例は、限定されないが、lacプロモーター、trpプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、tacプロモーター、解糖系酵素プロモーターなどを包含する。

上記細胞へのベクターの導入（すなわち、形質転換）は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などの手法によって行うことができる。

細胞を培養し発現された組換え蛋白質は、細胞内または細胞外液（シグナルペプチド使用の場合）から、例えば、細胞壁破壊、硫酸アンモニウム、エタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、HPLCなどの方法により回収、精製することができる。

本発明では、細胞のオートファジー（その活性または存在）を測定するために、上記の蛍光蛋白質、またはそれをコードするDNAを含むベクター、を使用する。ここで使用する細胞は、特に真核細胞（酵母、糸状菌、担子菌などの菌類細胞、植物細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞などの動物細胞、等）であるため、ベクターは、それらの細胞に適するベクター（プラスミド、ファージ、コスミド、ウイルス、等）を使用する。

酵母に適するベクターの例には、pG-1、YEp13、YCP50、pGBT9、pGAD424、pACT2（Clontech社製）などが挙げられる。

植物細胞に適するベクターの例には、pBIベクター、T-DNAベクターなどが挙げられる。

動物細胞に適するベクターの例には、pRc/RSV、pEF6/Myc-His、pRc/CMV（Invitrogen等）、ウシパピローマウイルスプラスミドpBPV（アマシャム・ファルマシアバイオテク）、EBウイルスプラスミドpCEP4（Invitrogen）、バキュロウイルス等の昆虫ウイルス、などが挙げられる。

ベクターには、プライマー、エンハンサー、複製開始点、リボソーム結合配列、終止コドン、ターミネーター、ポリA配列、マルチクロニングサイトなどを適宜含むことができる。また、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えば、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、等）、栄養要求性相補遺伝子（例えばHIS3、LEU2、LYS2、TRP1、URA3、等）などの選択マーカールを含むことができる。さらにまた、必要に応じて、蛋白質の精製を容易にするために、Hisタグ（例えば、(His)₆~(His)₁₀）をコードするDNAを、目的の蛍光蛋白質をコードするDNAの5'末端または3'末端に結合し、融合蛋白質として発現させてもよい。

プロモーターの例には、限定されないが、ADH1プロモーター、ユビキチンプロモーター、カリフラワーモザイクウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、シミアンウイルス（SV40）の初期または後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス（MMTV）プロモーターなどが挙げられる。

上記細胞へのベクターの導入（すなわち、形質転換またはトランスフェクション）は、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクション法、エレクトロポレ

ーション法、マイクロインジェクション法、リポソーム法、アグロバクテリウム法、遺伝子銃、ウイルス感染法、スフェロプラスト法、プロトプラスト法、などの手法によって行うことができる。

あるいは、上記蛍光蛋白質を細胞内に直接導入する場合には、膜透過性ペプチドと結合させて、またはリポソームに封入して、細胞に導入することができる。

本発明で使用される蛍光蛋白質は、単独であってもよいし、あるいは、オートファジーに関わる、内在性蛋白質、ポリペプチドまたはペプチド、あるいはその他の機能性の蛋白質、ポリペプチドまたはペプチド、とのコンジュゲート（すなわち、結合体もしくは融合体）の形態で、細胞に導入することができる。

上記内在性蛋白質、ポリペプチドまたはペプチドには、疾患、栄養飢餓、細菌感染、免疫応答や抗原提示、細胞死、癌化などのオートファジーに関わるすべてのものが含まれる。このうち、疾患には、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患、癌、心不全、糖尿病などが非限定的に含まれ、内在性蛋白質は、これらの疾患の原因に関わる蛋白質（すなわち、疾患関連蛋白質）である。そのような疾患関連蛋白質には、例えば、アミロイド前駆体蛋白質、ポリグルタミン、アルファ - シヌクレイン（*α-synuclein*）、パーキン（*parkin*）などがあげられる。

上記のその他の機能性の蛋白質、ポリペプチドまたはペプチドには、例えば、ミトコンドリアや小胞体などの特定のオルガネラに蛋白質を選択的に移行させることができる移行シグナル配列（例えばミトコンドリア移行シグナルペプチド、葉緑体移行シグナルペプチドなど）、蛋白質を細胞内に導入可能にする膜透過性ペプチド（例えば、ポリアルギニン、*tat* ペプチドなど）、上記内在性蛋白質と特異的に結合することができる抗体（モノクローナル抗体、単鎖抗体、合成抗体、等）またはそのフラグメント、などが含まれる。

上記の蛋白質、ポリペプチドまたはペプチド類のアミノ酸および塩基配列は、文献やDNAデータベース、例えばDDBJ/EMBL/GenBank（NCBI（米国）など）から入手可能である。

コンジュゲートは、必要に応じてリンカーを介して蛋白質 - 蛋白質、蛋白質 - ポリペプチドまたは蛋白質 - ペプチド間を結合してもよい。リンカーは、2 ~ 50程度のアミノ酸残基からなるペプチドであり、細胞機能を障害しない、かつ、蛍光蛋白質と内在性蛋白質の特性、立体構造等に影響を与えないようなものであればいずれのペプチドも使用できる。

上記コンジュゲートをコードするDNAを合成し、上記のベクターに挿入し、細胞内に導入し、該細胞内で発現させる。このための手法は、上述したとおりである。

<オートファジーの測定>

本発明の方法では、上記のとおり、細胞内でのオートファジー活性の測定を、pHの変化に依存した単一の蛍光蛋白質プローブ試薬のスペクトル特性の変化を測定することによって行う。

本発明の方法によるオートファジーの測定においては、蛍光蛋白質は、細胞内で単独で使用することもできるし、コンジュゲートの形態で使用することもできる。例えば、つぎのような使用例を挙げることができる。

(a) オートファジーが細胞質の不特定の場所で起こることから、蛍光蛋白質を細胞質にそのまま発現させて、これがリソソームに運ばれたときの蛍光の変化からオートファジーの総量を測定する。

(b) 疾患に関与する蛋白質等の（オートファジーに関わる）目的の内在性蛋白質に注目してそのオートファジーを測定したい場合には、その蛋白質と蛍光蛋白質とを融合させて発現させて蛍光を測定する。

(c) 目的のオルガネラに注目してそのオートファジーを測定したい場合には、そのオルガネラ（例えば、ミトコンドリア）へ蛍光蛋白質もしくはコンジュゲートを選択的に局在させるための移行シグナル配列を融合させて発現させて蛍光を測定する。

従来、オートファジー活性の総量を測定可能にするのに十分良好なプローブ試薬がなかったために、あえてオートファジーに関与する蛋白質に標識しその動態からオートファジ

ーを測定する必要があったが、本発明で使われるような特長をもった蛍光蛋白質を使えば、その必要がなくなり、任意の蛋白質やオルガネラに注目してオートファジー活性が測定できるようになる。

さらにまた、細胞内での蛍光蛋白質の単独発現では、特定の疾患などの事象を直接対象とするのではなく、細胞としてのオートファジーの活性を測定することになるので、細胞の代謝活性の検査を行うことが可能になり、そこから疾患に対する罹りやすさとか、老化度の指標などを得ることができる。

本発明における、細胞は、特にすべての真核細胞が含まれる。すなわち、該細胞には、非限定的に、酵母などの菌類細胞、植物細胞、動物細胞（例えば、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、温血動物細胞、哺乳類細胞、ヒト細胞、等）などが包含される。

本発明の方法では、蛍光プローブ試薬として、リソソームや液胞内での分解酵素活性に耐性があり、pHが酸性から中性の、少なくともpH 4～8の環境で変性、失活せず、酸性域と中性域の環境に置かれたときに励起または蛍光スペクトルを大きく変化させる単一の蛍光蛋白質を使用する。そのスペクトルには、pHの変化に依存せずに蛍光強度がほぼ一定である等吸収点あるいは等蛍光点があり、その波長の前後でpHの変化に依存して蛍光強度を逆方向に変化させるという性質がある。このようなスペクトルの特長から、等吸収点あるいは等蛍光点をはさんだ適当な2波長で蛍光強度の測定を行うことで、レシオメトリック（比率測定）法による蛍光測定が可能となる。2波長で互いの蛍光強度が逆方向に変化するため、大きな蛍光強度のレシオ（比率）の変化を得ることができる。

上記のレシオメトリック法を行うことで、細胞内でのプローブ試薬の分布の違い、励起光の照明のむら、蛍光の退色などといったpHに依存しない蛍光強度の変化をキャンセルさせることができ、より定量的な計測が可能となる。また、単一の蛍光蛋白質で測定されるため、上述したような2つの蛍光蛋白質を使用したときに生じる問題がない。このような性質により、プローブ試薬のリソソームや液胞への移行、すなわちオートファジー活性を明確かつ精確に測定することができる。また、分解酵素に対して強い耐性をもつ蛍光蛋白質を使うことで、任意の時間内に起きたオートファジー活性の総量を測定することができる。

プローブ試薬は、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子、DNAまたはRNAを細胞に導入することで細胞に発現させて、あるいはプローブ試薬を直接細胞内に導入して、細胞内のオートファジーの測定に用いることができる。細胞へのプローブ試薬またはそれをコードする遺伝子、DNAもしくはRNAの導入には、上記のとおり、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポソーム法、膜透過性ペプチドとの結合、アグロバクテリウム法、ウイルス感染法、スフェロプラスト法、プロトプラスト法などの手法が利用可能である。プローブ試薬を一過性に細胞に発現させる手法に加え、その遺伝子またはDNAを細胞内に保持し、プローブ試薬を安定して発現させる細胞を作製して測定に用いてもよい。このためには、例えば、強力プロモーターの使用、自律複製型ベクターの使用などを例示できる。

蛍光プローブ試薬はある蛋白質と融合させて細胞に発現させてもよい。またあるオルガネラへ選択的に局在させるための移行シグナル配列を加えて発現させてもよい。これらの操作により、特定の蛋白質やオルガネラのオートファジーを測定することが可能となる。

蛍光の測定法として、プローブ試薬となる蛍光蛋白質がpHの変化に応じて励起スペクトルを大きく変化させるが、蛍光スペクトルの変化が小さいときは、2つの異なる励起波長で蛍光強度を測定しそのレシオ（比率）を求める、2波長励起1波長蛍光測定を行うことができる。これに対して、pHの変化に応じて蛍光スペクトルを大きく変化させるが、励起スペクトルの変化が小さいときは、2つの異なる蛍光波長で蛍光強度を測定しそのレシオを求める、1波長励起2波長蛍光測定を行うことができる。

オートファジーの測定は、実施例1に具体的に記載された手法に基づいて行うことができる。例えば、細胞を、培養ディッシュに播き、酵母、植物細胞または動物細胞用の慣用の培養培地で一晚培養する。蛍光蛋白質またはコンジュゲート（プローブ試薬）、あるいは

10

20

30

40

50

質（単量体）、mKeima、を使用してオートファジーを測定した例を以下に示す。

<mKeimaの励起スペクトル>

以下の手順でmKeimaを精製し、pHに依存したスペクトル特性を調べた。

mKeimaのcDNA（（注）cDNAクローニングは、Kogure, T. et al., (2006) Nat. Biotechnol. 24: 577-581に記載されている。）を挿入したpRSET_B (Invitrogen)をコンピテントセルJM109 (DE3)に導入した。このコンピテントセルをLAプレートに塗布し、37℃で一晩培養してできたコロニーを、100mlのLA培地に移し、18℃で72時間振とう培養した。この菌体を凍結融解して溶解、遠心して得たmKeimaを含む上清をニッケルカラム (Qiagen)に通して溶出した。この際に用いたイミダゾールを除くため、最後にSephadexTM G-25 (Pharmacia)でゲル濾過を行うことでmKeimaを精製した。

上記のように精製されたmKeimaをpH4-10の緩衝液で2μg/mlの濃度に希釈した。緩衝液の組成は、pH4.0-5.0は30mM KClおよび120mM sodium gluconateを含む50mM acetate緩衝液、pH6.0はNa₂HPO₄-NaH₂PO₄緩衝液、pH7.0-8.0はHEPES緩衝液、pH9.0-10.0はglycine緩衝液である。mKeimaの350-600nmの励起波長、620nmの蛍光波長での励起スペクトルを蛍光分光光度計 (SPEX Fluorolog-3, 堀場製作所、日本)で測定した。

得られた蛍光強度の最大値を1として標準化したスペクトルを図1に示した。測定された結果から、mKeimaの励起スペクトルは、pH4.0では586nm、7.0では440nmの励起のピークをもつこと、約500nmに等吸収点を持ち、この波長の前後でpHに依存して蛍光強度が互いに逆方向に変化することが示された。蛍光波長は620nmにピークをもち、これは4-10のpHでほぼ一定であった。pKaは6.5であり、リソソームと細胞質のpHの中間に位置することから、この蛍光蛋白質がオートファジーを計測するプローブ試薬として適した特性をもつことが示された。

<細胞内でのオートファジーの検出>

mKeimaのcDNA（上記）を挿入したプラスミドpEF6/Myc-His (Invitrogen)を、例示としてのMouse embryonic fibroblast (MEF)細胞にトランスフェクションし、オートファジーの検出、可視化を行った。

MEF細胞を35mmのガラスボトムディッシュに播き、5%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で一晩培養した。プラスミドDNA 1μgを100μlのOpti-MEM培地と混合した。また1.5μlのLipofectamineTM 2000 (Gibco BRL)を100μlのOpti-MEM培地と混合した。これらを室温で5分静置した後混合し、さらに15分静置した。これを細胞が培養されているディッシュに添加し、6時間培養後、新しい培地に交換し、さらに24時間培養して蛍光顕微鏡イメージングシステムによる解析を行った。イメージングには、カメラにiXon EM+ (Andor Technology)、対物レンズにUPlanSApo60x, oil (オリンパス、日本)、励起用フィルターに438nmバンドパス、半値幅24nm (Semrock)および550nmバンドパス、半値幅30nm (Omega)、蛍光用フィルターに610nmロングパス (Omega)、ダイクロイックミラーに590nm (Omega)を使用した。画像の取得、解析はMetaMorph (Universal Imaging Corporation)で行った。

結果を図2に示す。mKeimaのDNAを加えた培養24時間後の細胞で、550nm励起で強い蛍光を発する多数の小胞が観察された。550nm/438nmの蛍光強度のレシオを求めたところ、この小胞内で高い値が得られ、その領域のpHが酸性であることが示された。この小胞の分布を、リソソームを選択的に染色する蛍光色素、Alexa 488-dextranの蛍光の分布と比較したところ両者の局在が重なったことから、この小胞がリソソームであることが確認された。これらの結果は、MEF細胞内で生じた

オートファジーが、mKeimaのリソソームへの輸送、蓄積にともなう蛍光特性の変化として検出できたことを示している。

<細胞内でのマイトファジーの検出>

マイトファジー（ミトコンドリアのオートファジーを指す。）は、mKeimaを、例示としてのMEF細胞のミトコンドリアに選択的に発現させ、その蛍光を測定することで検出した。

MEF細胞を35mmのガラスボトムディッシュに播き、5%ウシ胎仔血清を含むDMEM培地で一晚培養した。2xCOX8mKeimaのcDNAを挿入したエクダイソン誘導型ベクターpIND(SP1)、エクダイソン受容体RXR発現ベクターpVgRXR（ともにInvitrogen）、およびマイトファジー促進因子Parkinを発現するベクター（EGFP-Parkin pEF6/Myc-His）のプラスミドDNAを各0.5μg（計1.5μg）を100μlのOpti-MEM培地と混合した。また1.5μlのLipofectamineTM 2000を100μlのOpti-MEM培地と混合した。これらを室温で5分静置した後混合し、さらに15分静置した。これを細胞が培養されているディッシュに添加し、6時間培養後、2μM Ponasterone A（Invitrogen）を含む新しい培地に交換し、2xCOX8mKeimaの発現を誘導した。さらに24時間培養後、細胞質に残る2xCOX8mKeimaの発現誘導を止め、これを完全にミトコンドリアにターゲティングさせるためにPonasterone Aを除いた培地に交換し、一晚培養して蛍光顕微鏡イメージングシステムによる解析を行った。マイトファジーは2μM FCCPと1μg/ml Oli-20
gomycin（ともにSigma）を添加することで誘導した。イメージングに使用したシステムは、上で述べたオートファジーの検出を行ったものと同じである。

結果を図3に示す。マイトファジー誘導後24時間後の細胞で、一部のミトコンドリアが550nm励起で強い蛍光を発する様子が観察された。550nm/438nmの蛍光強度のレシオを求めたところ、このミトコンドリアで高い値が得られ、その領域のpHが酸性であることが示された。この結果は、MEF細胞内で生じたマイトファジーが、mKeimaのリソソームへの輸送、蓄積にともなう蛍光特性の変化として検出できたことを示している。

【産業上の利用可能性】

【0007】

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患が、細胞の不十分なオートファジーによる異常な蛋白質の蓄積がもとで引き起こされていることがわかってきた。本発明はこれらの疾患に対する、病気の解明、治療法の開発、薬剤の探索など、医学、産業の分野で有用である。

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

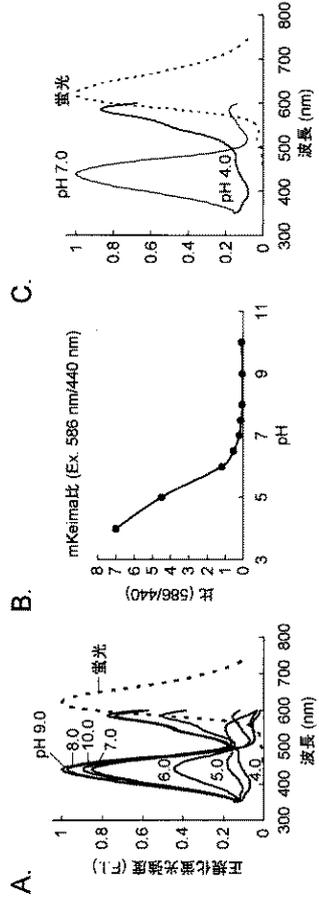
10

20

30

【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

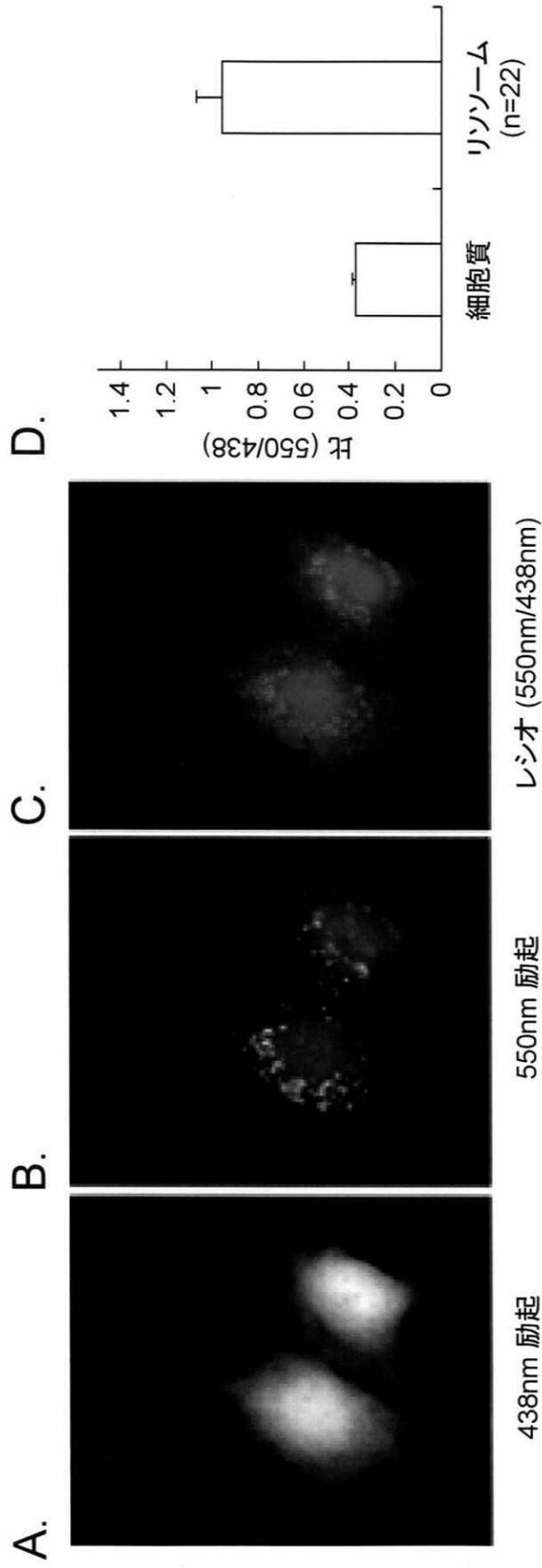


図 2

【 図 3 】

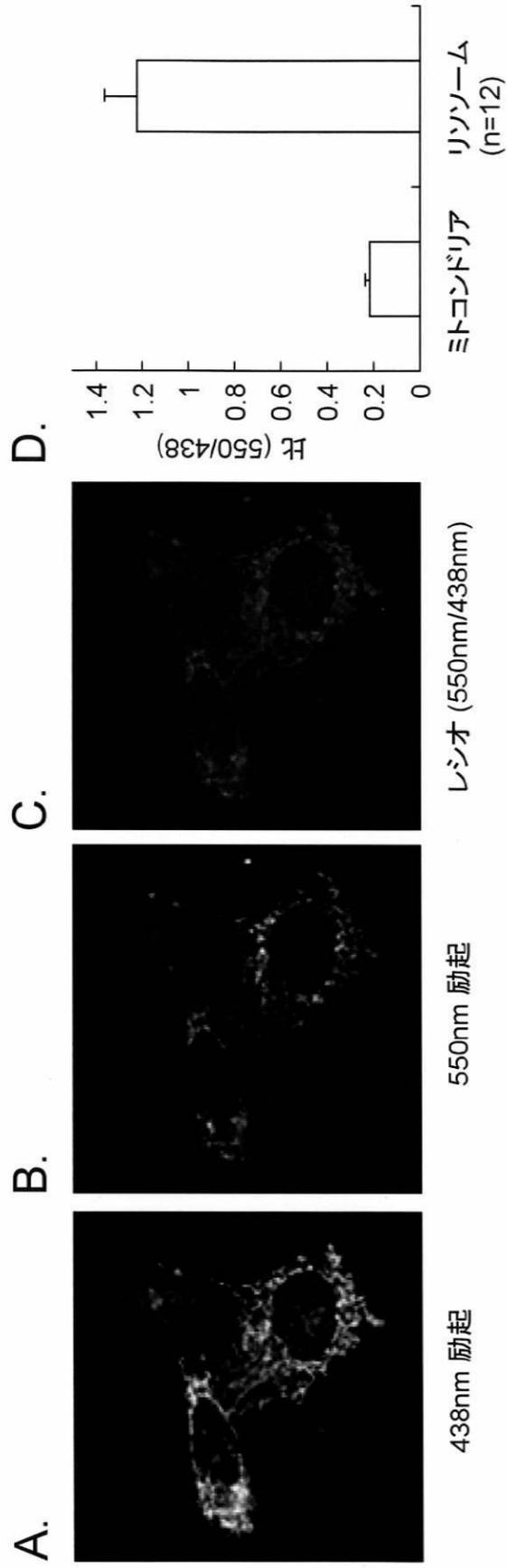


図 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 1 1 1 2 3 5 (W O , A 1)

Carlos J. Rosado et al. , A fluorescent pH biosensor for reporting vacuolar turnover of cytosol and organelles in yeast , Autophagy , 2 0 0 8 年 2 月 , 4(2) , 205 213

George T. Hanson et al. , Green Fluorescent Protein Variants as Ratiometric Dual Emission pH Sensors. 1. Structural Characterization and Preliminary Application , Biochemistry , 2 0 0 2 年 , 41(52) , 15477 15488

Lihong Zhang et al. , Small molecule regulators of autophagy identified by an image based high throughput screen , PNAS , 2 0 0 7 年 , vol. 104, no. 48 , 19023 19028

Sebastien Violot et al. , Reverse pH Dependence of Chromophore Protonation Explains the Large Stokes Shift of the Red Fluorescent Protein mKeima , J. AM. CHEM. SOC. , 2 0 0 9 年 7 月 1 0 日 , Vol. 131 , 10356 10357

Hiroyuki Katayama et al. , GFP like Proteins Stably Accumulate in Lysosomes , Cell Structure and Function , 2 0 0 8 年 , Vol. 33, No. 1 , 1 12

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 2 1 / 6 2 - 2 1 / 8 3

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)