

明 細 書

発明の名称：タンパク質間相互作用の判定方法

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質間相互作用の判定方法、並びに当該方法に用いられるためのベクター及びキットに関する。

背景技術

[0002] タンパク質間相互作用の判定方法は、主に2つのグループに分けることができる。一つ目は、生細胞から分離された状態のタンパク質を用いることを特徴とする方法である。例えば、表面プラズモン共鳴法、タンパク質質量分析法、異方性測定法 (anisotropy measurements) が挙げられる。しかしながら、これらの方法では、実際の細胞内環境と同様の環境で相互作用を判定することは困難である。

[0003] そこで、二つ目の方法として、生細胞を用いてタンパク質間相互作用の判定を行う方法も開発されている。代表的な方法としては、レポーターの転写活性を検出する酵母ツーハイブリッドシステムやその変法が挙げられる。その他、 β ガラクトシダーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 等の酵素の再構成を利用する方法も開発されている。

[0004] しかしながら、これら方法には、タンパク質間相互作用が発生した位置 (タンパク質間相互作用の位置情報) や、タンパク質間相互作用が発生するまでの時間、該相互作用が消失するまでの時間及び該相互作用の持続時間等 (タンパク質間相互作用の時間情報) を判定することができないという問題がある。

[0005] また、生細胞を用いてタンパク質間相互作用の判定を行う方法として、蛍光タンパク質の再構成を利用する方法もあるが、一度再構成した蛍光タンパク質は解離しないため、タンパク質間相互作用が消失するまでの時間及び該相互作用の持続時間等を判定することができないという問題がある。さらには、タンパク質間相互作用が発生してから、蛍光を発するまでに時間を要す

るため、タンパク質間相互作用が発生するまでの時間等を判定することができないという問題もある。

[0006] 一方、生細胞内でタンパク質間相互作用の判定を行う方法として、分子間の距離に依存したエネルギー転移を検出する蛍光共鳴エネルギー移動法（FRET）が開発されている。この方法は、タンパク質間相互作用が発生した位置情報と時間情報が得られるという利点を有するものの、この方法に用いられるドナー蛍光タンパク質とアクセプター蛍光タンパク質との相互の位置関係が、タンパク質間相互作用の判定において重要であるため、これら蛍光タンパク質と検出の対象となるタンパク質とを繋ぐリンカー（スペーサー）の最適化を検討する工程が煩雑であり、系の構築が困難であった。さらに、アクセプター蛍光タンパク質を励起してしまうcross excitationや、アクセプター蛍光タンパク質の蛍光を検出するフィルター（吸収フィルター）セットにドナー蛍光タンパク質の蛍光が漏れ込むbleed throughが発生してしまうため、結果の解析が困難であった。また、2色の蛍光タンパク質（ドナー蛍光タンパク質及びアクセプター蛍光タンパク質）を使用するため、検出対象となるタンパク質以外の情報を取得する目的で利用できる蛍光タンパク質が限定されるという問題もあった。

[0007] 近年、Tobias Meyerらによって、細胞内局在化を利用したタンパク質間相互作用の判定方法が報告された（特許文献1）。この方法においては、相互作用を判定するタンパク質の一方に細胞内の特定の部位に特異的に結合するタンパク質を融合し、相互作用を判定するタンパク質の他方に蛍光タンパク質等を融合する。そして、これら融合タンパク質を細胞内で発現させ、細胞内の特定の部位における蛍光タンパク質等のシグナルを指標としてタンパク質間相互作用を判定する。

[0008] また、Nibertらによって、相互作用を判定するタンパク質の一方にウィルス封入体を形成するタンパク質を融合した融合タンパク質を用い、相互作用を判定するタンパク質の他方がウィルス封入体に集積することを指標として、タンパク質間相互作用を判定する方法が報告されている（特許文献

2)。

[0009] しかしながら、これら細胞内局在化を利用したタンパク質間相互作用の判定方法は、相互作用を判定するタンパク質の一方を強制的（人工的）に細胞内の特定の部位に移行させて拘束するため、本来タンパク質間相互作用が生じる部位、すなわちタンパク質間相互作用に固有な細胞内環境下での判定ができず、タンパク質間相互作用の位置情報が得られない等の問題点がある。また、天然の状態で、細胞内局在化される部位と同じ部位に局在するタンパク質同士の相互作用を判定することもできない。

[0010] この問題点に対しては、Sara Peterson Bjornらによって、タンパク質が本来機能する細胞内環境下にて相互作用させた上で、薬剤等の刺激を該細胞に与えることにより、相互作用するタンパク質からなる凝集体の形成を誘導し、該凝集体の形成をもって、タンパク質間相互作用を判定する方法（redistribution-trap method）が報告されている（特許文献3）。

[0011] しかしながら、この方法は任意の時点において凝集体の形成を誘導するための刺激を細胞に与える必要があり、刺激を与えた後に引き続き相互作用の有無を判定するためには、刺激を与えるために用いた薬剤等を除く必要がある。従って、かかる方法においては、タンパク質間相互作用が発生した時間情報を得ることができず、また、任意の期間に任意の場所にて変化（発生、消失、再発生等）するタンパク質間相互作用は判定できない等の問題点がある。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：国際公開第2000/017221号
特許文献2：国際公開第2006/099486号
特許文献3：米国特許第7282347号明細書
特許文献4：国際公開第2013/084950号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、細胞内におけるタンパク質間相互作用を、タンパク質間相互作用に固有な細胞内環境下において判定することができ、かつ、タンパク質間相互作用の位置情報及び時間情報を取得することができる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、2つのタンパク質（第1のタンパク質及び第2のタンパク質）の相互作用の判定において、第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第2の融合タンパク質との利用を構想した（図1及び2 参照）。より具体的には、これら2つの融合タンパク質を細胞内に発現させた場合において、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出される系を考えた。

[0015] そして、実際にこの系を構築し、これら融合タンパク質を細胞内において発現させたところ、該細胞内において検出された蛍光輝点を指標に、任意のタンパク質間相互作用を判定できることが明らかになった。また、この系によって、タンパク質間相互作用が発生した位置（タンパク質間相互作用の位置情報）や、タンパク質間相互作用が発生するまでの時間及び該相互作用が消失するまでの時間等（タンパク質間相互作用の時間情報）も判定できることも明らかになった。さらに、この方法と、本発明者らが従前発明した、蛍光輝点を指標としてタンパク質間相互作用を判定する別の方法（特許文献4）とを比較した結果、本発明の方法は、特許文献4に記載の方法よりも、少なくとも第1のタンパク質及び第2のタンパク質が同一分子であり、その分子同士が2量体以上を形成する、ホモ多量体形成の判定効率の上では優れて

いることも明らかになった。

[0016] また、図1及び2に示す第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出する系の有効性が実証されたことを受け、タンパク質間相互作用を判定するための別の検出系を構想した（図3～6 参照）。すなわち、前記第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質とを各々分割して細胞内に発現させ又は細胞に導入し、当該細胞内における各融合タンパク質の再構成を介した、タンパク質間相互作用を判定するための検出系を構想した。

[0017] より具体的には、図3に示す通り、第1のタンパク質及び第2のタンパク質の相互作用の判定において、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第3の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第4の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第5の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、多量化能を有するタンパク質どうしが会合することにより、第3の融合タンパク質及び第5の融合タンパク質が結合し、また第4の融合タンパク質及び第5の融合タンパク質が結合し、図1及び2に示す第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質が該細胞内において発現することが想定される。そして、かかる想定通りであれば、図1及び2に示す第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出する系同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることが、図3に示す第3の融合タンパク質と第4の融合タンパク質と第5の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出する系においても期待できる。

[0018] また、図4に示す通り、アフィニティタグ及び第1のタンパク質を含む第1の標識化タンパク質と、アフィニティタグ及び第2のタンパク質を含む第

2の標識化タンパク質と、前記アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナーが結合しており、かつ多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む、第6の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、前記アフィニティタグと前記結合パートナーとが結合することにより、第1の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質とが結合し、また第2の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質とが結合することにより、図2に示す第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質複合体が該細胞内において発現することが想定される。すなわち、蛍光タンパク質、多量化能を有するタンパク質及び結合パートナーと、アフィニティタグ及び第1のタンパク質とからなる複合体が、図2に示す第1の融合タンパク質のように機能し、また、蛍光タンパク質、多量化能を有するタンパク質及び結合パートナーと、アフィニティタグ及び第2のタンパク質とからなる複合体が、図2に示す第2の融合タンパク質のように機能することが想定される。そして、これらタンパク質複合体の発現に伴い、図2に示す系同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることになる。

[0019] さらに、図5に示す通り、蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第7の融合タンパク質と、蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第8の融合タンパク質と、第1の部分ペプチドに結合することによって蛍光タンパク質が再構成し得る第2の部分ペプチド、及び多量化能を有するタンパク質を含む第9の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、当該再構成によって蛍光タンパク質が該細胞内において発現することになる。そして、図2に示す系同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導さ

れ、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることになる。

[0020] さらにまた、図6に示す通り、多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第10の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第11の融合タンパク質と、第3の部分ペプチドに結合することによって多量化能を有するタンパク質が再構成し得る第4の部分ペプチド、及び蛍光タンパク質を含む第12の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、当該再構成によって多量化能を有するタンパク質が該細胞内において発現することになる。そして、図2に示す系同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることになる。

[0021] そこで、実際に図3に示す検出系も構築し、上記融合タンパク質を細胞内において発現させたところ、第3の融合タンパク質と第4の融合タンパク質と第5の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出する系によっても、該細胞内において検出された蛍光輝点を指標に、任意のタンパク質間相互作用を判定できることが明らかになった。また、図4に示す検出系も構築し、上記融合タンパク質を細胞内において発現させたところ、第1の標識化タンパク質と、第2の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する系によっても、該細胞内において検出された蛍光輝点を指標に、任意のタンパク質間相互作用を判定できることが明らかになった。

[0022] さらに、本発明者らは、図1等にした系に基づき、3以上のタンパク質間の相互作用を検出するための態様として、図7に示す系を構想した。すなわち、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第13の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む

第14の融合タンパク質と、第3のタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第15の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質が相互作用すれば、図1等にした系同様に、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることになる。

[0023] そこで、実際に図7に示す検出系も構築し、前記融合タンパク質を細胞内において発現させたところ、第13の融合タンパク質と、第14の融合タンパク質と、第15の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出する系によっても、該細胞内において検出された蛍光輝点を指標に、任意のタンパク質間相互作用を判定できることが明らかになった。

[0024] さらに、本発明者らは、上記結果に基づき、タンパク質間相互作用を判定するための系として、図8に示す系を構想した。すなわち、第1のタンパク質、第1の多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第16の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び第2の多量化能を有するタンパク質を含む第17の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入し、第1の多量化能を有するタンパク質と第2の多量化能を有するタンパク質とは異なるタンパク質である場合、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用し、さらに多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導されることにより、融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出される系の構築を考えた。

[0025] そして、実際に図8に示す検出系も構築し、前記融合タンパク質を細胞内において発現させたところ、第16の融合タンパク質と第17の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出する系によっても、該細胞内において検出された蛍光輝点を指標に、任

意のタンパク質間相互作用を判定できることが明らかになった。

[0026] したがって、本発明は、タンパク質間相互作用の判定方法、並びに当該方法に用いられるためのベクター及びキットに関し、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

<1> 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第2の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

<2> 前記第2の融合タンパク質が、さらに蛍光タンパク質を含む融合タンパク質である、<1>に記載の方法。

<3> 前記蛍光タンパク質が単量体蛍光タンパク質である、<1>又は<2>に記載の方法。

<4> 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第3の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第4の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第5の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第3の融合タンパク質と、第4の融合タンパク質と、第5の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

<5> 前記蛍光タンパク質が単量体蛍光タンパク質である、<4>に記載の方法。

<6> 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター。

<7> 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、<1>～<3>のうちのいずれかに記載の方法に用いられるためのキット

(a) <6>に記載のベクター

(b) 第1の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第2の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第1の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(e) 第2の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第1の融合タンパク質をコードするベクターと第2の融合タンパク質をコードするベクターとを保持する形質転換細胞

(g) 第1の融合タンパク質

(h) 第2の融合タンパク質。

<8> 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、<4>又は<5>に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが

挿入されることにより、前記多量化能を有するタンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第3の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第4の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第5の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第5の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第3の融合タンパク質

(g) 第4の融合タンパク質

(h) 第5の融合タンパク質。

<9> 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) アフィニティタグ及び第1のタンパク質を含む第1の標識化タンパク質と、アフィニティタグ及び第2のタンパク質を含む第2の標識化タンパク質と、前記アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナーが結合しており、かつ多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む、第6の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第1の標識化タンパク質と、第2の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

<10> 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、<9>に記載の方法に用いられるためのキット

(a) アフィニティタグをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記アフィニティタグを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

- (b) 第1の標識化タンパク質をコードするベクター
- (c) 第2の標識化タンパク質をコードするベクター
- (d) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質を、コードするベクター
- (e) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質をコードするベクターを、保持する形質転換細胞
- (f) 第1の標識化タンパク質
- (g) 第2の標識化タンパク質
- (h) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質。

<11> 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第7の融合タンパク質と、蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第8の融合タンパク質と、第1の部分ペプチドに結合することによって蛍光タンパク質が再構成し得る第2の部分ペプチド、及び多量化能を有するタンパク質を含む第9の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第7の融合タンパク質と、第8の融合タンパク質と、第9の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

<12> 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、<11>に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 第1の部分ペプチドをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第1の部分ペプチドを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

- (b) 第7の融合タンパク質をコードするベクター
- (c) 第8の融合タンパク質をコードするベクター
- (d) 第9の融合タンパク質をコードするベクター
- (e) 第9の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞
- (f) 第7の融合タンパク質
- (g) 第8の融合タンパク質
- (h) 第9の融合タンパク質。

<13> 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第10の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第11の融合タンパク質と、第3の部分ペプチドに結合することによって多量化能を有するタンパク質が再構成し得る第4の部分ペプチド、及び蛍光タンパク質を含む第12の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第10の融合タンパク質と、第11の融合タンパク質と、第12の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

<14> 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、<13>に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 第3の部分ペプチドをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第3の部分ペプチドを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第10の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第11の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第12の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第12の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第10の融合タンパク質

(g) 第11の融合タンパク質

(h) 第12の融合タンパク質。

<15> 第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第13の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第14の融合タンパク質と、第3のタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第15の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における第13の融合タンパク質と第14の融合タンパク質と第15の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質との相互作用を判定する工程。

<16> 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、<15>に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、多量化能を有するタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 蛍光タンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、蛍光タンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができる

ベクター

- (c) 第13の融合タンパク質をコードするベクター
- (d) 第14の融合タンパク質をコードするベクター
- (e) 第15の融合タンパク質をコードするベクター
- (f) 第13の融合タンパク質
- (g) 第14の融合タンパク質
- (h) 第15の融合タンパク質。

<17> 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定するための方法であって、第1の多量化能を有するタンパク質と第2の多量化能を有するタンパク質とは異なるタンパク質であり、かつ下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 第1のタンパク質、第1の多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第16の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び第2の多量化能を有するタンパク質を含む第17の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における第16の融合タンパク質と第17の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

<18> 下記(a)～(f)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、<17>に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 第1の多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第1の多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第2の多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニン

グ部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第2の多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(c) 第16の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第17の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第16の融合タンパク質

(f) 第17の融合タンパク質。

発明の効果

[0027] 本発明によれば、タンパク質間相互作用をその固有な細胞内環境下において判定することができ、また当該判定の結果に基づき、タンパク質間相互作用の位置情報及び時間情報を取得することが可能となる。特に、本発明によれば、ホモ多量体形成をその固有な細胞内環境下において効率良く判定することができ、また当該判定の結果に基づき、ホモ多量体形成の位置情報及び時間情報も効率良く取得することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]本発明のタンパク質間相互作用の第1の判定方法の一態様を示す概念図である。すなわち、第1のタンパク質（図中、A）、多量化能を有するタンパク質（図中、C）及び蛍光タンパク質（図中、D）を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質（図中、B）及び多量化能を有するタンパク質（図中、C）を含む第2の融合タンパク質とを細胞内に発現させた又は細胞内に導入した場合に、該細胞内における第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図2]本発明のタンパク質間相互作用の第1の判定方法の一態様を示す概念図である。すなわち、第1のタンパク質（図中、A）、多量化能を有するタンパク質（図中、C）及び蛍光タンパク質（図中、D）を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質（図中、B）及び多量化能を有するタンパク質

(図中、C)を含み、さらに蛍光タンパク質(図中、D)を含む第2の融合タンパク質とを細胞内に発現させた又は細胞内に導入した場合に、該細胞内における第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図3]本発明のタンパク質間相互作用の第2の判定方法の一態様を示す概念図である。すなわち、第1のタンパク質(図中、A)及び多量化能を有するタンパク質(図中、C)を含む第3の融合タンパク質と、第2のタンパク質(図中、B)及び多量化能を有するタンパク質(図中、C)を含む第4の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質(図中、C)及び蛍光タンパク質(図中、D)を含む第5の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合に、該細胞内において、第3の融合タンパク質と第4の融合タンパク質と第5の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図4]本発明のタンパク質間相互作用の第3の判定方法の一態様を示す概念図である。すなわち、第1のタンパク質(図中、A)及びアフィニティタグ(図中、E1)を含む第1の標識化タンパク質と、第2のタンパク質(図中、B)及びアフィニティタグ(図中、E1)を含む第2の標識化タンパク質と、前記アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナー(図中、E2)が結合しており、かつ多量化能を有するタンパク質(図中、C)及び蛍光タンパク質(図中、D)を含む、第6の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合に、該細胞内において、第1の標識化タンパク質と第2の標識化タンパク質と前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図5]本発明のタンパク質間相互作用の第4の判定方法の一態様を示す概念図

である。すなわち、第1のタンパク質（図中、A）及び蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド（図中、d1）を含む第7の融合タンパク質と、第2のタンパク質（図中、B）及び蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド（図中、d1）を含む第8の融合タンパク質と、第1の部分ペプチドに結合することによって蛍光タンパク質が再構成し得る第2の部分ペプチド（図中、d2）、及び多量化能を有するタンパク質（図中、C）を含む第9の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合に、該細胞内において、第7の融合タンパク質と、第8の融合タンパク質と、第9の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図6]本発明のタンパク質間相互作用の第5の判定方法の一態様を示す概念図である。すなわち、第1のタンパク質（図中、A）及び多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド（図中、c1）を含む第10の融合タンパク質と、第2のタンパク質（図中、B）及び多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド（図中、c1）を含む第11の融合タンパク質と、第3の部分ペプチドに結合することによって多量化能を有するタンパク質が再構成し得る第4の部分ペプチド（図中、c2）、及び蛍光タンパク質（図中、D）を含む第12の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合に、該細胞内において、第10の融合タンパク質と、第11の融合タンパク質と、第12の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図7]本発明のタンパク質間相互作用の第6の判定方法の一態様を示す概念図である。すなわち、第1のタンパク質（図中、A）及び多量化能を有するタンパク質（図中、C）を含む第13の融合タンパク質と、第2のタンパク質（図中、B）及び多量化能を有するタンパク質（図中、C）を含む第14の融合タンパク質と、第3のタンパク質（図中、F）及び蛍光タンパク質（図

中、D)を含む第15の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合に、該細胞内において、第13の融合タンパク質と、第14の融合タンパク質と、第15の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図8]本発明のタンパク質間相互作用の第7の判定方法の一態様を示す概念図である。すなわち、第1の多量化能を有するタンパク質と第2の多量化能を有するタンパク質とは異なるタンパク質であって、第1のタンパク質(図中、A)、第1の多量化能を有するタンパク質(図中、C)及び蛍光タンパク質(図中、D)を含む第16の融合タンパク質と、第2のタンパク質(図中、B)及び第2の多量化能を有するタンパク質(図中、G)を含む第17の融合タンパク質とを細胞内に発現させた又は細胞内に導入した場合に、該細胞内における第16の融合タンパク質と第17の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定することができることを示す図である。

[図9]多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインと、蛍光タンパク質としてmAG1とを、解析対象であるFKBP12変異体に融合してなる、本発明にかかる融合タンパク質(PB1-mAG1-FKBP12変異体)を細胞内に発現させ、薬剤B/Bホモダイメリザーを該細胞に添加することにより、該薬剤添加に応じたFKBP12変異体のホモ2量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左から順に、薬剤添加前の細胞、薬剤を添加してから38分後の細胞、薬剤を添加してから76分後の細胞を分析した結果を示す。また、図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図10]国際公開第2013/084950号に記載の方法により、薬剤添加に応じたFKBP12変異体のホモ2量体形成を示す蛍光輝点を検出した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左から順に、薬剤添加前の細胞、薬剤を添加してから58分後の細胞、薬剤を添加してから66分後の細胞を分析し

た結果を示す。また、図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図11] PB1-mAG1-FKBP12変異体を恒常的に発現する細胞に、B/Bホモダイメリザーを添加することにより形成されたFKBP12変異体のホモ2量体形成が、B/Bウオッシュアウトリガンドを添加することにより解消（消失）されることを、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左から順に、薬剤添加前の細胞、B/Bホモダイメリザーを添加してから90分後の細胞、B/Bホモダイメリザーを洗浄し、B/Bウオッシュアウトリガンドを添加してから90分後の細胞を分析した結果を示す。また、図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図12] PB1-mAG1-FKBP12変異体を恒常的に発現する細胞に、B/Bホモダイメリザーを添加することにより形成されたFKBP12変異体のホモ2量体形成が、B/Bウオッシュアウトリガンドを添加することにより解消されることを、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示すグラフである。図中、Aは、細胞にB/Bホモダイメリザーを添加してからの経過時間を示す。Bは、細胞に添加したB/Bホモダイメリザーを洗浄している時間を示す。Cは、該洗浄後、細胞にB/Bウオッシュアウトリガンドを添加してからの経過時間を示す。

[図13]多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインと、蛍光タンパク質としてmAG1とを、解析対象であるp53に融合してなる、本発明にかかる融合タンパク質（mAG1-PB1-p53又はp53-mAG1-PB1）を細胞内に発現させ、p53のホモ多量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「mAG1-PB1-p53」はp53のN末に本発明にかかるタンパク質タグ（多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む融合タンパク質）が融合してなるタンパク質に由来する蛍光シグナルを検出した結果を示し、その右側のパネルは、同細胞をヘキスト33342で処理することにより、核を検出した結果を示す。また、「p53-m

「mAG1-PB1」はp53のC末に本発明にかかるタンパク質タグが融合してなるタンパク質に由来する蛍光シグナルを検出した結果を示し、その右側のパネルは、同細胞をヘキスト33342で処理することにより、核を検出した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図14] 蛍光タンパク質としてmAG1のみを解析対象であるp53に融合してなる、融合タンパク質（mAG1-p53又はp53-mAG1）を細胞内に発現させ、p53のホモ多量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「mAG1-p53」はp53のN末に蛍光タンパク質が融合してなるタンパク質に由来する蛍光シグナルを検出した結果を示し、その右側のパネルは、同細胞をヘキスト33342で処理することにより、核を検出した結果を示す。また、「p53-mAG1」はp53のC末に蛍光タンパク質が融合してなるタンパク質に由来する蛍光シグナルを検出した結果を示し、その右側のパネルは、同細胞をヘキスト33342で処理することにより、核を検出した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図15] p62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるp53の部分ペプチドのN末に融合してなるタンパク質（PB1-p53(70)）と、p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を解析対象であるMDM2のN末に融合させた（PB1-mAG1-MDM2）とを細胞内に発現させ、p53(70)とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「Nutlin-3(-)」は、前記タンパク質間相互作用の阻害剤であるヌトリン-3を添加する前の細胞を観察した結果を示し、「Nutlin-3(+), 30min」は、ヌトリン-3を添加してから30分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図16] mAG1及びp62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるp53の部分ペプチドのC末に融合してなるタンパク質（p53(70)-mAG1-PB1）と、p62タンパク質のPB1ドメインを解析対象である

MDM2のN末に融合させた（PB1-MDM2）とを細胞内に発現させ、p53（70）とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「Nutlin-3（-）」は、前記タンパク質間相互作用の阻害剤であるヌトリン-3を添加する前の細胞を観察した結果を示し、「Nutlin-3（+）、30min」は、ヌトリン-3を添加してから30分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図17] p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を解析対象であるFKBP12のN末に融合してなるタンパク質（PB1-mAG1-FKBP12）と、p62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるmTORタンパク質のFRBドメインのC末に融合してなるタンパク質（mTOR（FRB domain）-PB1）とを細胞内に発現させ、FKBP12とmTOR（FRB domain）とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「Rapamycin（-）」は、前記タンパク質間相互作用の誘導剤であるラパマイシンを添加する前の細胞を観察した結果を示し、「Rapamycin（+）、30min」は、ラパマイシンを添加してから30分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは100 μ mを示す。

[図18] mAG1及びp62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるp53の部分ペプチドのN末に融合してなるタンパク質（p53（70）-mAG1-PB1）と、p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を解析対象であるMDM2のN末に融合させた（PB1-mAG1-MDM2）とを細胞内に発現させ、p53（70）とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「Nutlin-3（-）」は、前記タンパク質間相互作用の阻害剤であるヌトリン-3を添加する前の細胞を観察した結果を示し、「Nutlin-3（+）、30min」は、ヌトリン-3を添

加してから30分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは20 μm を示す。

[図19] p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を解析対象であるp53の部分ペプチドのC末に融合してなるタンパク質(p53(70)-PB1-mAG1)と、p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を解析対象であるMDM2のN末に融合させた(PB1-mAG1-MDM2)とを細胞内に発現させ、p53(70)とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「Nutlin-3(-)」は、前記タンパク質間相互作用の阻害剤であるヌトリン-3を添加する前の細胞を観察した結果を示し、「Nutlin-3(+), 30min」は、ヌトリン-3を添加してから30分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは20 μm を示す。

[図20] mAG1及びp62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるmTORタンパク質のFRBドメインのC末に融合してなるタンパク質(mTOR(FRB domain)-mAG1-PB1)と、p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を解析対象であるFKBP12のN末に融合してなるタンパク質(PB1-mAG1-FKBP12)とを細胞内に発現させ、FKBP12とmTOR(FRB domain)とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「Rapamycin(-)」は、前記タンパク質間相互作用の誘導剤であるラパマイシンを添加する前の細胞を観察した結果を示し、「Rapamycin(+), 30min」は、ラパマイシンを添加してから30分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは100 μm を示す。

[図21] 図20に示した顕微鏡写真の一部を拡大した写真である。図中のスケールバーは20 μm を示す。

[図22] p62タンパク質のPB1ドメインと、蛍光タンパク質としてDG1

とを、解析対象であるFKBP12変異体のN末に融合してなるタンパク質（PB1-DG1-FKBP12変異体、すなわちPB1-DG1-FKBP12（F36V））を細胞内に発現させ、薬剤B/Bホモダイメリザーを該細胞に添加することにより、該薬剤添加に応じたFKBP12変異体のホモ2量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左から順に、薬剤添加前の細胞、薬剤を添加してから1時間後の細胞、薬剤を添加してから2時間後の細胞、薬剤を添加してから3時間後の細胞を分析した結果を示す。また、図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図23] p62タンパク質のPB1ドメインと、蛍光タンパク質としてmCherryとを、解析対象であるFKBP12変異体のN末に融合してなるタンパク質（PB1-mCherry-FKBP12変異体、すなわちPB1-mCherry-FKBP12（F36V））を細胞内に発現させ、薬剤B/Bホモダイメリザーを該細胞に添加することにより、該薬剤添加に応じたFKBP12変異体のホモ2量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左から順に、薬剤添加前の細胞、薬剤を添加してから1時間後の細胞、薬剤を添加してから2時間後の細胞、薬剤を添加してから3時間後の細胞を分析した結果を示す。また、図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図24] 多量化能を有するタンパク質としてTankyrase1タンパク質のSAMドメインと、mAG1とを、解析対象であるFKBP12変異体のN末に融合してなるタンパク質（Tankyrase-mAG1-FKBP12変異体、Tankyrase-mAG1-FKBP12（F36V））を細胞内に発現させ、薬剤B/Bホモダイメリザーを該細胞に添加することにより、該薬剤添加に応じたFKBP12変異体のホモ2量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左から順に、薬剤添加前の細胞、薬剤を添加してから3時間後の細胞を分析した結果を示す。また、図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図25]多量化能を有するタンパク質として、Tankyrase1タンパク質のSAMドメイン、PKC δ タンパク質のPB1ドメイン、TELタンパク質のSAMドメイン又はDGK δ タンパク質のSAMドメインとを、p53のN末に融合してなるタンパク質（Tankyrase-mAG1-p53、PKC δ -mAG1-p53、TEL-mAG1-p53又はDGK δ -mAG1-p53）を細胞内に発現させ、p53のホモ多量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図26]mAG1及びp62タンパク質のPB1ドメインを、ERK2のC末に融合してなるタンパク質（ERK2-mAG1-PB1）を細胞内に発現させ、EGFを該細胞に添加することにより、該添加に応じたERK2のホモ2量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「EGF添加前」は、EGFを添加する前の細胞を観察した結果を示し、「EGF（50 ng/ml）、8 min」は、EGFを添加してから8分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図27]p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を、ERK2のC末に融合してなるタンパク質（ERK2-PB1-mAG1）を恒常的に発現させた細胞を、EGFを添加してから8分後に観察し、該添加に応じたERK2のホモ2量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図28]p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を、STAT3のN末に融合してなるタンパク質（PB1-mAG1-STAT3）を細胞内に発現させ、IL-6を該細胞に添加することにより、該添加に応じたSTAT3のホモ2量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中、「before」は、IL-6を添加する前の細胞を観察した結果を示し、「IL6（100 ng/ml）、50 min」は、IL-6を添加してから50分経過した細胞を観察

した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図29] p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1を含む融合タンパク質(PB1-mAG1)を恒常的に発現させている細胞において、p53-PB1及びPB1-MDM2、PB1-MDM2及びPB1、又は、p53-PB1及びPB1を一過的に発現させ、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、「p53-PB1」は、p53タンパク質の一部のC末にp62タンパク質のPB1ドメインが融合してなるタンパク質を示し、「PB1-MDM2」は、MDM2のN末にp62タンパク質のPB1ドメインが融合してなるタンパク質を示し、「PB1」はp62タンパク質のPB1ドメインを示す。また、図中のスケールバーは20 μ mを示し、矢印は検出された蛍光輝点を示す。

[図30] PB1-mAG1を恒常的に発現し、さらにp53(70)-PB1及びPB1-MDM2を一過的に発現させている細胞において、ヌトリン3添加によるp53とMDM2とのタンパク質間相互作用の解消を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左側の写真がヌトリン3添加前の細胞を分析した結果を示し、右側の写真がヌトリン3添加後の細胞を分析した結果を示す。また、図中のスケールバーは10 μ mを示す。

[図31] p62タンパク質のPB1ドメインをmTOR(FRB domain)のN末又はC末に融合してなるタンパク質(PB1-mTOR(FRB domain)又はmTOR(FRB domain)-PB1)と、p62タンパク質のPB1ドメインをFKBP12のN末又はC末に融合してなるタンパク質(PB1-FKBP12又はFKBP12-PB1)と、mAG1をN末に融合させたp62タンパク質のPB1ドメイン(mAG1-PB1)とを、下記(A)～(D)の組み合わせにて、細胞において発現させ、FKBP12とmTOR(FRB domain)とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す

顕微鏡写真である。なお、図中、「ラパマイシン添加前」は、前記タンパク質間相互作用の誘導剤であるラパマイシンを添加する前の細胞を観察した結果を示し、「ラパマイシン (500 nM)、室温 60 min」は、ラパマイシンを添加してから 60 分経過した細胞を観察した結果を示す。図中のスケールバーは 20 μ m を示す。(A) PB1-mTOR (FRB domain)、PB1-FKBP12 及び mAG1-PB1 (B) PB1-mTOR (FRB domain)、FKBP12-PB1 及び mAG1-PB1 (C) mTOR (FRB domain)-PB1、PB1-FKBP12 及び mAG1-PB1 (D) mTOR (FRB domain)-PB1、FKBP12-PB1 及び mAG1-PB1。

[図32]アフィニティタグとして mTOR タンパク質の FRB ドメインを、解析対象である CD80 の N 末に融合してなるタンパク質 (CD80-FRB) と、アフィニティタグの結合パートナーとして FKBP12、多量化能を有するタンパク質として p62 タンパク質の PB1 ドメイン及び蛍光タンパク質として mAG1 を融合してなるタンパク質 (PB1-mAG1-FKBP12) とを発現させた細胞において、mTOR タンパク質の FRB ドメインと FKBP12 との結合を誘導するラパマイシンを添加した後、CD80 のホモ 2 量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、上部のパネルは、前述の CD80 を分析した結果を示し、下部のパネルは、陰性対照として、CD80 の代わりに CD2 を用いて分析した結果を示す。図中のスケールバーは 20 μ m を示す。

[図33] p62 タンパク質の PB1 ドメインを解析対象である p50 の N 末に融合してなるタンパク質 (PB1-p50) と、p62 タンパク質の PB1 ドメインを解析対象である p65 の C 末に融合してなるタンパク質 (p65-PB1) と、蛍光タンパク質として mKO2 を κ B α の N 末に融合してなるタンパク質 (mKO2- κ B α) とを発現させた細胞において、p50、p65 及び κ B α からなる 3 量体形成を、蛍光輝点を指標として判定

できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左側のパネルは、その結果を示し、右側のパネルは、陰性対照として、p65-PB1を発現させることなく分析した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図34] mAG1を解析対象であるCyclinD1のN末に融合してなるタンパク質(mAG1-CyclinD1)と、p62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるp21のC末に融合してなるタンパク質(p21-PB1)と、p62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるCDK4のC末に融合してなるタンパク質(CDK4-PB1)とを発現させた細胞において、CyclinD1、p21及びCDK4からなる3量体形成を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左側のパネルは、その結果を示し、真中のパネルは、陰性対照として、CDK4-PB1の代わりにPB1のみを発現させて分析した結果を示し、右側のパネルは、陰性対照として、CDK4-PB1の代わりに他のタンパク質を融合させていないCDK4を発現させて分析した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図35] mAG1を解析対象であるカルモジュリンのC末に融合してなるタンパク質(Calmodulin-mAG1)と、p62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるM13ペプチドのC末に融合してなるタンパク質(M13peptide-PB1)とを発現させた細胞において、カルモジュリン及びM13ペプチドからなるヘテロ4量体形成を、当該4量体形成を誘導するヒスタミンを添加し、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左側のパネルは、ヒスタミン添加前の細胞を分析した結果を示し、真ん中のパネルは、ヒスタミンを添加してから60秒後の細胞を分析した結果を示し、右側のパネルは、ヒスタミンを添加してから300秒後の細胞を分析した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図36] 蛍光タンパク質としてmUkG1を解析対象であるカルモジュリンの

C末に融合してなるタンパク質（CaImodulin-mUkG1）と、p62タンパク質のPB1ドメインを解析対象であるM13ペプチドのC末に融合してなるタンパク質（M13peptide-PB1）とを発現させた細胞において、カルモジュリン及びM13ペプチドからなるヘテロ4量体形成を、当該4量体形成を誘導するヒスタミンを添加し、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左側のパネルは、ヒスタミン添加前の細胞を分析した結果を示し、右側のパネルは、ヒスタミンを添加してから60秒後の細胞を分析した結果を示す。図中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図37]多量化能を有するタンパク質としてPKC δ タンパク質のPB1ドメイン、及びmAG1をp53のN末に融合してなるタンパク質（PKC δ -mAG1-p53）と、多量化能を有するタンパク質としてDGK δ タンパク質のSAMドメイン、及びmAG1をMDM2のN末に融合してなるタンパク質（DGK δ -mAG1-MDM2）とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中、左側のパネルは、ヌトリン-3添加前の細胞を分析した結果を示し、右側のパネルは、ヌトリン-3を添加してから60分後の細胞を分析した結果を示す。図中のスケールバーは10 μ mを示す（以下、図中の表記に関しては、図38～45において同様である）。

[図38]PKC δ -mAG1-p53と、多量化能を有するタンパク質としてTELタンパク質のSAMドメイン、及びmAG1をMDM2のN末に融合してなるタンパク質（TEL-mAG1-MDM2）とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

[図39]多量化能を有するタンパク質としてTankyrase1タンパク質のSAMドメイン、及びmAG1をp53のN末に融合してなるタンパク質（Tankyrase-mAG1-p53）と、多量化能を有するタンパク

質としてPKC ι タンパク質のPB1ドメイン、及びmAG1をMDM2のN末に融合してなるタンパク質（PKC ι -mAG1-MDM2）とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

[図40] Tankyrase-mAG1-p53とDGKd-mAG1-MDM2とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

[図41] Tankyrase-mAG1-p53とTEL-mAG1-MDM2とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

[図42] 多量化能を有するタンパク質としてDGK δ タンパク質のSAMドメイン、及びmAG1をp53のN末に融合してなるタンパク質（DGKd-mAG1-p53）と、PKC ι -mAG1-MDM2とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

[図43] DGKd-mAG1-p53とTEL-mAG1-MDM2とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

[図44] 多量化能を有するタンパク質としてTELタンパク質のSAMドメイン、及びmAG1をp53のN末に融合してなるタンパク質（TEL-mAG1-p53）と、多量化能を有するタンパク質としてTankyrase1タンパク質のSAMドメイン、及びmAG1をMDM2のN末に融合してなるタンパク質（Tankyrase-mAG1-MDM2）とを発現させ

た細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

[図45] TEL-mAG1-p53とDGKd-mAG1-MDM2とを発現させた細胞において、p53とMDM2とのタンパク質間相互作用を、蛍光輝点を指標として判定できるかどうかを分析した結果を示す顕微鏡写真である。

発明を実施するための形態

[0029] 以下、本発明をその好適な実施形態に即して詳細に説明する。また、下記各項目において説明する事項に関しては、当然のことながら特に断りがない限り、本発明全体を通し、他の項目等においても同様に解釈される。

[0030] <タンパク質間相互作用を検出するための方法1>

本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法の第1の態様は、

第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第2の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程(1)と、

前記細胞内における第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程(2)と、

前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程(3)とを含む方法である。

[0031] かかる方法によれば、後述の実施例1～12において示す通り、第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第2の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質

が蛍光輝点として検出されることとなる（図1及び2 参照）。

[0032] 本発明において「タンパク質」とは2個以上のアミノ酸がペプチド結合により結合した分子及びその修飾体を意味する。したがって、完全長のタンパク質のみならず、いわゆるオリゴペプチドやポリペプチドをも含む概念である。タンパク質の修飾としては、例えば、リン酸化、グリコシル化、パルミトイル化、プレニル化（例えば、ゲラニルゲラニル化）、メチル化、アセチル化、ユビキチン化、SUMO化、ヒドロキシル化、アミド化が挙げられる。

[0033] 本発明にかかる「第1のタンパク質」及び「第2のタンパク質」としては、相互作用を検出したい所望のタンパク質を用いることができる。また、第1のタンパク質と第2のタンパク質とは異なってもよく、同一であってもよいが、後述の実施例1～12及び比較例1において示す通り、本発明の方法によれば、ホモ多量体の形成及び解消（消失）を効率良く判定できるため、本発明の方法は、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが同一の場合に、より有用である。

[0034] 本発明にかかる「第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用」には、直接的な相互作用のみならず、第1のタンパク質と第2のタンパク質との間に他の分子（タンパク質、核酸、糖、脂質、低分子化合物等）を介して複合体を形成するような、間接的な相互作用も含まれる。

[0035] 本発明にかかる「多量化能を有するタンパク質」は、多量体を形成できるタンパク質であればよく特に制限はないが、本発明の方法において蛍光輝点をより検出し易いという観点から、3量体以上の多量体を形成できるタンパク質であることが好ましい。このような多量化能を有するタンパク質としては、p62のPB1ドメイン、TFGのPB1ドメイン、PKC ι のPB1ドメイン、TELのSAMドメイン、DGK δ のSAMドメイン及びTankyrase-1のSAMドメインが挙げられ、これらの中においては、ホモ4～8量体を形成するため、本発明の方法において蛍光輝点をより検出し易いという観点から、p62のPB1ドメインがより好まし

い。

[0036] なお、p62のPB1ドメイン、TFGのPB1ドメイン、PKC δ のPB1ドメイン、TELのSAMドメイン、DGK δ のSAMドメイン及びTankyrase-1のSAMドメインは、典型的には各々、配列番号：2で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：4で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：6で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：8で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：10で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号：12で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質である。

[0037] これら「多量化能を有するタンパク質」のアミノ酸配列は、自然界において（すなわち、非人工的に）変異し得、また人為的に変異を導入することもできる。このような変異体も、多量化能を有し、融合させた第1のタンパク質及び第2のタンパク質が相互作用した場合に、会合体（蛍光輝点）を形成する性質を有する限り、本発明において用いることができる。

[0038] 本発明にかかる「蛍光タンパク質」は、蛍光を発することのできるタンパク質であればよく、例えば、単量体アザミグリーン1（monomeric Azami Green 1、mAG1）、monomeric Umi kinoko-Green（単量体ウミキノコグリーン、mUkG）、monomeric Kusabira-Orange 2（単量体クサビラオレンジ2、mKO2）、monomeric Keima-Red（単量体ケイマーレッド、mKeima、mKeima-Red）、monomeric Midoriishi-Cyan 1（単量体ミドリイシーシアン1、mMiCy）、monomeric Kusabira-Orange 1（単量体クサビラオレンジ1、mKO1）、monomeric Cherry（単量体チェリー、mCherry）、FusionRed（フュージョンレッド）、Dronpa-Green 1（ドロンパーグリーン1、DG1）、Midoriishi-Cyan 1（ミドリイシーシアン1、MiCy

1)、Kusabira-Cyan1 (クサビラーシアン1、KCy1)、dimeric Azami-Green (AB) (二量体アザミグリーン (AB)、dAG (AB))、Kusabira-Orange1 (クサビラオレンジ1、KO1)、dimeric Keima-Red (二量体ケイマーレッド、dKeima、dKeima-Red)、TGuvが挙げられるが、蛍光タンパク質が多量体を形成できるタンパク質である場合には、前述の多量化能を有するタンパク質と融合させた際に、第1のタンパク質及び第2のタンパク質の相互作用の如何を問わずに、会合体 (蛍光輝点) を形成し易くなるという観点から、単量体蛍光タンパク質 (mAG1、mUkG、mKO2、mKeima、mMiCy、mKO1、mCherry、FusionRed、DG1等) が好ましく、mAG1、FusionRedがより好ましく、mAG1がさらに好ましい。

[0039] なお、mAG1、mUkG、mKO2、mKeima、mMiCy、mKO1、MiCy1、KCyl、dAG (AB)、KO1、dKeima、TGuv、mCherry、FusionRed及びDG1は、典型的には各々、配列番号：14に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：16に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：18に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、Genbankアクセッション番号：AB209969で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：20に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、Genbankアクセッション番号：AB128821で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、Genbankアクセッション番号：AB128822で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：22に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：24に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、Genbankアクセッション番号：AB128820で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、Genbankアクセッション番号：AB209968で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：26に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、GenBankアクセッション番号：AAV52

164で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：40に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質及びGenBankアクセション番号：BAD72874で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質である。

[0040] これら蛍光タンパク質のアミノ酸配列は、自然界において（すなわち、非人工的に）変異し得る。また、人為的に変異を導入することもできる。このような変異体も、蛍光を発することができる限り、本発明において用いることができる。

[0041] また、本発明においては、前述の蛍光タンパク質の代わりに、ルシフェラーゼ等の化学発光タンパク質も使用することができる。蛍光タンパク質は、電磁波照射によって当該タンパク質の電子が励起され、該電子が基底状態に戻る際に放出される電磁波（光）を発する（*photo luminescence*）。一方、化学発光タンパク質は、当該タンパク質が触媒する化学反応によって、発光基質の電子が励起され、電磁波（光）を発する。このように、発光機構において、蛍光タンパク質と化学発光タンパク質とは原理的に類似しているため、本発明において、化学発光タンパク質も使用可能である。

[0042] このような化学発光タンパク質として、特に制限はなく、例えば、ルシフェラーゼが挙げられ、その好適な例として、プロメガ NanoLuc（登録商標、Nluc）ルシフェラーゼ（プロメガ株式会社製）、ガウシアルシフェラーゼ（*Gaussia luciferase*、Chem. Sci.、2013年、4巻、第4395～4400ページ 参照）が挙げられる。

[0043] また、本発明においては、上述の蛍光タンパク質の代わりに、化学反応のエネルギーによって、蛍光タンパク質が電磁波（光）を出す、蛍光タンパク質とルシフェラーゼとの融合タンパク質（ナノーランタン（*Nano-lantern*）、*Nat Commun.*、2012年、3巻、1262ページ 参照）も使用し得る。

[0044] さらに、蛍光タンパク質の代わりに、蛍光色素に特異的に結合するタンパク質を用いることができる。かかるタンパク質を細胞内に発現させておき、

該蛍光色素を細胞に導入することにより、蛍光タンパク質として使用することができるからである。このような蛍光色素に特異的に結合するタンパク質の例として、HaloTag（プロメガ株式会社製）が挙げられる。

[0045] 本発明にかかる「第1の融合タンパク質」においては、第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含み、第2の融合タンパク質との会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、N末側から順に、第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質にて融合されてなるものであってもよく、第1のタンパク質、蛍光タンパク質及び多量化能を有するタンパク質にて融合されてなるものであってもよく、多量化能を有するタンパク質、第1のタンパク質及び蛍光タンパク質にて融合されてなるものであってもよく、多量化能を有するタンパク質、蛍光タンパク質及び第1のタンパク質にて融合されてなるものであってもよく、蛍光タンパク質、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質にて融合されてなるものであってもよく、蛍光タンパク質、多量化能を有するタンパク質及び第1のタンパク質にて融合されてなるものであってもよい。

[0046] 本発明にかかる「第2の融合タンパク質」においては、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含み、第1の融合タンパク質との会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、多量化能を有するタンパク質は、第2のタンパク質のN末、C末のいずれに融合させてもよい。また、蛍光輝点がより検出し易くなるという観点から、第2の融合タンパク質は、さらに蛍光タンパク質を含む融合タンパク質であることが好ましい（図2 参照）。また、蛍光タンパク質は、融合タンパク質のN末、C末のどちらか一方若しくは両側、又は第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質の間に融合させることができる。第2の融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質としては、上述の通りであり、第1の融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質と同一のものであってもよく、異なるものであってもよいが、タンパク質間相互作用の発生及び解消等に応じた、第1のタンパク質及び第2のタンパク質の各々の細胞内局在の変化を追跡できるという観点から、第1の融合タ

ンパク質に含まれる蛍光タンパク質と第2の融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質とは異なるものであることが好ましい。また、このように分光可能な異なる蛍光タンパク質を用いることにより、第1のタンパク質及び第2のタンパク質の各々の発現量も測定することもできる。さらに、異なる蛍光タンパク質は、会合体（蛍光輝点）内部にて高い濃度で存在し、非常に近接することになるため、FRET又は蛍光再吸収が生じ得る。そして、このような場合、画像化等せずとも、FRET又は蛍光再吸収の結果、蛍光輝点から放射される蛍光の強度を測定することにより、タンパク質間相互作用を判定することが可能となる（蛍光再吸収については、「蛍光イメージング革命（第27回）FRETを再吸収と区別して理解するために」細胞工学 25（1），67－69，2006－01 参照）。

[0047] 「第1の融合タンパク質」及び「第2の融合タンパク質」において、各タンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサータンパク質を介した間接的なものであってもよい。また、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、他の機能性タンパク質を含むものであってもよい。この場合、他の機能性タンパク質は、融合タンパク質のN末、C末のどちらか一方若しくは両側、又は、第1のタンパク質若しくは第2のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質の間に、直接的に又は間接的に融合させることができる。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、本発明にかかる融合タンパク質に付与したい機能に応じて適宜選択される。例えば、融合タンパク質の精製を容易にする目的で用いる機能性タンパク質としては、Myc－タグ（tag）タンパク質、His－タグタンパク質、ヘマグルチン（HA）－タグタンパク質、FLAG－タグタンパク質（登録商標、Sigma-Aldrich社）、グルタチオン－S－トランスフェラーゼ（GST）タンパク質が挙げられる。

[0048] 本発明にかかる「細胞」としては特に制限はなく、真核細胞であってもよく、原核細胞であってもよく、例えば、動物細胞（HEK293細胞、U2OS細胞、HeLa細胞等）、昆虫細胞（Sf9細胞等）、植物細胞、酵母

、大腸菌が挙げられる。また、かかる細胞は、生体外で培養した状態（例えば、培地中又は培地上にて生育している細胞）であってもよく、生体内に存在する状態（例えば、第1の融合タンパク質をコードするDNAと第2の融合タンパク質をコードするDNAとが導入されているトランスジェニック動物内の細胞）であってもよい。また、本発明にかかる融合タンパク質等は、通常同一の細胞に導入又は発現させることになるが、異なる細胞であってもよい。そして、このような場合、サイトカインと受容体との相互作用、受容体間の相互作用等の、異なる細胞間のタンパク質間相互作用も判定することが可能となる。

[0049] 融合タンパク質の前記細胞内における発現は、目的に応じて、一過性の発現であってもよく、恒常的な発現であってもよい。融合タンパク質の細胞における発現は、後述の本発明にかかるベクターを前記細胞に導入することにより行うことができる。細胞にベクターを導入する公知の手法としては、動物細胞に対しては、リポフェクション法、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、DEAEーデキストラン法、ウィルス（アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス等）、マイクロインジェクション法を利用した方法が挙げられる。また、昆虫細胞に対しては、バキュロウィルスを利用した方法が挙げられる。さらに、植物細胞に対しては、アグロバクテリウム法、電気穿孔法、パーティクルガン法等が挙げられる。また、酵母に対しては、酢酸リチウム法、電気穿孔法、スフェロプラスト法が挙げられる。さらに、大腸菌に対しては、熱ショック法（例えば、塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法）、電気穿孔法等が挙げられる。

[0050] また、本発明において、融合タンパク質の前記細胞内への導入は、当業者であれば細胞の種類に合わせて適宜公知の手法を選択して行うことができる。タンパク質を細胞に導入する公知の手法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、電気穿孔法、マイクロインジェクション法が挙げられる。

[0051] 本発明において検出する「蛍光輝点」は、本発明にかかるタンパク質間相

相互作用の結果、融合タンパク質等の会合体形成によって会合体に含まれる蛍光タンパク質の高密度の局在化が生じるものであり、典型的には、拡散状態で存在している蛍光タンパク質の蛍光強度よりも高い蛍光強度を有する、顕微鏡による二次元観察では、大きさ直径0.2～5 μm (0.03～20 μm^2) の領域である。

[0052] 「蛍光輝点の検出」は、例えば、蛍光タンパク質に対応した励起フィルター及び吸収フィルターを備えた蛍光顕微鏡による観察、IN Cell Analyzer (GEヘルスケア社製) 等のイメージングサイトメーターによる解析により行うことができる。また、得られた画像を画像解析プログラム (例えば、後述のicyスポット検出プログラム) により処理することによっても、蛍光輝点を検出することができる。なお、かかる蛍光輝点の検出において、検出する蛍光輝点の特性 (蛍光輝点が発する蛍光の波長、強度等)、並びに用いる装置及びプログラム等に合わせて、フィルター、検出器、各種パラメーター等の選択、設定は、当業者であれば適宜行うことができる。

[0053] 例えば、後述の実施例2に示す通り、スポット検出解析プログラム icy. 5.4.2 (J. -C. Olivo-Marin 「Extraction of spots in biological images using multiscale products」 Pattern recognition, vol. 35-9, 1989～1996ページ, 2002年、<http://icy.bioimageanalysis.com> 参照) における、設定値 Spot Detectorプラグイン (Scale1, Scale2, Scale3 全てにチェックを入れ、感度 (Sensitivity) を全て100に設定した際の条件) にて検出可能な「解析プログラムで算出された単位当たりの蛍光強度値」が、バックグラウンド (例えば、陰性対照となる細胞における同蛍光強度値) の少なくとも2.0倍以上、より好ましくは2.5倍以上、さらにより好ましくは5.0倍以上、特に好ましくは10倍以上であれば、蛍光輝点を検出できたと判定でき

る。

[0054] 本発明の方法においては、細胞において前記蛍光輝点が検出されれば、第1のタンパク質と第2のタンパク質とは相互作用していると判定することができ、前記蛍光輝点が検出されなければ、第1のタンパク質と第2のタンパク質とは相互作用していないと判定することができる。

[0055] 以上、本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法の1態様について説明したが、本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法は上記態様に限定されるものではない。例えば、前記第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質とを各々分割して細胞内に発現させ又は細胞に導入し、その後、当該細胞内における各融合タンパク質の再構成を介し、タンパク質間相互作用を判定することも、本発明によれば可能となる。より具体的には、以下に示す第2～5の態様も本発明はとり得る。

[0056] <タンパク質間相互作用を検出するための方法2>

本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法の第2の態様は、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法である

(1) 第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第3の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第4の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第5の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第3の融合タンパク質と、第4の融合タンパク質と、第5の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[0057] かかる方法によれば、後述の実施例13及び14において示す通り、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第3の融合タンパク質

と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第4の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第5の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、多量化能を有するタンパク質どうしが会合することにより、第3の融合タンパク質及び第5の融合タンパク質が結合し、また第4の融合タンパク質及び第5の融合タンパク質が結合し、上述の第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質が該細胞内において発現したこととなる（図3 参照）。そして、上述の第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質を利用する方法同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることとなる。

[0058] 本発明にかかる「第3の融合タンパク質」及び「第4の融合タンパク質」は、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質、並びに第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を各々含むものであればよく、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、多量化能を有するタンパク質は、第1のタンパク質又は第2のタンパク質のN末、C末のいずれに融合させてもよい。また、「第3の融合タンパク質」及び「第4の融合タンパク質」において、各タンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサータンパク質を介した間接的なものであってもよい。

[0059] さらに、「第3の融合タンパク質」及び「第4の融合タンパク質」は、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、各々他の機能性タンパク質を含むものであってもよい。この場合、他の機能性タンパク質は、融合タンパク質のN末、C末のどちらか一方若しくは両側、又は、第1のタンパク質又は第2のタンパク質と、多量化能を有するタンパク質との間に、直接的に又は間接的に融合させることができる。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、上述の第1及び第2の融合タンパク質同様に、本発明にかかる融合タンパク質に付与したい機能に応じて適宜選択される。

[0060] 本発明にかかる「第5の融合タンパク質」は、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含むものであればよく、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、多量化能を有するタンパク質は、蛍光タンパク質のN末、C末のいずれに融合させてもよい。また、各タンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサタンパク質を介した間接的なものであってもよい。

[0061] さらに、「第5の融合タンパク質」は、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、他の機能性タンパク質を含むものであってもよい。この場合、他の機能性タンパク質は、融合タンパク質のN末、C末のどちらか一方若しくは両側、又は、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質の間に、直接的に又は間接的に融合させることができる。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、上述の第1及び第2の融合タンパク質同様に、本発明にかかる融合タンパク質に付与したい機能に応じて適宜選択される。

[0062] <タンパク質間相互作用を検出するための方法3>

本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法の第3の態様は、下記工程（1）～（3）を含む方法である。

（1）アフィニティタグ及び第1のタンパク質を含む第1の標識化タンパク質と、アフィニティタグ及び第2のタンパク質を含む第2の標識化タンパク質と、前記アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナーが結合しており、かつ多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む、第6の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

（2） 前記細胞内における、第1の標識化タンパク質と、第2の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

（3） 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[0063] かかる方法によれば、後述の実施例15において示す通り、アフィニティタグ及び第1のタンパク質を含む第1の標識化タンパク質と、アフィニティ

タグ及び第2のタンパク質を含む第2の標識化タンパク質と、前記アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナーが結合しており、かつ多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む、第6の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、前記アフィニティタグと前記結合パートナーとが結合することにより、第1の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質とが結合し、また第2の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質とが結合することにより、図1及び2に示す第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質が該細胞内において発現することになる（図4 参照）。そして、上述の第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質を利用する方法同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることとなる。

[0064] 本発明にかかる「アフィニティタグ」及び「結合パートナー」は、細胞内において結合し得る関係にあり、またタンパク質に結合できる化合物であれば特に制限はなく、例えば、相互作用することが知られているタンパク質の組み合わせを用いることができる。このような組み合わせとして、後述の実施例において示すような、mTORタンパク質のFRBドメイン及びFKBP12等が好適に用いられ、また、光照射依存的に結合する、フィトクロームB（PHYB）及びフィトクローム結合因子（PIF）、クリプトクロム2（CRY2）及びクリプトクロム結合bHLH1（CIB1）、LOV及びePDZ、Dronpa145K-CAAX及びmNeptune等も好適に用いることができる（光照射依存的に結合するタンパク質の組み合わせについては、Nat Rev Mol Cell Biol.、2014年、15巻、8号、551～558ページ 参照）。さらに、ジヒドロ葉酸還元酵素、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、ホタルルシフェラーゼ

、ガウシアルシフェラーゼ等の酵素を構成するサブユニットも好適に用いることができる。また、本発明にかかる「アフィニティタグ」及び「結合パートナー」としては、このような公知のタンパク質間相互作用を利用することのみならず、例えば、ビオチン及びアビジン、レクチン及び糖、プロテイン A（又は G）及びイムノグロビン定常領域、抗原及び抗体等も利用することができる。

[0065] アフィニティタグと結合パートナーとの結合は、抗原抗体反応のような自発的に生じるものであってもよく、刺激に応じて誘導されて生じるものであってもよい。かかる結合を誘導する刺激としては特に制限はなく、例えば、mTORタンパク質のFRBドメインとFKBP12との結合を誘導するラパマイシンのような低分子化合物、PHYBとPIFとの結合等を誘導するような光照射が挙げられる。また、かかる刺激によって結合が誘導されるアフィニティタグ及び結合パートナーを用いる場合には、前記工程（1）、又は、前記工程（1）及び（2）の間に、細胞に当該刺激を与えることが必要となる。

[0066] 本発明にかかる「第1の標識化タンパク質」及び「第2の標識化タンパク質」は、第1のタンパク質及び第2のタンパク質が各々アフィニティタグによって標識されているものであればよく、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、アフィニティタグは、第1のタンパク質又は第2のタンパク質のN末、C末、さらには中間部の領域のいずれに結合させてもよい。

[0067] 本発明にかかる「第6の融合タンパク質」は、前記多量化能を有するタンパク質及び前記蛍光タンパク質を含み、かつ前記結合パートナーが結合されているものであればよく、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、結合パートナーは、第6の融合タンパク質のN末、C末、さらには中間部の領域のいずれに結合させてもよい。また、「第6の融合タンパク質」において、各タンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサータンパク質を介した間接的なものであってもよい。

[0068] 前記アフィニティタグ又は結合パートナーの各タンパク質への「結合」と

しては特に制限はなく、遺伝子レベルでの結合であってもよく、また化学的な結合であってもよい。遺伝子レベルでの結合は、前述又は後述の実施例において示すような、所謂「融合」であり、アフィニティタグ又は結合パートナーをコードするDNAを、第1のタンパク質、第2のタンパク質又は第6の融合タンパク質をコードするDNAに、その読み枠を合わせて付加又は挿入することにより達成される。また、化学的な結合は、共有結合であってもよく、非共有結合であってもよい。「共有結合」としては特に制限はなく、例えば、アミノ基とカルボキシル基とのアミド結合、アミノ基とアルキルハライド基とのアルキルアミン結合、チオールどうし間のジスルフィド結合、チオール基とマレイミド基又はアルキルハライド基とのチオエステル結合が挙げられる。

[0069] また、第1の標識化タンパク質、第2の標識化タンパク質及び第6の融合タンパク質はいずれも、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、他の機能性タンパク質を含むものであってもよい。この場合、他の機能性タンパク質は、各タンパク質のN末、C末のどちらか一方若しくは両側、又は、構成するタンパク質（例えば、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質）の間に、直接的に又は間接的に融合させることができる。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、上述の第1及び第2の融合タンパク質同様に、本発明にかかる融合タンパク質に付与したい機能に応じて適宜選択される。

[0070] <タンパク質間相互作用を検出するための方法4>

本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法の第4の態様は、下記工程（1）～（3）を含む方法である。

（1）蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第7の融合タンパク質と、蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第8の融合タンパク質と、第1の部分ペプチドに結合することによって蛍光タンパク質が再構成し得る第2の部分ペプチド、及び多量化能を有するタンパク質を含む第9の融合タンパク質とを、

細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第7の融合タンパク質と、第8の融合タンパク質と、第9の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[0071] かかる方法によれば、蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第7の融合タンパク質と、蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第8の融合タンパク質と、第1の部分ペプチドに結合することによって蛍光タンパク質が再構成し得る第2の部分ペプチド、及び多量化能を有するタンパク質を含む第9の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、当該再構成によって蛍光タンパク質が該細胞内において発現することになり、ひいては、図1及び2に示す第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質が該細胞内において発現することになる(図5参照)。そして、上述の第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質を利用する方法同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることとなる。

[0072] 本発明にかかる「第1の部分ペプチド」及び「第2の部分ペプチド」としては、細胞内において、これらペプチドが結合することにより、蛍光タンパク質を再構成できるものであればよい。なお、本発明において「再構成」とは、このように複数の部分ペプチドが結合することにより、それらが元来構成していたタンパク質が機能し得る状態(例えば、蛍光タンパク質であれば、蛍光を発し得る状態、多量化能を有するタンパク質であれば、多量体を形成し得る状態)に戻ることを意味する。

[0073] また、このような再構成し得る部分ペプチドは、当業者であれば、例えば

、Cabantous Sら、Nature Biotechnology、2005年、23巻、102～107ページ等の記載を参酌しながら、適宜設計、調製することができる。

[0074] なお、Cabantous Sら、Sci Rep.、2013年10月、4；3：2854等に記載の通り、蛍光タンパク質を3つ以上に分割しても再構成し得ることが明らかになっている。したがって、第1の部分ペプチド及び第2の部分ペプチドは、このような3以上の断片の中から選択されるものでもあってよい。また、この場合、第1及び第2の部分ペプチドとして用いなかった断片は、前記工程（1）、又は、前記工程（1）及び（2）の間に、細胞内において発現又は細胞に導入する必要がある。

[0075] また、第1の部分ペプチド及び第2の部分ペプチドは各々、第1又は第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質のN末、C末のいずれに融合させてもよい。さらに、第7の融合タンパク質、第8の融合タンパク質及び第9の融合タンパク質のいずれにおいて、各タンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサータンパク質を介した間接的なものであってもよい。

[0076] また、第7の融合タンパク質、第8の融合タンパク質及び第9の融合タンパク質はいずれも、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、他の機能性タンパク質を含むものであってもよい。この場合、他の機能性タンパク質は、各融合タンパク質のN末、C末のどちらか一方若しくは両側、又は、構成するタンパク質の間（例えば、第1の部分ペプチドと第1又は第2のタンパク質との間、第2の部分ペプチドと多量化能を有するタンパク質との間）に、直接的に又は間接的に融合させることができる。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、上述の第1及び第2の融合タンパク質同様に、本発明にかかる融合タンパク質に付与したい機能に応じて適宜選択される。

[0077] ＜タンパク質間相互作用を検出するための方法5＞

本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法の第5の態様は、下記工程（1）～（3）を含む方法である。

(1) 多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第10の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第11の融合タンパク質と、第3の部分ペプチドに結合することによって多量化能を有するタンパク質が再構成し得る第4の部分ペプチド、及び蛍光タンパク質を含む第12の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第10の融合タンパク質と、第11の融合タンパク質と、第12の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[0078] かかる方法によれば、多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第10の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第11の融合タンパク質と、第3の部分ペプチドに結合することによって多量化能を有するタンパク質が再構成し得る第4の部分ペプチド、及び蛍光タンパク質を含む第12の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、当該再構成によって多量化能を有するタンパク質が該細胞内において発現することになり、ひいては、図1及び2に示す第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質が該細胞内において発現することになる(図6 参照)。そして、上述の第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質を利用する方法同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、再構成された多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることとなる。

[0079] 本発明にかかる「第3の部分ペプチド」及び「第4の部分ペプチド」とし

ては、細胞内において、これらペプチドが結合することにより、多量化能を有するタンパク質を再構成できるものであればよく、当業者であれば、上述の通り、Ohashi Kら、Biotechniques.、2012年、52巻、1号、45～50ページ等の記載を参酌しながら、かかる部分ペプチドを適宜設計、調製し得る。

[0080] また、第3の部分ペプチド及び第4の部分ペプチドは各々、第1又は第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質のN末、C末のいずれに融合させてもよい。また、第10の融合タンパク質、第11の融合タンパク質及び第12の融合タンパク質のいずれにおいて、各タンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサタンパク質を介した間接的なものであってもよい。

[0081] さらに、第10の融合タンパク質、第11の融合タンパク質及び第12の融合タンパク質はいずれも、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、他の機能性タンパク質を含むものであってもよい。この場合、他の機能性タンパク質は、各融合タンパク質のN末、C末のどちらか一方若しくは両側、又は、構成するタンパク質の間（例えば、第3の部分ペプチドと第1又は第2のタンパク質との間、第4の部分ペプチドと蛍光タンパク質との間）に、直接的に又は間接的に融合させることができる。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、上述の第1及び第2の融合タンパク質同様に、本発明にかかる融合タンパク質に付与したい機能に応じて適宜選択される。

[0082] 以上、本発明のタンパク質間相互作用を判定するための方法の第2～5の態様について説明したが、これらの方法においては、上記第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質とを各々分割して細胞内に発現させ又は細胞に導入することになるため、解析対象となる第1又は第2のタンパク質に融合するタンパク質等のタグの分子量が小さくて済むことになる。故に、タンパク質間相互作用の判定等において、解析対象となるタンパク質の機能、局在の変化等はより阻害されにくくなる。

[0083] また、このように、分子量の小さいタグが融合した状態にて解析対象とな

るタンパク質を細胞内に維持することができるため、上述の通り、化合物の添加や光照射等の刺激に応じて本発明にかかる融合タンパク質が再構成される系を構築することにより、タンパク質間相互作用を任意のタイミングにて判定し得る状態に設定することができる。

[0084] また、蛍光タンパク質を含む融合タンパク質を恒常的に発現させた細胞を事前に調製しておくことで、これら細胞に解析対象となるタンパク質を含む融合タンパク質を一過的に発現させても、蛍光シグナルの細胞間のバラツキの影響が抑えられ、タンパク質間相互作用の判定をより安定的に行うこともできる。

[0085] <タンパク質間相互作用を検出するための方法6>

解析対象を3以上のタンパク質とする場合には、上述の第1の態様を応用することにより、下記工程(1)～(3)を含む方法を、タンパク質間相互作用を判定するための方法の第6の態様として、本発明は提供することもできる。

(1) 第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第13の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第14の融合タンパク質と、第3のタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第15の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における第13の融合タンパク質と第14の融合タンパク質と第15の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[0086] かかる方法によれば、後述の実施例16～18において示す通り、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第13の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第14の融合タンパク質と、第3のタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第15の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、第1

のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質が相互作用すれば、図1等に示した系同様に、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることになる（図7 参照）。

[0087] 本発明にかかる「第3のタンパク質」としては、上述の第1及び第2のタンパク質同様に、相互作用を検出したい所望のタンパク質を用いることができる。また、第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質とは異なってもよく、そのうち2つが同一であってもよく、3つ全てが同じであってもよい。

[0088] 本発明にかかる「第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質との相互作用」には、直接的な相互作用のみならず、タンパク質間に他の分子（タンパク質、核酸、糖、脂質、低分子化合物等）を介して複合体を形成するような、間接的な相互作用も含まれる。

[0089] 本発明にかかる「第13の融合タンパク質」は、第1のタンパク質及び前記多量化能を有するタンパク質を含むタンパク質であればよく、また「第14の融合タンパク質」は、第2のタンパク質及び前記多量化能を有するタンパク質を含むタンパク質であればよい。これら融合タンパク質において、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、前記多量化能を有するタンパク質は、第1又は第2のタンパク質のN末、C末のいずれに融合させてもよく、また各タンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサータンパク質を介した間接的なものであってもよい。

[0090] 本発明にかかる「第15の融合タンパク質」は、第3のタンパク質及び前記蛍光タンパク質を含むタンパク質であればよく、会合体（蛍光輝点）の形成を阻害しない限り、前記蛍光タンパク質は、第3のタンパク質のN末、C末のいずれに融合させてもよい。またタンパク質間の融合は、直接的なものであってもよく、リンカー又はスペーサータンパク質を介した間接的なものであってもよい。

[0091] <タンパク質間相互作用を検出するための方法 7>

本発明は、タンパク質間相互作用を判定するための第7の態様として、以下の方法も提供し得る。

[0092] 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定するための方法であって、第1の多量化能を有するタンパク質と第2の多量化能を有するタンパク質とは異なるタンパク質であり、かつ下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 第1のタンパク質、第1の多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第16の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び第2の多量化能を有するタンパク質を含む第17の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における第16の融合タンパク質と第17の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[0093] 本発明にかかる「第16の融合タンパク質」及び「第17の融合タンパク質」は、多量化能を有するタンパク質（第1の多量化能を有するタンパク質及び第2の多量化能を有するタンパク質）が異なるという点を除いては、上述の第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質と各々同様のタンパク質である。なお、第1のタンパク質と第2のタンパク質についても同様であり、これらタンパク質は異なってもよく、同一であってもよいが、後述の実施例において示す通り、本発明のタンパク質間相互作用を判定するための第7の態様は、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが異なっている場合に、より有用である。

[0094] 以上、タンパク質間相互作用を判定するための好適な実施態様について説明したが、本発明は、これらの方法を利用する、以下に示す方法も提供することができる。

[0095] <タンパク質間相互作用の時間情報等を得るための方法>

後述の実施例 2 及び 1 1 ～ 1 3 等において示す通り、本発明の方法は、蛍光輝点の存在又は非存在を指標として、タンパク質間相互作用の発生のみならず、タンパク質間相互作用の消失を判定することができる。また、かかるタンパク質間相互作用の発生等を経時的に追跡することもできる。さらに、多量化能を有するタンパク質や蛍光タンパク質の局在等に影響を受けることなく、本発明においては細胞内の任意の領域においてタンパク質間相互作用を判定することもできる。

[0096] したがって、本発明は、蛍光輝点を検出することによって、タンパク質間相互作用の発生若しくは消失、該相互作用の発生若しくは消失するまでの時間、又は該相互作用の持続時間を判定する方法を提供することができる。

[0097] このような「タンパク質間相互作用の発生若しくは消失」の判定に関して、本発明においては、タンパク質間相互作用が生じる細胞内の領域をも特定することもできる。また、本発明によれば、「タンパク質間相互作用の発生若しくは消失」の判定を通して、当該タンパク質間相互作用が関与するシグナル伝達の発生及び消失、該シグナル伝達の発生若しくは消失するまでの時間並びに該シグナル伝達の持続時間を判定することができ、さらに該シグナル伝達が生じている細胞内の領域をも特定することもできる。また、第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との相互作用（又は、第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質と第 3 のタンパク質との相互作用）が特定の刺激に応答して発生又は消失するものであっても、本発明において判定することができる。したがって、本発明は、本発明にかかる蛍光輝点を検出することによって、特定の刺激に応答するタンパク質間相互作用の発生若しくは消失、該相互作用の発生若しくは消失するまでの時間、又は該相互作用の持続時間を判定するために、前記蛍光輝点を検出する方法も提供することができる。

[0098] 本発明にかかる「特定の刺激」とは、タンパク質間相互作用を直接的に又は間接的に誘導又は阻害できる刺激であればよく、また細胞内で生じる内在性因子による刺激（例えば、細胞内カルシウムイオン濃度の増減、酵素の活性化又は不活性化）であってよく、細胞に与えられる外部からの刺激（例え

ば、受容体に対するリガンド（アゴニスト又はアンタゴニスト）の細胞への投与）であってもよい。

[0099] また、本発明の方法においては、蛍光輝点を検出することによって、特定の刺激の発生若しくは消失、該刺激の発生若しくは消失するまでの時間、又は該刺激の持続時間を判定することもできる。

[0100] さらに、本発明の方法においては、特定の刺激の程度（例えば、特定の刺激が薬剤である場合には、その濃度）に応じたタンパク質間相互作用の増減も判定することができる。したがって、特定の刺激が薬剤である場合には、タンパク質間相互作用に対する、その薬剤の50%効果濃度（EC50）及び50%阻害濃度（IC50）を、本発明によって決定することができる。

[0101] また、本発明の方法においては、同一の細胞において、多種類のタンパク質間相互作用、特定の刺激に各々依存的な多種類のタンパク質間相互作用、ひいてはこれらタンパク質間相互作用が関与するシグナル伝達も判定することができる。

[0102] <特定のタンパク質と相互作用するタンパク質のスクリーニング方法>

本発明においては、任意のタンパク質間相互作用を判定することができる。したがって、本発明は、特定のタンパク質と相互作用するタンパク質をスクリーニングするための方法であって、第1のタンパク質及び第2のタンパク質のいずれか一方を該特定のタンパク質とし、他方を被検タンパク質とすることにより、本発明にかかる蛍光輝点の検出により、該特定のタンパク質と相互作用するタンパク質を選択する方法を提供することができる。また、3以上のタンパク質間の相互作用を対象とする場合には、特定のタンパク質と相互作用するタンパク質をスクリーニングするための方法であって、第1～3のタンパク質のうちの2つのタンパク質を該特定のタンパク質とし、残りの一つを被検タンパク質とすることにより、本発明にかかる蛍光輝点の検出により、該特定のタンパク質と相互作用するタンパク質を選択する方法を提供することができる。

[0103] 本発明にかかる「被検タンパク質」としては特に制限はない。網羅的に効

率良く特定のタンパク質と相互作用するタンパク質を選択できるという観点から、cDNAライブラリーがコードするタンパク質群を好適に用いることができる。

[0104] <タンパク質間相互作用に関与するアミノ酸残基の同定方法>

後述の実施例2等に示す通り、本発明において、蛍光輝点の蛍光強度を通してタンパク質間相互作用の強弱を定量的に分析することもできる。したがって、本発明によれば、タンパク質間相互作用に関与する第1のタンパク質中のアミノ酸残基又は第2のタンパク質中のアミノ酸残基（又は、第1～3のタンパク質中のアミノ酸残基）を同定するための方法であって、該第1のタンパク質及び該第2のタンパク質のいずれかに変異が導入されたタンパク質（又は、第1～3のタンパク質のいずれかに変異が導入されたタンパク質）を用い、前記蛍光輝点の強度が、変異が導入されていないタンパク質を用いた場合と比較して減弱した場合は、該変異が導入されたアミノ酸残基を前記相互作用に関与すると判定する方法を提供することができる。

[0105] 本発明にかかる「蛍光輝点の蛍光強度」には、一蛍光輝点の蛍光強度のみならず、一定領域内（例えば、一細胞内、蛍光顕微鏡観察における一視野内、一蛍光画像内）に存在する蛍光輝点の総蛍光強度も含まれる。

[0106] 「第1のタンパク質等に変異が導入されたタンパク質」の調製は、当業者であれば適宜公知の手法を選択して行うことができる。かかる公知の手法としては、部位特異的変異誘発（*site-directed mutagenesis*）法が挙げられる。

[0107] <タンパク質間相互作用を調節する物質のスクリーニング方法>

前述の通り、本発明の方法において、蛍光輝点の蛍光強度を指標として、タンパク質間相互作用の強弱を把握することができる。したがって、本発明によれば、被検化合物存在下で、第1の融合タンパク質と、第2の融合タンパク質とを細胞内に発現させる又は細胞内に導入する工程と、

前記細胞内において第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程と、

前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より増大する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の誘導物質として選択し、前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より減弱する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の抑制物質として選択する工程と、
を含む方法を提供することができる。

[0108] 本発明のスクリーニング方法において使用する被検化合物としては特に制限はなく、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞（微生物、植物細胞、動物細胞）の抽出液及び培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

[0109] また、被検化合物存在下の状態とは、例えば、被検化合物の培地への添加等による被検化合物と本発明にかかる細胞とが接触している状態や、被検化合物が本発明にかかる細胞内に導入された状態が挙げられる。

[0110] なお、本発明のスクリーニング方法は、蛍光輝点の強度を指標とするものであればよく、上記実施態様に限定されるものではない。したがって、別の態様として、以下に示す態様もとり得る。

[0111] 被検化合物存在下で、第3の融合タンパク質と、第4の融合タンパク質と、第5の融合タンパク質とを細胞内に発現させる又は細胞内に導入する工程と、

前記細胞内において第3の融合タンパク質と第4の融合タンパク質と第5の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程と、

前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より増大する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の誘導物質として選択し、前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より減弱する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の抑制物質として選択する工程と、を含む方法。

[0112] 被検化合物存在下で、第１の標識化タンパク質と、第２の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第６の融合タンパク質とを細胞内に発現させる又は細胞内に導入する工程と、

前記細胞内において、第１の標識化タンパク質と、第２の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第６の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程と、

前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より増大する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の誘導物質として選択し、前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より減弱する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の抑制物質として選択する工程と、を含む方法。

[0113] 被検化合物存在下で、第７の融合タンパク質と、第８の融合タンパク質と、第９の融合タンパク質とを細胞内に発現させる又は細胞内に導入する工程と、

前記細胞内において、第７の融合タンパク質と、第８の融合タンパク質と、第９の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程と、

前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より増大する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の誘導物質として選択し、前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より減弱する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の抑制物質として選択する工程と、を含む方法。

[0114] 被検化合物存在下で、第１０の融合タンパク質と、第１１の融合タンパク質と、第１２の融合タンパク質とを細胞内に発現させる又は細胞内に導入する工程と、

前記細胞内において、第１０の融合タンパク質と、第１１の融合タンパク質と、第１２の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程と、

前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点

の強度より増大する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の誘導物質として選択し、前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より減弱する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の抑制物質として選択する工程と、を含む方法。

[0115] 被検化合物存在下で、第13の融合タンパク質と、第14の融合タンパク質と、第15の融合タンパク質とを細胞内に発現させる又は細胞内に導入する工程と、

前記細胞内において、第13の融合タンパク質と、第14の融合タンパク質と、第15の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程と、

前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より増大する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の誘導物質として選択し、前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より減弱する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の抑制物質として選択する工程と、を含む方法。

[0116] 被検化合物存在下で、第16の融合タンパク質と、第17の融合タンパク質とを細胞内に発現させる又は細胞内に導入する工程と、

前記細胞内において、第16の融合タンパク質と、第17の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程と、

前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より増大する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の誘導物質として選択し、前記蛍光輝点の強度が前記被検化合物の非存在下において生じる蛍光輝点の強度より減弱する場合は、前記被検化合物を前記相互作用の抑制物質として選択する工程と、を含む方法。

[0117] <本発明の方法に用いられるためのキット>

本発明は、上記方法に用いられるためのキットを提供することができる。本発明のキットは、下記（a）～（h）からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含むキットである。

- [0118] (a) 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター
- (b) 第1の融合タンパク質をコードするベクター
- (c) 第2の融合タンパク質をコードするベクター
- (d) 第1の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞
- (e) 第2の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞
- (f) 第1の融合タンパク質をコードするベクターと第2の融合タンパク質をコードするベクターとを保持する形質転換細胞
- (g) 第1の融合タンパク質
- (h) 第2の融合タンパク質。
- [0119] 本発明にかかるベクターとしては、上述の細胞において、挿入されたDNAを発現（転写及び翻訳）するのに必要な制御配列を含むものであればよい。かかる制御配列としては、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、ターミネーター、ポリAテール、リボソーム結合配列（シャイン・ダルガノ（SD）配列）が挙げられる。さらに、本発明にかかるベクターにおいては、選択マーカー（薬剤耐性遺伝子等）、レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子等）を含んでいてもよい。また、このような本発明にかかるベクターの態様としては、例えば、プラスミドベクター、エピソーマルベクター、ウィルスベクターが挙げられる。
- [0120] 本発明にかかるベクターにおいてコードされるタンパク質は、上述の各融合タンパク質等であるが、かかるタンパク質の発現効率をより向上させるという観点から、当該タンパク質を発現させる細胞の種に合わせて、コドン

最適化したDNA（例えば、コドンがヒト化されたDNA）が、本発明にかかるベクターには、挿入されていてもよい。

[0121] また、本発明にかかるベクターは、後述の実施例において示す通り、当業者であれば、適宜、DNA化学合成法、遺伝子組み換え技術等の公知の技術を利用することにより、調製することができる。

[0122] 前記（a）に記載の「任意のタンパク質をコードするDNAの挿入を可能にするクローニング部位」としては、例えば、1又は複数の制限酵素認識部位を含むマルチクローニング部位、TAクローニング部位、GATEWAY（登録商標）クローニング部位が挙げられる。

[0123] 本発明にかかる融合タンパク質は、当業者であれば、これら融合タンパク質のヌクレオチド配列に基づき、無細胞タンパク質合成系（例えば、網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液）、大腸菌、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等を用い、遺伝学的手法により合成し、調製することができる。また、本発明にかかる融合タンパク質は、そのアミノ酸配列に基づき、市販のポリペプチド合成機によって化学的に合成し、調製することができる。

[0124] 本発明にかかるベクター又は融合タンパク質の標品においては、緩衝液、安定剤、保存剤、防腐剤等の他の成分が添加してあってもよい。

[0125] 本発明にかかる形質転換細胞は、前述の通り、本発明にかかるベクターを細胞に導入することにより調製することができる。また、本発明にかかる形質転換細胞の標品には、当該細胞の保存、培養に必要な培地、安定剤、保存剤、防腐剤等の他の成分が添加又は付属してあってもよい。

[0126] 本発明にかかる「使用説明書」は、前記ベクターや形質転換細胞を本発明の方法に利用するための説明書である。説明書は、例えば、本発明の方法の実験手法や実験条件、及び本発明の標品に関する情報（例えば、ベクターの塩基配列やクローニングサイト等が示されているベクターマップ等の情報、形質転換細胞の由来、性質、当該細胞の培養条件等の情報）を含むことができる。

[0127] なお、本発明のキットは、上記実施態様に限定されるものではなく、上述

のタンパク質間相互作用を判定するための実施態様に応じ、以下のような態様もとり得る。

[0128] 下記（a）～（h）からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、タンパク質間相互作用を判定するための第2の方法に用いられるためのキット

（a）多量化能を有するタンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記多量化能を有するタンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

（b）第3の融合タンパク質をコードするベクター

（c）第4の融合タンパク質をコードするベクター

（d）第5の融合タンパク質をコードするベクター

（e）第5の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

（f）第3の融合タンパク質

（g）第4の融合タンパク質

（h）第5の融合タンパク質。

[0129] 下記（a）～（h）からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、タンパク質間相互作用を判定するための第3の方法に用いられるためのキット

（a）アフィニティタグをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記アフィニティタグを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

（b）第1の標識化タンパク質をコードするベクター

（c）第2の標識化タンパク質をコードするベクター

（d）前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質を、コードするベクター

(e) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質をコードするベクターを、保持する形質転換細胞

(f) 第1の標識化タンパク質

(g) 第2の標識化タンパク質

(h) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質。

[0130] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、タンパク質間相互作用を判定するための第4の方法に用いられるためのキット

(a) 第1の部分ペプチドをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第1の部分ペプチドを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第7の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第8の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第9の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第9の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第7の融合タンパク質

(g) 第8の融合タンパク質

(h) 第9の融合タンパク質。

[0131] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、タンパク質間相互作用を判定するための第5の方法に用いられるためのキット

(a) 第3の部分ペプチドをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第3の部分ペプチドを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第10の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第11の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第12の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第12の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第10の融合タンパク質

(g) 第11の融合タンパク質

(h) 第12の融合タンパク質。

[0132] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、タンパク質間相互作用を判定するための第6の方法に用いられるためのキット

(a) 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、多量化能を有するタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 蛍光タンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、蛍光タンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(c) 第13の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第14の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第15の融合タンパク質をコードするベクター

(f) 第13の融合タンパク質

(g) 第14の融合タンパク質

(h) 第15の融合タンパク質。

[0133] 下記(a)～(f)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、タンパク質間相互作用を判定するための第7の方法に用いられるためのキット

(a) 第1の多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タ

ンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第1の多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第2の多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第2の多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(c) 第16の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第17の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第16の融合タンパク質

(f) 第17の融合タンパク質。

実施例

[0134] 以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0135] (実施例1)

本発明者らは、2つのタンパク質（第1のタンパク質及び第2のタンパク質）の相互作用の判定において、第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第2の融合タンパク質との利用を構想した（図1 参照）。より具体的には、これら2つの融合タンパク質を細胞内に発現させた場合において、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出される系の構築を考えた。

[0136] そして、多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインを選択し、蛍光タンパク質として単量体アザミグリーン1（mAG1

）を選択し、実際にこの系の有効性について検証した。さらに、蛍光輝点の検出のし易さを考慮し、第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質の双方にmAG1が含まれている態様にて、本検証を行った（図2 参照）。また、mAG1の発現においては、当該蛍光タンパク質をコードし、コドンヒト化したDNA（humanized-codon monomeric Azami Green 1、hmAG1）を用いた。

[0137] また、この検証においては、薬剤（AP1903又はAP20187）添加によりホモ2量体を形成することが知られているFKBP12タンパク質変異体を用いた。すなわち、今回の検証においては、第1のタンパク質及び第2のタンパク質は同一のタンパク質となり、また第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質は同一のタンパク質となる。なお、AP1903等により制御されるFKBP12タンパク質変異体のホモ2量体形成については、TIM CLACKSONら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1998年、95巻、第10437～10442ページ参照のこと。以下に本検出系を構築するための材料及び方法を示す。

[0138] <pPB1-hmAG1-MCLinker及びp hmAG1-PB1-MCLinkerの作製>

本検出系において、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質からなる融合タンパク質として、p62タンパク質のPB1ドメインのC末にmAG1を融合してなるタンパク質タグ（PB1-mAG1）と、p62タンパク質のPB1ドメインのN末にmAG1を融合してなるタンパク質タグ（mAG1-PB1）とを各々コードする発現ベクター（pPB1-hmAG1-MCLinker及びp hmAG1-PB1-MCLinker）を作製した。すなわち、PB1-mAG1をコードするヌクレオチド配列からなるDNA（配列番号：28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA）の両端に、制限酵素サイトを配した配列番号：27に記載のヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成した。また、mAG1-PB1をコードするヌクレオチド配列からなるDNA（配列番号：30に記載のA

ミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA)の両端に、制限酵素サイトを配した配列番号:29に記載のヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成した。そして、このようにして得られた合成DNAをNheI及びAgeIにて切断し、同じ制限酵素に組み合わせにて処理したp h m A G 1 - M C L i n k e r (A m a l g a a m 有限会社製)に挿入することにより、p P B 1 - h m A G 1 - M C L i n k e r 及び p h m A G 1 - P B 1 - M C L i n k e r を各々構築した。

[0139] <p P B 1 - h m A G 1 - F K B P 1 2 変異体の作製>

次に、前記の通り作製したp P B 1 - h m A G 1 - M C L i n k e r を用い、本発明にかかる融合タンパク質(P B 1 - m A G 1 を融合したF K B P 1 2 変異体)を発現させるためのベクターを作製した。すなわち、F K B P 1 2 変異体をコードするヌクレオチド配列からなるDNA(配列番号:32に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA)の両端に、制限酵素サイトを配した配列番号:31に記載のヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成した。そして、得られた合成DNAをE c o R I 及びX h o I にて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理した前記p P B 1 - h m A G 1 - M C L i n k e r に挿入することにより、p P B 1 - h m A G 1 - F K B P 1 2 変異体を構築した。

[0140] <細胞培養と遺伝子導入>

次に、前記の通り作製したp P B 1 - h m A G 1 - F K B P 1 2 変異体をH E K 2 9 3 細胞に導入し、該細胞において本発明にかかる融合タンパク質を発現させた。すなわち、まず、H E K 2 9 3 細胞を、10% F B S (E Q U I T E C H 社製)及び1% ペニシリン・ストレプトマイシン(L i f e t e c h n o l o g y 社製)を添加したD M E M (高グルコース、S I G M A A L D R I C H 社製)にて培養した。そして、遺伝子導入の前日に、このようにして培養したH E K 2 9 3 細胞を8ウェルチャンバースライド(N u n c 社製)に播種し、1ウェルあたり200 μ Lの培養液にて培養を行った。次いで、O p t i M E M (L i f e T e c h n o l o g i e s 社製

) 10 μ L に pPB1-hmAG1-FKBP12 変異体 100 ng を希釈し、ターボフェクトトランスフェクション試薬 (Turbofect、Thermo Scientific 社製) を 0.4 μ L 添加した後、攪拌した。そして、それを更に培養液 100 μ L と混合した後、HEK293 細胞に添加し、20 時間培養した。

[0141] <細胞の観察>

前記遺伝子導入処理を施した HEK293 細胞を、IX-71 倒立顕微鏡 (オリンパス社製、対物レンズの倍率: 20 倍)、U-MGFPHQ フィルター (オリンパス社製) 及び ORCA-ER デジタルカメラ (浜松ホトニクス社製) を用いて観察した。FKBP12 変異体のホモ 2 量体形成は、500 nM B/B ホモダイメリザー (AP20187、B/B Homodimerizer、タカラバイオ社製) を培地に添加して誘導した。また、薬剤添加後、継時的に画像を取得した。得られた結果を図 9 に示す。

[0142] 図 9 に示した結果から明らかな通り、薬剤添加前は蛍光輝点が検出されず、蛍光シグナルは細胞質に分散して観察された (図 9 左側の画像参照)。その後、薬剤添加 38 分後には複数の細胞にて蛍光輝点が観察されるようになり (図 9 真ん中の画像参照)、さらに観察を続けると、76 分後には明瞭な蛍光輝点を示す多数の細胞を観察することができた (図 9 右側の画像参照)。したがって、本検証結果により、図 1 又は 2 に示す、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質からなるタンパク質タグを利用した系を用いることにより、ホモ 2 量体形成の判定、ひいてはタンパク質間相互作用を判定できることが明らかになった。さらに、図 9 に示す通り、本発明によれば、FKBP12 変異体のホモ 2 量体形成を、その固有な細胞内環境であるところの細胞質内にて判定できることも明らかになった。

[0143] (比較例 1)

本発明者らは、タンパク質間相互作用を判定する別の系、すなわち第 1 のタンパク質及び会合誘導タンパク質を含む第 1 の融合タンパク質と、第 2 のタンパク質及び多量化能を有する蛍光タンパク質を含む第 2 の融合タンパク

質とを細胞内に発現させ、第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出することにより、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する系を発明している（特許文献4 参照）。

[0144] そこで、当該系を用い、前述のFKBP12タンパク質変異体のホモ2量体形成を判定し、前述の実施例1に記載の結果と比較することで、本発明の有効性を評価することにした。以下に特許文献4に記載の検出系を構築するための材料及び方法を示す。

[0145] <pPB1-FKBP12変異体及びpHAG-FKBP12変異体の作製>

特許文献4に記載の検出系において、前記会合誘導タンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインを選択し、また多量化能を有する蛍光タンパク質としてAGを選択し、コドンを一括化したAGをコードするDNA（hAG）を用いた。

[0146] そして、p62タンパク質のPB1ドメインのC末にFKBP12変異体を融合してなる融合タンパク質をコードする発現ベクター（pPB1-FKBP12変異体）を以下の通りに作製した。すなわち、FKBP12変異体をコードするヌクレオチド配列からなるDNA（配列番号：32に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA）の両端に、制限酵素サイトを配した配列番号：31に記載のヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成した。そして、得られた合成DNAをEcoRI及びXhoIにて切断し、同じ制限酵素に組み合わせにて処理したpAsh-MCLinker（株式会社医学生物学研究所製）に挿入することにより、pPB1-FKBP12変異体を構築した。

[0147] また、AGタンパク質のC末にFKBP12変異体を融合してなる融合タンパク質をコードする発現ベクター（pHAG-FKBP12変異体）を、前記同様の方法にて、pHAG-MCLinker（株式会社医学生物学研究所製）にFKBP12変異体をコードする合成DNAを挿入することによ

り構築した。

[0148] また、このようにして構築した発現ベクターを各100ngずつ混合、計200ng混合し、実施例1に記載の＜細胞培養と遺伝子導入＞及び＜細胞の観察＞と同様の方法にて、薬剤添加前後の細胞内における蛍光輝点を検出した。得られた結果を図10に示す。

[0149] 図10に示す通り、特許文献4に記載の方法によってもFKBP12タンパク質変異体のホモ2量体形成を示す蛍光輝点を検出できることが確認された。しかしながら、当該方法においては、薬剤添加後66分の時点であっても、僅かな細胞において蛍光輝点が形成されるに留まっていた。したがって、本発明の方法は、国際公開第2013/084950号に記載の方法よりも、少なくともホモ2量体形成判定の効率の上では優れていることが明らかになった。

[0150] (実施例2)

次に、本発明の方法により、ホモ2量体の可逆的な形成を判定できるかどうか、すなわち一度形成された蛍光輝点がホモ2量体の解消に応じて消失するかどうかを検証した。

[0151] 前述のB/Bホモダイメリザー(AP20187)により誘導され、形成されるFKBP12タンパク質変異体のホモ2量体は、B/Bウォッシュアウトリガンド(B/B Washout Ligand、タカラバイオ社製)によって解消されることが知られている。そこで、以下に示す材料及び方法にて、前記検証を行った。

[0152] ＜PB1-hmAG1-FKBP12変異体を恒常的に発現する細胞の作製＞

前記pPB1-hmAG1-FKBP12変異体をHEK293細胞に導入し、本発明にかかる融合タンパク質(PB1-hmAG1-FKBP12変異体)を恒常的に発現する細胞を作製した。すなわち、前記発現ベクター導入の前日に、HEK293細胞を35mmディッシュ(BD Falcon社製)に播種し、1.5mLの前記培養液にて培養した。そして、Opt

iMEM (Life Technologies社製) 100 μ LにpPB1-hmAG1-FKBP12変異体1 μ gを希釈し、ポリフェクト (登録商標) トランスフェクション試薬 (QIAGEN社製) を10 μ Lを添加した後、攪拌した。次いで、更に培養液600 μ Lと混合した後、HEK293細胞に添加し、20時間培養した。その後、500 μ g/mLの濃度となるようにG418を添加し、さらに1週間培養した。次いで、生存した細胞をトリプシン溶液で剥離し、0.5個/ウェルとなるようにG418 (500 μ g/mL) を含む培養液にて希釈した後、96ウェルプレートにて培養した。そして、単一コロニーを形成した細胞を拡大培養した。

[0153] <細胞の観察>

前記にて樹立した、PB1-hmAG1-FKBP12変異体を恒常的に発現する細胞を実施例1に記載の方法と同様の方法にて観察した。また、定常状態にて蛍光輝点が無いことを確認した後、500 nM B/Bホモダイメリザーを培養液に加え、150分間、継時的に細胞を撮影した。なお、この観察において、前記実施例1同様に、FKBP12変異体のホモ2量体形成を示す蛍光輝点の発生が確認された。次に、B/Bホモダイメリザーを含む培養液を、通常培養に用いる培養液に置換することにより細胞を洗浄した。その後、500 nM B/Bウオッシュアウトリガンドを添加し、100分間、継時的に画像を取得した。得られた結果を図11に示す。

[0154] <画像解析>

前記方法により継時的に撮影した画像を、icy画像解析プログラム (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) のスポット検出 (spot detector) を用いて解析した。また、各画像にて、操作時間 (分) をX軸とし、蛍光輝点の領域を線で囲い、その囲みの中の蛍光強度を合計した数値をY軸とし、グラフに示した。なお、spot detectorによる解析は、各パラメーター (各処理経路) を以下のようにセッティングして行った。

プレプロセッシング (Pre Processing) : 無し、

検出 (Detector) : 冗長ウェーブレット変換による検出 (UDWT Wavelet Detector)、暗背景よりも明るい輝点を検出する (Detect bright spot over dark background)、

測定可能なスケール (Scale enabled) : スケール 3、閾値 50。

得られた結果を図12に示す。

[0155] 図11に示した結果から明らかな通り、実施例1に示した結果同様に、薬剤添加前は蛍光輝点が検出されず、蛍光シグナルは細胞質に分散して観察された(図11 左側の画像参照)。その後、B/Bホモダイメリザーを添加してから90分後には複数の細胞にて明瞭な蛍光輝点が観察された(図11 真ん中の画像参照)。

[0156] そして、B/Bウオッシュアウトリガンドを添加した結果、大部分の蛍光輝点は消失することが明らかになった(図11 右側の画像参照)。また、図12に示したグラフから、蛍光輝点は段階的に形成し、消失することが見て取れたことから、本発明によって、該蛍光輝点の発生、消失を指標として、各薬剤添加に応じたタンパク質間相互作用の継時的な変化を捉えることができることが明らかになった。さらに、図11に示す通り、本発明によれば、FKBP12変異体のホモ2量体の形成及び消失を、その固有な細胞内環境であるところの細胞質内にて判定できることも明らかになった。また、B/Bホモダイメリザーを添加した直後で、顕微鏡観察下で蛍光輝点の発生を確認し始めた際の蛍光強度の値は、添加前のその値の1.9倍であったことから、陰性対照(例えば、タンパク質間相互作用が生じる前の細胞)における蛍光強度の少なくとも2倍の値が検出できれば、タンパク質間相互作用を示す蛍光輝点が発生したと判定できることが明らかになった。

[0157] 以上の通り、本発明によれば、検出される蛍光輝点の発生、消失を指標としてタンパク質間相互作用における可逆的な変化を判定することができることも明らかになった。また、時間経過に従い、段階的に蛍光輝点が増加又は

減少していく事から、本発明によりタンパク質間相互作用を定量的に分析することもできることが明らかになった。さらに、本発明にかかる融合タンパク質を細胞に導入し、該融合タンパク質を恒常的に発現する細胞を作製できたことから、前記融合タンパク質に含まれるタンパク質タグは細胞毒性等を示さない事が確認された。

[0158] (実施例3)

本発明により、ホモ多量体形成も判定できるかどうかを以下に示す材料及び方法にて検証した。なお、この検証は、p53タンパク質のホモ多量体形成を対象として行った（当該ホモ多量体形成については、Yokoi Itahanaら、J Biol Chem.、2009年、284巻、8号、5158～5164ページ 参照のこと）。

[0159] <p h m A G 1 - P B 1 - p 5 3 及び p h m A G 1 - p 5 3 の作製>

p53をコードするヌクレオチド配列（NCBI RefSeq アクセッション番号：NP_000537に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするヌクレオチド配列）の5'末端及び3'末端に、各々BamHI認識配列及び終止コドンとNotI認識配列が付加してなるヌクレオチド配列を設計した。そして、当該ヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成し、BamHIとNotIとで切断した後、同じ制限酵素の組み合わせにて処理した、p h m A G 1 - P B 1 - M C L i n k e r 及び p h m A G 1 - M C L i n k e r（A m a l g a a m 有限会社製）に挿入することにより、p h m A G 1 - P B 1 - p 5 3 及び p h m A G 1 - p 5 3 を作製した。

[0160] <p p 5 3 - h m A G 1 - P B 1 及び p p 5 3 - h m A G 1 の作製>

p53タンパク質のN末にタンパク質タグを有する融合タンパク質をコードする前記発現ベクターの他、C末にタンパク質タグを有する融合タンパク質をコードする発現ベクターも、以下に示す方法にて作製した。

[0161] すなわち、p53をコードする前記合成DNAから終止コドンを除いた合成DNAをBamHIとNotIとで切断した後、同じ制限酵素の組み合わせにて処理した、p h m A G 1 - P B 1 - M N L i n k e r 及び p h m A G

1-MNLinker (Amalgam有限会社製) に挿入することにより、pp53-hmAG1-PB1及びpp53-hmAG1を作製した。

[0162] <細胞培養と遺伝子導入>

前記にて作製した発現ベクターを導入する細胞としてU2OS細胞を選択し、先ず、この細胞を10% FBS (EQUITECH社製) 及び1% ペニシリン・ストレプトマイシン (Life technology社製) を添加したDMEM (高グルコース、SIGMA ALDRICH社製) にて培養した。そして、前記発現ベクター導入の前日に、これら細胞を35mm ディッシュ (BD Falcon社製) に播種し、1.5mlの培養液にて培養した。次いで、OptiMEM (Life Technologies社製) 100 μ Lにて、発現ベクター (phmAG1-PB1-p53、phmAG1-p53、pp53-hmAG1-PB1又はpp53-hmAG1) 1 μ gを希釈し、ポリフェクト (登録商標) トランスフェクション試薬 (QIAGEN社製) を10 μ L添加した後、攪拌した。更に培養液600 μ Lと混合した後、各発現ベクター混合溶液を培養細胞に添加し、さらに20時間培養した。

[0163] <細胞の観察>

前記にて、各遺伝子導入を行った細胞を、ヘキスト33342 (Dojindo社製) を1 μ g/mlとなるように希釈したハンクス平衡塩液 (Hanks' Balanced Salt Solutions、Life Technologies社製) 及び20mM HEPES (同仁化学社製) からなるpH7.4緩衝液中にて観察した。得られた結果を、図13及び14に示す。なお、図13及び14に示した顕微鏡写真は、対物レンズの倍率を40倍にして観察した結果である。

[0164] 図13に示した結果から明らかな通り、mAG1-PB1-p53融合タンパク質を発現する細胞及びp53-mAG1-PB1融合タンパク質を発現する細胞、すなわち本発明にかかる融合タンパク質を発現させた細胞にて、明瞭な蛍光輝点の形成が確認された。

[0165] 一方、図14に示す通り、mAG1-p53融合タンパク質を発現する細胞及びp53-mAG1融合タンパク質を発現する細胞においては、蛍光輝点は観察されず、蛍光シグナルは分散した状態にて観察された。

[0166] したがって、本発明によれば、ホモ2量体形成のみならず、ホモ多量体形成も判定することが可能であることが明らかになった。さらに、図13に示す通り、本発明によれば、核内及び細胞質内において生じるp53のホモ多量体形成を、一様な蛍光輝点の形成を通して、細胞内で偏りなく判定できることも明らかになった。また、本発明にかかるタンパク質タグを、解析対象タンパク質のN末及びC末のいずれに融合しても機能する事も確認された。

[0167] (実施例4)

上述のホモ多量体形成のみならず、ヘテロ多量体形成の判定においても、図1に示す系は有効であることを確認した。なお、この検証において検出対象としたのは、p53タンパク質とMDM2タンパク質との相互作用であり、また該相互作用の阻害剤として知られているNutlin-3（ヌトリン-3）も本確認実験において用いた（Vassilev LT ら、Science、2004年2月6日、303号、5659巻、844～848ページ 参照）。さらに、本確認実験において、前記多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインを用い、また蛍光タンパク質としてmAG1タンパク質を用いた。

[0168] <pPB1-p53(70)の作製>

p62タンパク質のPB1ドメインをN末に融合させたp53の部分ペプチド（PB1-p53(70)）を、第2の融合タンパク質として細胞において発現させるべく、以下の通りにして、pPB1-p53(70)ベクターを調製した。

[0169] pPB1-p53(70)の作製においては、先ずp53の一部（p53タンパク質の1～70アミノ酸からなる領域（p53(70)）、配列番号：34に記載のアミノ酸配列からなる領域）をコードするDNAの5'末端にBamHI認識配列が付加しており、当該DNAの3'末端に終止コドン

及びNot I 認識配列が付加してあるヌクレオチド配列を設計した。そして、当該ヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成し、BamHIとNot I とで切断した後、同じ制限酵素の組合せにて処理したpAsh-MCLinkerに挿入することにより作製した。

[0170] <pPB1-hmAG1-MDM2の作製>

p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1をN末に融合させたMDM2 (PB1-mAG1-MDM2) を、第1の融合タンパク質として細胞において発現させるべく、以下の通りにして、pPB1-hmAG1-MDM2ベクターを調製した。

[0171] pPB1-MDM2をBamHIとNot I とで切断した後、同じ制限酵素の組合せにて処理したpPB1-hmAG1-MCLinkerに挿入することにより作製した

なお、pPB1-MDM2は、p62タンパク質のPB1ドメインをN末に融合させたMDM2タンパク質 (PB1-MDM2) を、第2の融合タンパク質として発現させるためのプラスミドベクターであり、その調製方法等については後述の実施例13を参照のこと。

[0172] <pp53(70)-hmAG1-PB1の作製>

p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1をC末に融合させたp53の部分ペプチド (p53(70)-mAG1-PB1) を、第1の融合タンパク質として細胞において発現させるべく、以下の通りにして、pp53(70)-hmAG1-PB1ベクターを調製した。

[0173] pp53(70)-hmAG1-PB1の作製においては、先ず前記p53(70)をコードするDNAの5'末端及び3'末端にBamHI認識配列及びNot I 認識配列を各々付加したヌクレオチド配列を設計した。そして、当該ヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成し、BamHIとNot I とで切断した後、同じ制限酵素の組合せにて処理したphmAG1-PB1-MNLinkerに挿入することにより作製した。

[0174] <細胞培養と遺伝子導入>

下記（Ａ）又は（Ｂ）に記載の組み合わせにて、融合タンパク質を細胞内に発現させるべく、これら融合タンパク質をコードする前記ベクターを、以下に示す方法にてＨＥＫ２９３細胞に導入した。

（Ａ）ＰＢ１－ｐ５３（７０）及びＰＢ１－ｍＡＧ１－ＭＤＭ２

（Ｂ）ｐ５３（７０）－ｍＡＧ１－ＰＢ１及びＰＢ１－ＭＤＭ２。

[0175] 先ずＨＥＫ２９３細胞を培養液（ＤＭＥＭ 高グルコース（ＳＩＧＭＡ ＡＬＤＲＩＣＨ社製）、１０％ ＦＢＳ（ＥＱＵＩＴＥＣＨ社製）、１％ ペニシリン・ストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製））にて培養した。同細胞を遺伝子導入前日に８ウェルチャンバースライド（Ｎｕｎｃ社製）に播種し、１ウェルあたり、２００μＬの培養液で培養した。ＯｐｔｉＭＥＭ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）１０μＬに各ベクター１００ｎｇを混合したＤＮＡ溶液を希釈し、Ｆｕｇｅｎｅ ＨＤ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を０．８μｌ添加した後、攪拌した。さらに培養液１００μｌと混合した後、培養細胞に添加し、２０時間培養した。

[0176] ＜細胞の観察＞

遺伝子導入処理を施したＨＥＫ２９３細胞を、１×８１倒立顕微鏡、Ｕ－ＭＮＩＢＡ３フィルター（オリンパス社製）、ＯＲＣＡ－Ｆｌａｓｈ ４．０デジタルカメラ（浜松ホトニクス社製）を用いて観察した。ｐ５３とＭＤＭ２とのタンパク質間相互作用の阻害剤として、ヌトリン－３を最終濃度４０μＭになるよう培養液に添加した。当該薬剤を添加した後、室温で３０分間静置し、細胞を観察した。ヌトリン－３の添加前と添加してから３０分後の画像を図１５及び１６に示す。

[0177] 図１５及び１６に示した結果から明らかな通り、ＰＢ１－ｐ５３（７０）及びＰＢ１－ｍＡＧ１－ＭＤＭ２を発現する細胞、並びにｐ５３（７０）－ｍＡＧ１－ＰＢ１及びＰＢ１－ＭＤＭ２を発現する細胞において、明確な蛍光輝点が観察された。さらに、これら蛍光輝点はヌトリン－３の添加によって解消され、蛍光シグナルが分散したことから明らかな通り、当該蛍光輝点は、ｐ５３タンパク質とＭＤＭ２タンパク質とのタンパク質間相互作用に依

存して形成されたことが確認された。

[0178] したがって、本発明によれば、ホモ多量体形成のみならず、ヘテロ多量体形成も判定できることが確認された。実施例3においても実証した通り、本発明にかかるタンパク質タグを、解析対象タンパク質のN末及びC末のいずれに融合しても機能する事も、実施例4において確認された。

[0179] (実施例5)

タンパク質間相互作用の判定における、図1に示す系の有効性について、以下に示す方法にて確認した。なお、この検証において検出対象としたのは、mTORタンパク質のFRBドメイン（以下「mTOR (FRB domain)」とも称する）とFKBP12タンパク質とであり、これらタンパク質は、ラパマイシン (rapamycin) の存在下において相互作用することが知られている (Chen J ら、Proc Natl Acad Sci U S A.、1995年5月23日、92巻11号、4947～4951ページ 参照)。また、本確認実験においても、実施例5同様に、前記多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインを用い、また蛍光タンパク質としてmAG1タンパク質を用いた。

[0180] <pPB1-hmAG1-FKBP12の作製>

FKBP12タンパク質のN末に、p62タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1タンパク質が融合しているタンパク質 (PB1-mAG1-FKBP12) を発現させるためのベクター (pPB1-hmAG1-FKBP12) を構築するに際して、先ずpPB1-FKBP12ベクターを以下のようにして作製した。

[0181] FKBP12タンパク質 (NCBI RefSeq アクセッション番号: NP_463460.1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードするヌクレオチド配列の両端に、制限酵素 (EcoRI 及び XhoI) 認識サイトと終止コドン配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをEcoRI 及び XhoI にて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理したpAsh-MCLinkerに挿入することにより、PB1-

FKBP12をコードする発現ベクター（pPB1-FKBP12）を構築した。

[0182] 次に、pPB1-FKBP12をBamHIとNotIとで切断した後、同じ制限酵素の組合せにて処理したpPB1-hmAG1-MCLinkerに挿入することにより、pPB1-hmAG1-FKBP12を作製した。

[0183] <p mTOR (FRB domain) -PB1の作製>

mTORタンパク質のFRBドメインのC末に、p62タンパク質のPB1ドメインが融合しているタンパク質（mTOR (FRB domain) -PB1）を発現させるためのベクター（p mTOR (FRB domain) -PB1）を、以下の通りにして調製した。 mTORタンパク質の一部（mTORタンパク質の2025～2114位のアミノ酸からなる領域、配列番号：41に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド）をコードするヌクレオチド配列の両端に、EcoRI及びXhoIの認識サイトを各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをEcoRI及びXhoIにて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理したpAsh-MNLinkerに挿入することにより、mTOR (FRB domain) -PB1をコードする発現ベクター（p mTOR (FRB domain) -PB1）を作製した。

[0184] <細胞培養と遺伝子導入>

下記（C）に記載の組み合わせにて、融合タンパク質を細胞内に発現させるべく、これら融合タンパク質をコードする前記ベクターを、実施例4に記載の方法と同様の方法にてHEK293細胞に導入した。

（C）PB1-mAG1-FKBP12及びmTOR (FRB domain) -PB1

<細胞の観察>

遺伝子導入処理を施したHEK293細胞を、実施例4に記載の方法と同様の方法にて観察した。また、mTOR (FRB domain) とFKB

P 1 2 とのタンパク質間相互作用の誘導剤として、ラパマイシンを最終濃度 5 0 0 n M になるよう培養液に添加した。当該薬剤を添加した後、室温で 3 0 分間静置し、細胞を観察した。各薬剤の添加前と添加してから 3 0 分後の画像を図 1 7 に示す。

[0185] 図 1 7 に示した結果から明らかな通り、P B 1 - m A G 1 - F K B P 1 2 及び m T O R (F R B d o m a i n) - P B 1 を発現する細胞において、ラパマイシンを添加する前は、蛍光輝点が観察されなかった。しかし、ラパマイシンを添加してから 3 0 分後には、蛍光輝点が観察された。このように、ラパマイシン依存的に蛍光輝点が形成されたことから、これらの蛍光輝点は F K B P 1 2 と m T O R (F R B d o m a i n) とのタンパク質間相互作用に依存して形成されたことが確認された。

[0186] したがって、実施例 4 においても実証した通り、本発明によれば、実施例 1 ~ 3 において示したようなホモ多量体形成に限らず、異なるタンパク質間の相互作用も検出できることが確認された。

[0187] (実施例 6)

タンパク質間相互作用の判定における、図 2 に示す系の有効性について以下に示す方法にて確認した。なお、この検証において検出対象としたのは、p 5 3 タンパク質と M D M 2 タンパク質との相互作用であり、また該相互作用の阻害剤として知られているヌトリン-3 も本確認実験において用いた。さらに、本確認実験において、前記多量化能を有するタンパク質として p 6 2 タンパク質の P B 1 ドメインを用いた。また蛍光タンパク質として m A G 1 タンパク質を用い、当該蛍光タンパク質を、p 5 3 タンパク質及び M D M 2 タンパク質双方に直接又は間接的に結合させてなる融合タンパク質を用いた。

[0188] < p P B 1 h m A G 1 - M N L i n k e r の作製 >

P B 1 p 6 2 タンパク質の P B 1 ドメインの C 末に m A G 融合させてなるタンパク質をコードする D N A 断片の両端に、N h e I 及び A g e I の認識サイトを各々配した D N A (配列番号：27 に記載のヌクレオチド配列から

なるDNA)を人工合成した。当該DNAをNheI及びAgeIで切断し、PB1p62タンパク質のPB1ドメインをコードするDNAを除いたpAsh-MNLinkerに挿入することにより、pPB1hmAG1-MNLinkerプラスミドベクターを調製した。

[0189] <p p 5 3 (7 0) - P B 1 - h m A G 1 の作製>

p 6 2 タンパク質のPB1ドメイン及びmAG1をC末に融合させたp 5 3 の部分ペプチド (p 5 3 (7 0) - P B 1 - m A G 1) を、第1の融合タンパク質として細胞において発現させるべく、以下の通りにして、p p 5 3 (7 0) - P B 1 - h m A G 1 ベクターを調製した。

[0190] p p 5 3 (7 0) - P B 1 - h m A G 1 の作製においては、先ずp 5 3 (7 0) をコードするDNAの5'末端及び3'末端に、BamHI認識配列及びNotI認識配列をそれぞれ付加したヌクレオチド配列を設計した。そして、当該ヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成し、BamHIとNotIとで切断した後、同じ制限酵素の組合せにて処理したpPB1-hmAG1-MNLinkerに挿入することにより作製した。

[0191] <細胞培養と遺伝子導入>

下記(A)又は(B)に記載の組み合わせにて、融合タンパク質を細胞内に発現させるべく、これら融合タンパク質をコードする前記ベクターを、実施例5に記載の方法と同様の方法にてHEK293細胞に導入した。

(A) p 5 3 (7 0) - m A G 1 - P B 1 及び P B 1 - m A G 1 - M D M 2

(B) p 5 3 (7 0) - P B 1 - m A G 1 及び P B 1 - m A G 1 - M D M 2

。

[0192] <細胞の観察>

遺伝子導入処理を施したHEK293細胞を、実施例4に記載の方法と同様の方法にて観察した。すなわち、p 5 3 とMDM2とのタンパク質間相互作用の阻害剤として、ヌトリン-3を最終濃度40 μ Mになるよう培養液に添加した。当該薬剤を添加した後、室温で30分間静置し、細胞を観察した。ヌトリン-3の添加前と添加してから30分後の画像を図18及び19に

示す。

[0193] 図18及び19に示した結果から明らかな通り、いずれの細胞においても明確な蛍光輝点が観察された。さらに、これら蛍光輝点はヌトリン-3の添加によって解消され、蛍光シグナルが分散したことから明らかな通り、当該蛍光輝点は、p53タンパク質とMDM2タンパク質とのタンパク質間相互作用に依存して形成されたことが確認された。また、p53(70)に直接融合するタンパク質をmAG1としても(前記(A)の場合)、PB1ドメインとしても(前記(B)の場合)、本発明の方法においては変わることなく、タンパク質間相互作用を判定できることも確認された。

[0194] (実施例7)

タンパク質間相互作用の判定における、図2に示す系の有効性について、以下に示す方法にて確認した。なお、この検証において検出対象としたのは、mTOR(FRB domain)とFKBP12タンパク質とのタンパク質間相互作用であり、また当該相互作用を誘導するラパマイシンも本系において用いた。また、本確認実験においても、実施例7同様に、前記多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインを用い、また蛍光タンパク質としてmAG1タンパク質を用いた。

[0195] <p mTOR(FRB domain)-h mAG1-PB1の作製>

mTORタンパク質のFRBドメインのC末に、mAG1及びp62タンパク質のPB1ドメインが融合しているタンパク質(mTOR(FRB domain)-mAG1-PB1)を発現させるためのベクター(p mTOR(FRB domain)-h mAG1-PB1)を、以下の通りにして調製した。

[0196] p mTOR(FRB domain)-PB1をBamHIとNotIとで切断し、mTOR(FRB domain)断片を精製した。次いで、当該断片を、同じ制限酵素の組合せにて処理したp h mAG1-PB1-MN Linkerに挿入することにより、p mTOR(FRB domain)-h mAG1-PB1を作製した。

[0197] <細胞培養と遺伝子導入>

下記 (C) に記載の組み合わせにて、融合タンパク質を細胞内に発現させるべく、これら融合タンパク質をコードする前記ベクターを、実施例 5 に記載の方法と同様の方法にて H E K 2 9 3 細胞に導入した。

(C) m T O R (F R B d o m a i n) - m A G 1 - P B 1 及び P B 1 - m A G 1 - F K B P 1 2。

[0198] <細胞の観察>

遺伝子導入処理を施した H E K 2 9 3 細胞を、実施例 5 に記載の方法と同様の方法にて観察した。すなわち、m T O R (F R B d o m a i n) と F K B P 1 2 とのタンパク質間相互作用の誘導剤として、ラパマイシンを最終濃度 5 0 0 n M になるよう培養液に添加した。当該薬剤を添加した後、室温で 3 0 分間静置し、細胞を観察した。各薬剤の添加前と添加してから 3 0 分後の画像を図 2 0 及び 2 1 に示す。

[0199] 図 2 0 及び 2 1 に示した結果から明らかな通り、m T O R (F R B d o m a i n) - m A G 1 - P B 1 及び P B 1 - m A G 1 - F K B P 1 2 を発現する細胞において、ラパマイシンを添加する前は、蛍光輝点が観察されなかった。しかし、ラパマイシンを添加してから 3 0 分後には、蛍光輝点が観察された。このように、ラパマイシン依存的に蛍光輝点が形成されたことから、これらの蛍光輝点は F K B P 1 2 と m T O R (F R B d o m a i n) とのタンパク質間相互作用に依存して形成されたことが確認された。

[0200] 実施例 1 ～ 3 においても実証した通り、図 2 に示す第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質との会合体形成により生じる蛍光輝点を検出する系の有効性が、実施例 6 及び 7 においても確認された。特に、本発明によれば、実施例 1 ～ 3 において示したようなホモ多量体形成に限らず、異なるタンパク質間の相互作用も図 2 に示す系においても判定できることが確認された。

[0201] (実施例 8)

実施例 1 における蛍光タンパク質を m A G 1 から D G 1 又は m C h e r r

yに変更し、以下に示す方法にて、本発明において用いる蛍光タンパク質は mAG1 に限定されないことを確認した。

[0202] <pPB1-hDG1-FKBP12 変異体の作製>

FKBP12 変異体のN末に、p62タンパク質のPB1ドメイン及びDronpa-Green1 蛍光タンパク質が融合しているタンパク質 (PB1-DG1-FKBP12 変異体) を発現させるためのベクター (pPB1-hDG1-FKBP12 変異体) を、以下の通りにして調製した。

[0203] DG1 (GenBank アクセション番号: BAD72874 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードし、5' 末端に SpeI 認識配列と、3' 末端に AgeI 認識配列とを有する DNA 配列を人工合成した。次いで、得られた DNA をこれら制限酵素にて切断し、同じ制限酵素の組合せにて処理し、hmAG1 部分を除いた pPB1-hmAG1-FKBP12 変異体に挿入することにより、pPB1-hDG1-FKBP12 変異体を作製した。

[0204] <pPB1-mCherry-FKBP12 変異体の作製>

FKBP12 変異体のN末に、p62タンパク質のPB1ドメイン及びmCherry 蛍光タンパク質が融合しているタンパク質 (PB1-mCherry-FKBP12 変異体) を発現させるためのベクター (pPB1-mCherry-FKBP12 変異体) を、以下の通りにして調製した。

[0205] pPB1-mCherry-FKBP12 の作製においては、先ずmCherry (GenBank アクセション番号: AAV52164 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードする DNA の5' 末端及び3' 末端に、SpeI 認識配及びと AgeI 認識配列に各々付加したヌクレオチド配列を設計した。そして、当該ヌクレオチド配列からなる DNA を人工合成し、SpeI と AgeI とで切断した後、同じ制限酵素の組合せにて処理し、hmAG1 部分を除いた pPB1-hmAG1-FKBP12 変異体に挿入することにより、pPB1-mCherry-FKBP12 変異体を作製した。

[0206] <細胞培養と遺伝子導入>

P B 1 - h D G 1 - F K B P 1 2 変異体又は P B 1 - m C h e r r y - F K B P 1 2 変異体を、細胞内に発現させるべく、これら融合タンパク質をコードする前記ベクターを、実施例 4 に記載の方法と同様の方法にて H E K 2 9 3 細胞に導入した。

[0207] <細胞の観察>

遺伝子導入処理を施した H E K 2 9 3 細胞は I X - 8 1 倒立顕微鏡、O R C A - F l a s h 4. 0 デジタルカメラを用いて観察した。D G 1 及び m C h e r r y の観察には、それぞれ U - M N I B A 3 フィルター（オリンパス社製）及び U - M W I G 3 フィルター（オリンパス社製）を用いた。F K B P 1 2 変異体のホモ 2 量体の形成は、5 0 0 n M B / B ホモダイメリザーを加えて誘導した。当該薬剤を添加してから室温で静置し、添加してから 1、2 及び 3 時間経過後に細胞を観察した。薬剤の添加前と添加してから 1、2 及び 3 時間後の画像を、図 2 2 及び 2 3 に示す。

[0208] 図 2 2 及び 2 3 に示した結果から明らかなように、P B 1 - D G 1 - F K B P 1 2 変異体を発現する細胞及び P B 1 - m C h e r r y - F K B P 1 2 変異体を発現する細胞の双方において、薬剤添加依存的な蛍光輝点の増加が観察された。したがって、本発明に用いる蛍光タンパク質は m A G 1 に限られないことが確認された。

[0209] （実施例 9）

本発明において、多量化能を有するタンパク質として、p 6 2 タンパク質の P B 1 ドメイン以外のタンパク質も利用できることを確認した。すなわち、実施例 1 に記載の方法において、当該 P B 1 ドメインの代わりに、T a n k y r a s e 1 タンパク質の S A M ドメインを用いて、F K B P 1 2 タンパク質変異体のホモ 2 量体形成の検出を、以下に示す材料及び方法にて行った。

[0210] <p T a n k y r a s e - h m A G 1 - F K B P 1 2 変異体の作製>

F K B P 1 2 変異体の N 末に、T a n k y r a s e 1 タンパク質の S A M

ドメイン及びmAG1が融合しているタンパク質（Tankyrase-mAG1-FKBP12変異体）を発現させるためのベクター（pTankyrase-hmAG1-FKBP12変異体）を、以下の通りにして調製した。

[0211] Tankyrase1タンパク質のSAMドメインのC末にmAG1が融合してなるタンパク質（Tankyrase-mAG1、配列番号：43に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質）をコードし、5'末端にNheI認識配列、3'末端にAgeI認識配列を有するDNA配列を人工合成し、NheI及びAgeIにて切断した。その後、同制限酵素にて処理し、PB1-hmAG1部分を除いたpPB1-hmAG1-FKBP12変異体に挿入することにより、pTankyrase-hmAG1-FKBP12変異体ベクターを作製した。

[0212] <細胞培養と遺伝子導入>

HEK293細胞を、10% FBS及び1% ペニシリン・ストレptomycinを添加したDMEM（高グルコース）にて培養した。そして、遺伝子導入前日に8ウェルチャンバースライドに播種した。1ウェルあたり、200 μ Lの培養液で培養した。次いで、OptiMEM 10 μ Lにプラスミドを200ng混合したDNA溶液を調製し、Fugene HD（Promega社製）を0.8 μ L添加した後、攪拌した。それを更に培養液100 μ Lと混合した後、HEK293細胞に添加し、20時間培養した。

[0213] <細胞の観察>

遺伝子導入処理を施したHEK293細胞はIX-81倒立顕微鏡及びORCA-Flash 4.0デジタルカメラを用いて観察した。観察には、U-MNIBA3フィルターを用いた。FKBP12変異体のホモ2量体形成は、500nM B/Bホモダイメリザーを培地に添加し、誘導した。また、薬剤添加後、室温にて静置し、3時間経過後に細胞を観察した。薬剤の添加前と添加3時間後とに得られた画像を図24に示す。

[0214] 図24に示した結果から明らかな通り、Tankyrase-mAG1-

F K B P 1 2 変異体を発現する細胞において、この変異体のホモ 2 量体形成を誘導する薬剤の添加に応じ、蛍光輝点の発生が観察された。したがって、本発明において、多量体を形成できるタンパク質であれば利用できることが確認された。

[0215] (実施例 10)

実施例 9 同様に、本発明において、多量化能を有するタンパク質として、p 6 2 タンパク質の P B 1 ドメイン以外のタンパク質も利用できることを確認した。すなわち、実施例 3 に記載の方法において、当該 P B 1 ドメインの代わりに、T a n k y r a s e 1 タンパク質の S A M ドメイン、P K C i o t a タンパク質の P B 1 ドメイン、T E L タンパク質の S A M ドメイン又は D G K d e l t a タンパク質の S A M ドメインを用いて、p 5 3 タンパク質のホモ多量体形成の検出を、以下に示す材料及び方法にて行った。

[0216] <p T a n k y r a s e - h m A G 1 - p 5 3 の作製>

p 5 3 の N 末に、T a n k y r a s e 1 タンパク質の S A M ドメイン及び m A G 1 が融合しているタンパク質 (T a n k y r a s e - m A G 1 - p 5 3) を発現させるためのベクター (p T a n k y r a s e - h m A G 1 - p 5 3) を、以下の通りにして調製した。

[0217] T a n k y r a s e 1 タンパク質の S A M ドメインの C 末に m A G 1 が融合してなるタンパク質 (T a n k y r a s e - m A G 1、配列番号：43 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードし、5' 末端に N h e I 認識配列、3' 末端に A g e I 認識配列を有する D N A 配列を人工合成し、N h e I 及び A g e I にて切断した。その後、同制限酵素にて処理し、h m A G 1 P B 1 部分を除いた p h m A G 1 P B 1 - p 5 3 に挿入することにより、p T a n k y r a s e - h m A G 1 - p 5 3 ベクターを作製した。

[0218] <p P K C i - h m A G 1 - p 5 3 の作製>

p 5 3 の N 末に、P K C i o t a タンパク質の P B 1 ドメイン及び m A G 1 が融合しているタンパク質 (P K C i - m A G 1 - p 5 3) を発現させるためのベクター (p T a n k y r a s e - h m A G 1 - p 5 3) を、以下の

通りにして調製した。

[0219] PKC i o t a タンパク質の P B 1 ドメインの C 末に m A G 1 が融合してなるタンパク質 (P K C i - m A G 1 、配列番号 : 4 5 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードし、5' 末端に N h e I 認識配列、3' 末端に A g e I 認識配列を有する D N A 配列を人工合成し、N h e I 及び A g e I にて切断した。その後、同制限酵素にて処理し、h m A G 1 - P B 1 部分を除いた p h m A G 1 P B 1 - p 5 3 に挿入することにより、p P K C i - h m A G 1 - p 5 3 ベクターを作製した。

[0220] < p T E L - h m A G 1 - p 5 3 の作製 >

p 5 3 の N 末に、T E L タンパク質の S A M ドメイン及び m A G 1 が融合しているタンパク質 (T E L - m A G 1 - p 5 3) を発現させるためのベクター (p T E L - h m A G 1 - p 5 3) を、以下の通りにして調製した。

[0221] T E L タンパク質の S A M ドメインの C 末に m A G 1 が融合してなるタンパク質 (T E L - m A G 1 、配列番号 : 4 7 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードし、5' 末端に N h e I 認識配列、3' 末端に A g e I 認識配列を有する D N A 配列を人工合成し、N h e I 及び A g e I にて切断した。その後、同制限酵素にて処理し、h m A G 1 - P B 1 部分を除いた p h m A G 1 - P B 1 - p 5 3 に挿入することにより、p T E L - h m A G 1 - p 5 3 ベクターを作製した。

[0222] < p D G K d - h m A G 1 - p 5 3 の作製 >

p 5 3 の N 末に、D G K d e l t a タンパク質の S A M ドメイン及び m A G 1 が融合しているタンパク質 (D G K d - m A G 1 - p 5 3) を発現させるためのベクター (p D G K d - h m A G 1 - p 5 3) を、以下の通りにして調製した。

[0223] D G K d e l t a タンパク質の S A M ドメインの C 末に m A G 1 が融合してなるタンパク質 (D G K d - m A G 1 、配列番号 : 4 9 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードし、5' 末端に N h e I 認識配列、3' 末端に A g e I 認識配列を有する D N A 配列を人工合成し、N h e I 及び A

g e l にて切断した。その後、同制限酵素にて処理し、h m A G 1 - P B 1 部分を除いた p h m A G 1 P B 1 - p 5 3 に挿入することにより、p D G K d - h m A G 1 - p 5 3 ベクターを作製した。

[0224] <細胞培養と遺伝子導入>

H E K 2 9 3 細胞を、10% F B S 及び1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したD M E M (高グルコース)にて培養した。そして、遺伝子導入前日に8ウェルチャンバースライドに播種し、1ウェルあたり、200 μ L の培養液で培養した。次いで、O p t i M E M 10 μ L にプラスミドを200 n g 混合したD N A 溶液を調製し、F u g e n e H D を0.8 μ l 添加した後、攪拌した。それを更に培養液100 μ l と混合した後、H E K 2 9 3 細胞に添加し、48時間培養した。

[0225] <細胞の観察>

遺伝子導入処理を施したH E K 2 9 3 細胞はI X - 8 1 倒立顕微鏡、O R C A - F l a s h 4.0 デジタルカメラを用いて観察した。観察には、U - M N I B A 3 フィルターを用いた。得られた結果を図25に示す。

[0226] 図25に示した結果から明らかな通り、T a n k y r a s e - m A G 1 - p 5 3 を発現する細胞、P K C i - m A G 1 - p 5 3 を発現する細胞、T E L - m A G 1 - p 5 3 を発現する細胞及びD G K d - m A G 1 - p 5 3 を発現する細胞のいずれにおいても、p 5 3 のホモ多量体形成を示す、蛍光輝点の発生が観察された。したがって、本発明において、多量体を形成できるタンパク質であれば利用できることが確認された。

[0227] (実施例11)

本発明によって、シグナル伝達依存的に形成されるホモ2量体を検出できることを、以下に示す方法にて確認した。E G F、G P C R 等が関与するシグナル伝達経路が活性化されると、その下流に位置するE R K 2 がリン酸化され、活性化される。そして当該活性化に伴い、E R K 2 はホモ2量体を形成することが知られている(H a r v e y C D ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、2008年、105巻、49号、19264～

19269ページ、Khokhlatchev AVら、Cell、1998年、93巻、4号、605～615ページ 参照)。そこで、本発明によって当該ホモ2量体形成の検出を試みた。なお、本確認実験において、多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインを用い、また蛍光タンパク質としてmAG1タンパク質を用いた。また、前記ERK2の活性化は、細胞質及び核内にて生じることも明らかになっている(Ebisuya Mら、J Cell Sci.、2005年、118(Pt 14)、2997～3002ページ 参照)。

[0228] <pERK2-hmAG1-PB1及びpERK2-PB1-hmAG1の作製>

ERK2のC末に、mAG1及びp62タンパク質のPB1ドメインを融合しているタンパク質(ERK2-mAG1-PB1及びERK2-PB1-mAG1)を発現させるためのベクター(pERK2-hmAG1-PB1及びpERK2-PB1-hmAG1)を、以下の通りにして調製した。

[0229] ERK2(NCBI RefSeq アクセッション番号: NP_002736.3に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードするヌクレオチド配列の5'末端及び3'末端に、XhoI認識配列及びNotI認識配列が各々付加してなるヌクレオチド配列を設計した。次いで、当該ヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成し、XhoIとNotIとで切断した。また、同じ制限酵素の組み合わせにて、phmAG1-PB1-MNLinker及びpPB1-hmAG1-MNLinkerを処理した。そして、前記合成DNAの断片を、これらベクターに挿入することにより、ERK2-mAG1-PB1及びERK2-PB1-mAG1をコードするベクター(pERK2-hmAG1-PB1及びpERK2-PB1-hmAG1)を作製した。

[0230] <細胞培養と遺伝子導入>

前記にて作製した発現ベクターを導入する細胞としてHEK293細胞を選択し、先ず、この細胞を10% FBS(EQUITECH社製)及び1

% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したDMEM（高グルコース）にて培養した。そして、前記発現ベクター導入の前日に、これら細胞を35 mmディッシュに播種し、1.5 mlの培養液にて培養した。次いで、OptiMEM 100 μ Lにて、発現ベクター（pERK2-hmAG1-PB1又はpERK2-PB1-hmAG1）1 μ gを希釈し、ポリフェクト（登録商標）トランスフェクション試薬を10 μ L添加した後、攪拌した。更に培養液600 μ Lと混合した後、各発現ベクター溶液を培養細胞に添加した。pERK2-hmAG1-PB1導入細胞については、ベクターを導入してから20時間後に観察を行った。pERK2-PB1-hmAG1導入細胞については、500 μ g/mlの濃度となるようにG418を添加し、更に1週間培養した。次いで、生存した細胞をトリプシン溶液で剥離し、0.5個/ウェルとなるようにG418（500 μ g/ml）を含む培養液にて希釈した後、96ウェルプレートにて培養した。そして、単一コロニーを形成した細胞を拡大培養した。

[0231] <細胞の観察>

前記遺伝子導入処理を施したHEK293細胞を、ハンス平衡塩液及び20 mM HEPESからなるpH7.4緩衝液中で4時間培養し、血清飢餓状態とした。その後、IX-71倒立顕微鏡（対物レンズの倍率：20倍）、UMGFPHQフィルター及びORCA-ERデジタルカメラを用いて観察した。ERK2のホモ2量体形成は、EGF（上皮細胞増殖因子、シグマアルドリッチ社製）を最終濃度が50 ng/mlとなるように同緩衝液に添加して誘導した。EGF添加前、及び、添加8分後の画像を、図26及び27に示す。

[0232] 図26に示した結果から明らかな通り、EGF添加前は蛍光輝点が検出されず、蛍光シグナルは細胞質に分散して観察された。その後、EGF添加8分後には複数の細胞にて蛍光輝点が観察された。

[0233] また図27に示した結果から明らかな通り、ERK2-PB1-hmAG1を恒常的に発現するHEK293細胞の全体において、ERK2のホモ2

量体形成を示す蛍光輝点が検出された。

[0234] したがって、本発明によれば、細胞内シグナル伝達経路の活性化に伴う E R K 2 のホモ 2 量体形成を検出できることが確認された。また、蛍光輝点の検出を通して、E R K 2 のリン酸化に伴う活性化、ひいてはその上流である E G F 等が関与するシグナル伝達経路の活性化も、本発明によって検出できることが確認された。

[0235] (実施例 1 2)

本発明によって、シグナル伝達依存的に形成されるホモ 2 量体を検出できることを、以下に示す方法にて確認した。すなわち、I L - 6 等が関与するシグナル伝達経路が活性化されると、その下流に位置する S T A T 3 がリン酸化され、活性化される。そして当該活性化に伴い、S T A T 3 はホモ 2 量体を形成し、細胞外のシグナルが核内に伝達されることが知られている (B e c k e r S ら、N a t u r e、1998 年、394 巻、6689 号、145~151 ページ、J o h n s t o n P A ら、M o l I n t e r v .、2011 年、11 巻、1 号、18~26 ページ 参照)。そこで、本発明によって S T A T 3 のホモ 2 量体形成の検出を試みた。なお、本確認実験において、多量化能を有するタンパク質として p 6 2 タンパク質の P B 1 ドメインを用い、また蛍光タンパク質として m A G 1 タンパク質を用いた。

[0236] <p P B 1 - h m A G 1 - S T A T 3 の作製>

S T A T 3 の N 末に、p 6 2 タンパク質の P B 1 ドメイン及び m A G 1 を融合しているタンパク質 (P B 1 - m A G 1 - S T A T 3) を発現させるためのベクター (p P B 1 - h m A G 1 - S T A T 3) を、以下の通りにして調製した。

[0237] S T A T 3 (N C B I R e f S e q アクセッション番号: N P _ 6 4 4 8 0 5 . 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードするヌクレオチド配列の 5' 末端に X h o I 認識配列を付加し、当該ヌクレオチド配列の 3' 末端に、終止コドン及び N o t I 認識配列が付加してなるヌクレオチド配列を設計した。そして、当該ヌクレオチド配列からなる D N A を人工

合成し、XhoIとNotIとで切断した後、同じ制限酵素の組み合わせにて処理した、pPB1-hmAG1-MCLinkerに挿入することにより、pPB1-hmAG1-STAT3を作製した。

[0238] <細胞培養と遺伝子導入>

前記にて作製した発現ベクターを導入する細胞としてHEK293細胞を選択し、先ず、この細胞を10% FBS及び1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したDMEM（高グルコース）にて培養した。そして、前記発現ベクター導入の前日に、これら細胞を35mmディッシュに播種し、1.5mlの培養液にて培養した。次いで、OptiMEM 100μLにて、発現ベクター（pPB1-hmAG1-STAT3）1μgを希釈し、ポリフェクト（登録商標）トランスフェクション試薬を10μL添加した後、攪拌した。更に培養液600μLと混合した後、各発現ベクター混合溶液を培養細胞に添加した。その後、500μg/mLの濃度となるようにG418を添加し、更に1週間培養した。次いで、生存した細胞をトリプシン溶液で剥離し、0.5個/ウェルとなるようにG418（500μg/mL）を含む培養液にて希釈した後、96ウェルプレートにて培養した。そして、単一コロニーを形成した細胞を拡大培養した。

[0239] <細胞の観察>

前記PB1-mAG1-STAT3を恒常的に発現するHEK293細胞を、ハンクス平衡塩液及び20mM HEPESからなるpH7.4緩衝液中で4時間培養し、血清飢餓状態とした。その後、IX-71倒立顕微鏡（対物レンズの倍率：20倍）、U-MGFPHQフィルター及びORCA-ERデジタルカメラを用いて観察した。STAT3のホモ2量体形成は、ヒトリコンビナントIL-6（R&Dシステムズ社製）を最終濃度が100ng/mLとなるように同緩衝液に添加して誘導した。IL-6添加前、及び、添加50分後の画像を、図28に示す。

[0240] 図28に示した結果から明らかな通り、IL-6添加前は蛍光輝点が検出されず、蛍光シグナルは細胞質に分散して観察された。その後、IL-6添

加50分後には複数の細胞にて蛍光輝点が観察された。

[0241] したがって、本発明によれば、細胞内シグナル伝達経路の活性化に伴うSTAT3のホモ二量体形成を検出できることが確認された。また、蛍光輝点の検出を通して、STAT3のリン酸化に伴う活性化、ひいてはその上流であるIL-6等が関与するシグナル伝達経路の活性化も、本発明によって検出できることが確認された。

[0242] (実施例13)

実施例1～12において示した通り、タンパク質間相互作用の判定において、図1及び2に示す系は有効であることが明らかになった。次に、本発明者は、かかる系の別態様として図3に示す系を構想した。

[0243] すなわち、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第3の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第4の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第5の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、多量化能を有するタンパク質どうしが会合することにより、第3の融合タンパク質及び第5の融合タンパク質が結合し、また第4の融合タンパク質及び第5の融合タンパク質が結合し、図1及び2に示す第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質が該細胞内において発現することが想定される。そして、かかる想定通りであれば、図1及び2に示す系同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることが、図3に示す系においても想定される。

[0244] そこで、以下に示す材料及び方法にて、タンパク質間相互作用の判定における、図3に示す系の有効性について検証した。なお、この検証において検出対象としたのは、p53タンパク質とMDM2タンパク質との相互作用であり、また該相互作用の阻害剤として知られているヌトリン-3 (Nutl

i n - 3) も本検証において用いた (V a s s i l e v L T ら、S c i e n c e、2004年2月6日、303号、5659巻、844~848ページ 参照)。さらに、本検証において、前記多量化能を有するタンパク質としてp62タンパク質のPB1ドメインを用い、また蛍光タンパク質としてh m A G 1タンパク質を用いた。

[0245] <p p 5 3 - P B 1 及び p P B 1 - M D M 2 の作製>

本発明にかかる第3及び第4の融合タンパク質、すなわちp53タンパク質及びp62タンパク質のPB1ドメインを含む融合タンパク質 (p53 - P B 1) と、MDM2タンパク質及びp62タンパク質のPB1ドメインを含む融合タンパク質 (P B 1 - M D M 2) とを、細胞内において発現させるため、以下に示す方法にて各融合タンパク質をコードする発現ベクターを作製した。

[0246] p53タンパク質の一部 (p53タンパク質の1~70位のアミノ酸からなる領域、配列番号: 34に記載のアミノ酸配列からなる領域、以下「p53 (70)」とも称する) をコードするヌクレオチド配列の両端に、制限酵素サイトを配したDNA (配列番号: 33に記載のヌクレオチド配列からなるDNA) を人工合成した。次いで、得られた合成DNAをE c o R I 及びX h o I にて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理したp A s h - M N L i n k e r (株式会社医学生物学研究所製) に挿入することにより、p53 (70) - P B 1 をコードする発現ベクター (p p 5 3 (70) - P B 1) を構築した。なお、p A s h - M N L i n k e r のマルチクローニングサイトに任意のタンパク質をコードするDNAを読み枠を合わせて挿入することにより、該タンパク質のC末にリンカーペプチドを介してA s h タンパク質タグ (p62タンパク質のPB1ドメイン) が融合されたタンパク質を細胞内において発現させることが可能となる。

[0247] また、MDM2の一部 (MDM2タンパク質の1~119位のアミノ酸からなる領域、配列番号: 36に記載のアミノ酸配列からなる領域) をコードするヌクレオチド配列の両端に、制限酵素サイトを配したDNA (配列番号

：35に記載のヌクレオチド配列からなるDNA)を人工合成した。次いで、得られた合成DNAをEcoRI及びXhoIにて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理したpAsh-MCLinker(株式会社医学生物学研究所製)に挿入することにより、PB1-MDM2をコードする発現ベクター(pPB1-MDM2)を構築した。なお、pAsh-MCLinkerのマルチクローニングサイトに任意のタンパク質をコードするDNAを読み枠を合わせて挿入することにより、該タンパク質のN末にリンカーペプチドを介してAshタンパク質タグ(p62タンパク質のPB1ドメイン)が融合されたタンパク質を細胞内において発現させることが可能となる。

[0248] <p h m A G 1 P B 1 の作製>

前記第5の融合タンパク質を細胞内において発現させるため、以下に示す方法にて発現ベクターを作製した。すなわちまず、p62タンパク質のPB1ドメインをコードするヌクレオチド配列からなるDNA(配列番号：38に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA)の両端に、制限酵素サイトを配した配列番号：37に記載のヌクレオチド配列からなるDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをEcoRI及びNotIにて切断し、同じ制限酵素に組み合わせにて処理したp h m A G 1 - M C L i n k e r (A m a l g a a m 有 限 会 社 製)に挿入することにより、mAG1及びp62タンパク質のPB1ドメインからなる融合タンパク質(mAG1-PB1)をコードする発現ベクター(p h m A G 1 - P B 1)を構築した。

[0249] <m A G 1 - P B 1 を恒常的に発現する細胞の作製>

次に、前記にて作製したp h m A G 1 - P B 1をHeLaS3細胞に導入し、本発明にかかる第5の融合タンパク質(mAG1-PB1)を恒常的に発現する細胞を樹立した。すなわち、まず、HeLaS3細胞を、10% FBS(EQUITECH社製)を添加したDMEM(低グルコース、SIGMA ALDRICH社製)にて培養した。そして、遺伝子導入の前日に、HeLaS3細胞を35mmディッシュ(BD Falcon社製)に播

種し、1.5 mLの培養液にて培養した。次いで、OptiMEM (Life Technologies社製) 100 μ Lに、p h m A G 1 - P B 1 1 μ gを希釈し、ポリフェクト (登録商標) トランスフェクション試薬 (Q I A G E N社製) を10 μ L添加した後、攪拌した。更に培養液600 μ Lと混合した後、H e L a S 3細胞に添加し、20時間培養した。その後、500 μ g/mLの濃度となるようにG418を添加し、更に1週間培養した。次いで、生存した細胞をトリプシン溶液で剥離し、0.5個/ウェルとなるようにG418 (500 μ g/mL) を含む培養液にて希釈した後、96ウェルプレートにて培養した。そして、単一コロニーを形成した細胞を拡大培養した。

[0250] <細胞培養と遺伝子導入>

前記細胞にて、恒常的に発現させているm A G 1 - P B 1に加え、p 5 3 (70) - P B 1及びP B 1 - M D M 2を発現させるために、以下に示す方法にてp p 5 3 (70) - P B 1及びp P B 1 - M D M 2を該細胞に導入した。

[0251] すなわち先ず、前記にて樹立したm A G 1 - P B 1を恒常的に発現する細胞を、10% F B S (E Q U I T E C H社) 及び1% ペニシリン・ストレプトマイシン (L i f e t e c h n o l o g y社) を添加したD M E M (高グルコース、S I G M A A L D R I C H社製) にて培養した。次いで、遺伝子導入の前日に、当該細胞を8ウェルチャンバースライド (N u n c社製) に播種し、1ウェルあたり200 μ Lの培養液にて培養した。そして、OptiMEM (Life Technologies社製) 10 μ Lに、p p 5 3 (70) - P B 1及びp P B 1 - M D M 2を100 ngずつ混合して調製したDNA溶液を希釈した。次いで、ターボフェクト (T u r b o f e c t、T h e r m o S c i e n t i f i c社製) を0.4 μ L添加した後、攪拌し、更に培養液100 μ Lと混合した。そして、得られた混合液を前記培養細胞に添加し、20時間培養した。

[0252] また、陰性対照として、p p 5 3 (70) - P B 1及びp A s h - M N L

inkerを100ngずつ混合して調製したDNA溶液、並びにpPB1-MDM及びpAsh-MNLinkerを100ngずつ混合して調製したDNA溶液を各々、mAG1-PB1を恒常的に発現する細胞に、前記同様の方法にて導入した。

[0253] <細胞の観察>

前記にて調製した、以下に示す3種の細胞を実施例1に記載の方法にて観察した

mAG1-PB1が恒常的に発現し、更にp53(70)-PB1及びPB1-MDM2が発現している細胞、

mAG1-PB1が恒常的に発現し、更にp53(70)-PB1及びp62タンパク質のPB1ドメインが発現している細胞(陰性対照)、

mAG1-PB1が恒常的に発現し、更にPB1-MDM及びp62タンパク質のPB1ドメインが発現している細胞(陰性対照)。

得られた結果を図29に示す。

[0254] また、前記p53(70)-PB1及びPB1-MDM2が発現している細胞にヌトリン-3を最終濃度が20μMになるよう添加することにより、p53及びMDM2間相互作用を阻害する条件下においても当該細胞を観察した。得られた結果を図30に示す。なお、図29は実施例1同様に対物レンズの倍率を20倍にして観察した結果を示しているが、図30は対物レンズの倍率を40倍にして観察した結果を示すものである。

[0255] 図29に示した結果から明らかな通り、mAG1-PB1、p53(70)-PB1及びPB1-MDM2が発現している細胞において、蛍光輝点が検出された(図29の左側の画像 参照)。他方、mAG1-PB1、p53(70)-PB1及びp62タンパク質のPB1ドメインが発現している細胞、並びに、mAG1-PB1、PB1-MDM2及びp62タンパク質のPB1ドメインが発現している細胞においては、蛍光輝点が検出されなかった。

[0256] さらに、図30に示す通り、蛍光輝点が検出された前記細胞にヌトリン-

3を添加し、その15分後に観察したところ、蛍光輝点は消失していた。したがって、この蛍光輝点は、p53とMDM2との相互作用に依存して形成されたものであることが確認された。

[0257] (实施例 14)

実施例 1 3 同様に、タンパク質間相互作用の判定における、図 3 に示す系の有効性について、以下に示す方法にて確認した。なお、この検証において検出対象としたのは、mTOR (FRB domain) と FKBP12 タンパク質とのタンパク質間相互作用であり、また当該相互作用を誘導するラパマイシンも本系において用いた。さらに、本確認実験において、多量化能を有するタンパク質として p62 タンパク質の PB1 ドメインを用い、また蛍光タンパク質として mAG1 タンパク質を用いた。

[0258] <p m T O R (F R B d o m a i n) - P B 1 の作製>

本発明にかかる第3の融合タンパク質として、mTOR (FRB domain) のC末にp62タンパク質のPB1ドメインを融合してなるタンパク質 (mTOR (FRB domain) -PB1) を発現させるためのベクターを、実施例5に記載の通りに作製した。

[0259] <pPB1-mTOR (FRB domain) の作製>

本発明にかかる第3の融合タンパク質として、mTOR（FRB domain）のN末にp62タンパク質のPB1ドメインを融合してなるタンパク質（PB1-mTOR（FRB domain））を発現させるためのベクター（pPB1-mTOR（FRB domain））を、以下の通りに作製した。

[0260] mTOR (FRB domain) をコードするヌクレオチド配列の両端に、制限酵素 (EcoRI 及び XhoI) 認識サイトと終止コドンとを配した DNA を人工合成した。次いで、得られた合成 DNA を EcoRI 及び XhoI にて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理した pAsh-MCLinker に挿入することにより、PB1-mTOR (FRB domain) をコードする発現ベクター (pPB1-mTOR (FRB domain))

i n)) を構築した。

[0261] <pFKBP12-PB1の作製>

本発明にかかる第4の融合タンパク質として、FKBP12タンパク質のC末にp62タンパク質のPB1ドメインを融合してなるタンパク質(FKBP12-PB1)を発現させるためのベクター(pFKBP12-PB1)を、以下の通りに作製した。

[0262] FKBP12タンパク質(NCBI RefSeq アクセッション番号: NP_463460.1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードするヌクレオチド配列の両端に、EcoRI及びXhoIの認識サイトを各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをEcoRI及びXhoIにて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理したpAsh-MNLinkerに挿入することにより、FKBP12-PB1をコードする発現ベクター(pFKBP12-PB1)を構築した。

[0263] <pPB1-FKBP12の作製>

本発明にかかる第4の融合タンパク質として、FKBP12タンパク質のN末にp62タンパク質のPB1ドメインを融合してなるタンパク質(PB1-FKBP12)を発現させるためのプラスミドベクター(pPB1-FKBP12)を、実施例5に記載の通りに調製した。

[0264] <細胞培養と遺伝子導入>

(A) PB1-mTOR (FRB domain)、PB1-FKBP12及びmAG1PB1

(B) PB1-mTOR (FRB domain)、FKBP12-PB1及びmAG1PB1

(C) mTOR (FRB domain)-PB1、PB1-FKBP12及びmAG1PB1

(D) mTOR (FRB domain)-PB1、FKBP12-PB1及びmAG1PB1

上記(A)～(D)に記載の組み合わせにて、融合タンパク質を発現させ

るために、以下に示す方法にて各ベクターをHEK293細胞に導入した。

[0265] すなわちまず、HEK293細胞を、10% FBS及び1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したDMEM（高グルコース）にて培養した。次いで、遺伝子導入の前日に、当該細胞を96ウェルマルチウェルプレートに播種し、1ウェルあたり140 μ Lの培養液にて培養した。そして、OptiMEM 10 μ Lに、各プラスミドベクターを133ngずつ混合して調製したDNA溶液を希釈した。次いで、FugeneHDを0.8 μ L添加した後、攪拌し、更に培養液90 μ Lと混合した。そして、得られた混合液を前記培養細胞に添加し、20時間培養した。

[0266] <細胞の観察>

前記にて調製した細胞の培養液を除き、ハンクス平衡塩液及び20mM HEPESからなるpH7.4緩衝液100 μ Lを添加した。次いで、細胞をIN Cell Analyzer 1000を用いて観察した。また、各ウェルに、最終濃度500nMとなるようにラパマイシンを添加し、室温で1時間静置した後、細胞を観察した。得られた結果を図31に示す。

[0267] 図31に示した結果から明らかなように、ラパマイシン添加前は、いずれの細胞においても、蛍光輝点は検出されなかった。しかし、ラパマイシンを添加した結果、蛍光輝点が検出された。このように、ラパマイシン依存的に蛍光輝点が検出されたことから、この蛍光輝点は、mTOR（FRB domain）とFKBP12との相互作用に依存して形成されたものであることが確認された。また、本発明にかかるタンパク質タグ（多量化能を有するタンパク質又は蛍光タンパク質を含むタンパク質）を、解析対象タンパク質のN末及びC末のいずれに融合しても機能する事も、本実施例において確認された。

[0268] 以上、実施例4及び5において示した通り、本発明によれば、図3に示すように、多量化能を有するタンパク質どうしの自己会合を介し、細胞内において多量化能を有するタンパク質と蛍光タンパク質とを会合させることによって、タンパク質間相互作用を判定できることが明らかになった。さらに

、本発明にかかる第5の融合タンパク質を恒常的に発現する細胞を樹立できたことから、該タンパク質は細胞毒性等を示さない事が確認された。

[0269] また、図3に示す方法において、解析対象となるタンパク質（第1及び第2のタンパク質）に融合させるタンパク質は、多量化能を有するタンパク質である。一方、図1及び2に示す方法においては、解析対象となるタンパク質に融合させるタンパク質には、多量化能を有するタンパク質に加え、蛍光タンパク質も含まれる。したがって、図3に示す方法は、図1及び2に示す方法と比較して、解析対象となるタンパク質に融合するタンパク質タグの分子量が小さくて済むため、解析対象となるタンパク質の機能はより阻害されにくくなる。

[0270] さらに、図3に示す方法においては、実施例4に記載の通り、蛍光タンパク質を含む融合タンパク質を恒常的に発現させた細胞を事前に調製しておくことで、これら細胞に解析対象となるタンパク質を含む融合タンパク質を一過的に発現させても、蛍光シグナルの細胞間のバラツキの影響が抑えられ、タンパク質間相互作用の判定をより安定的に行うことができる。

[0271] （実施例15）

以上の通り、タンパク質間相互作用の判定において、図1～3に示す系は有効であることが明らかになった。次に、本発明者は、かかる系の別態様として図4に示す系を構想した。

[0272] すなわち、アフィニティタグ及び第1のタンパク質を含む第1の標識化タンパク質と、アフィニティタグ及び第2のタンパク質を含む第2の標識化タンパク質と、前記アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナーが結合しており、かつ多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む、第6の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、前記アフィニティタグと前記結合パートナーとが結合することにより、第1の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質とが結合し、また第2の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質とが結合することにより、

図1及び2に示す第1の融合タンパク質及び第2の融合タンパク質に各々相当するタンパク質が該細胞内において発現することになる。そして、これらタンパク質の発現に伴い、図1及び2に示す系同様に、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用すれば、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることになる。

[0273] そこで、以下に示す材料及び方法にて、タンパク質間相互作用の判定における、図4に示す系の有効性について確認した。なお、この確認実験において検出対象としたのは、細胞膜貫通タンパク質 CD80のホモ2量体形成である。また、その陰性対照として細胞内でモノマーとして存在することが知られている、細胞膜貫通タンパク質 CD2も用いた（これらタンパク質のタンパク質間相互作用に関しては、James JRら、Nat Methods.、2006年、3巻、12号、1001～1006ページ 参照）。

[0274] <pCD80-FRBの作製>

アフィニティタグとして前記mTOR (FRB domain)を選択し、このタグを融合させたCD80タンパク質 (CD80-FRB)を、第1及び第2の標識化タンパク質として細胞内において発現させるべく、以下の通りにpCD80-FRBベクターを調製した。

[0275] 先ず、CD80 (NCBI RefSeq アクセッション番号: NP_005182.1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードするヌクレオチド配列の両端に、BamHI及びEcoRIの認識配列を各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをBamHI及びEcoRIにて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理したp h m A G 1-M N L i n k e rに挿入することにより、pCD80-hmAG1ベクターを構築した。

[0276] 次に、mTOR (FRB domain)をコードするヌクレオチド配列

の両端に、A g e I 及びX b a I の認識配列、並びに終止コドン配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをA g e I 及びX b a I にて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理し、h m A G 1 領域を除いたp C D 8 0 - h m A G 1 に挿入することにより、C D 8 0 - F R B をコードする発現ベクター（p C D 8 0 - F R B ）を構築した。

[0277] <p C D 2 - F R B の作製>

前記同様に、アフィニティタグとしてm T O R （F R B d o m a i n ）を融合させたC D 2 タンパク質（C D 2 - F R B ）を、第1及び第2の標識化タンパク質として細胞内において発現させるべく、以下の通りにベクターを調製した。

[0278] 先ず、C D 2 タンパク質（G e n b a n k アクセション番号：A A A 5 1 9 4 6 . 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質）をコードするヌクレオチド配列の両端に、B a m H I 及びE c o R I の認識配列を配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをB a m H I 及びE c o R I にて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理したp h m A G 1 - M N L i n k e r に挿入することにより、p C D 2 - h m A G 1 を構築した。

[0279] 次に、m T O R （F R B d o m a i n ）をコードするヌクレオチド配列の両端に、A g e I 及びX b a I の認識配列、並びに終止コドン配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAをA g e I 及びX b a I にて切断し、同じ制限酵素の組み合わせにて処理し、h m A G 1 領域を除いたp C D 2 - h m A G 1 に挿入することにより、C D 2 - F R B をコードする発現ベクター（p C D 2 - F R B ）を構築した。

[0280] <p P B 1 - h m A G 1 - F K B P 1 2 の調製>

アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナーとしてF K B P 1 2 を、多量化能を有するタンパク質としてp 6 2 のP B 1 ドメインを、蛍光タンパク質としてm A G 1 を選択した。そして、これらタンパク質が融合してなる、P B 1 - h m A G 1 - F K B P 1 2 を、第6の融合タンパク質として細胞内において発現させるべく、実施例5に記載の通り、p P B 1 - h

mAG1-FKBP12ベクターを調製した。

[0281] <細胞培養と遺伝子導入>

下記（A）又は（B）の組み合わせにて、融合タンパク質を発現させるべく、以下に示す方法にて、前記にて調製したプラスミドベクターを、HEK293細胞に導入した。

（A）CD80-FRB及びPB1-mAG1-FKBP12

（B）CD2-FRB及びPB1-mAG1-FKBP12。

[0282] すなわち先ず、HEK293細胞を、培養液（DMEM 高グルコース、10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン）にて培養した。次いで、遺伝子導入の前日に、当該細胞を8ウェルチャンバーに播種し、1ウェルあたり100 μ Lの培養液にて培養した。そして、OptiMEM 10 μ Lに、各プラスミドを200ngずつ混合して調製したDNA溶液を希釈した。次いで、FugeneHDを0.8 μ L添加した後、攪拌し、更に培養液90 μ Lと混合した。そして、得られた混合液を前記培養細胞に添加し、20時間培養した。

[0283] <細胞の観察>

観察前に、遺伝子導入処理を施したHEK293細胞の培養液を、500nMのラパマイシンを含有する観察緩衝液（ハンクス平衡塩液及び20mM HEPESからなる、pH7.4の緩衝液）に置換した。当該薬剤を添加した緩衝液に置換した後、室温で30分間静置した。そして、IX-71倒立顕微鏡、UMGFPHQフィルター及びORCA-ERデジタルカメラを用いて、細胞を観察した。得られた結果を、図32に示す。

[0284] 図32に示す通り、CD80を検出対象として用いた場合には、細胞膜において蛍光輝点が観察された。一方、CD2を検出対象として用いた場合には、蛍光輝点が観察されなかった。したがって、図4に示した系の有効性が確認された。

[0285] また、図4に示す本発明のタンパク質間相互作用の第3の判定方法においては、図3に示す方法同様に、解析対象となるタンパク質に直接又は間接的

に蛍光タンパク質を融合させることを要さない。そのため、図1及び2に示す方法と比較して、解析対象となるタンパク質に融合するタンパク質タグの分子量が小さくて済むため、解析対象となるタンパク質の機能はより阻害されにくくなる。

[0286] また、このように、分子量の小さいタグが融合した状態にて解析対象となるタンパク質を細胞内に維持することができるため、上述の通り、ラパマイシン添加等の刺激に応じて本発明にかかる融合タンパク質が再構成される系を構築することにより、タンパク質間相互作用を任意のタイミングにて判定し得る状態に設定することができる。

[0287] さらに、蛍光タンパク質を含む第6の融合タンパク質を恒常的に発現させた細胞を事前に調製しておくことで、これら細胞に解析対象となるタンパク質を含む融合タンパク質を一過的に発現させても、蛍光シグナルの細胞間のバラツキの影響が抑えられ、タンパク質間相互作用の判定をより安定的に行うこともできる。

[0288] また、CD80等の細胞膜貫通タンパク質は、ゴルジ体等の細胞内小器官を通過して細胞膜へと局在する。そのため、当該タンパク質をタグと融合させて発現させた場合には、同器官を通過して細胞膜に到達することは困難となる、ゆえに、一般的に、細胞質タンパク質等における相互作用とは異なり、細胞膜タンパク質のそれを検出することは困難であると言われている。

[0289] 一方、本発明のタンパク質間相互作用の第3の判定方法によれば、融合させるタグは比較的小さく済むので、細胞膜貫通タンパク質の細胞膜への到達が容易となる。そして、当該タグが融合した状態で細胞膜貫通タンパク質を膜上に発現させ、細胞質に発現させた多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を、あとからそのタグに結合させることによって、図26に示した結果から明らかなように、CD80等の細胞膜貫通タンパク質におけるタンパク質間相互作用をも容易に検出することが可能となる。

[0290] さらに、この第3の判定方法を用いることにより、FRET/BRET/BiFC等、タグの近接を利用する手法では検出できない、別々の細胞間に

おけるタンパク質間相互作用（例えば、PD1とPDL1とのタンパク質間相互作用）を判定することも可能となる。

[0291] （実施例16）

次に、本発明者は、図1等にした系に基づき、3以上のタンパク質間の相互作用を検出するための一態様として、図7に示す系を構想した。

[0292] すなわち、第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第13の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第14の融合タンパク質と、第3のタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第15の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入した場合において、第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質が相互作用すれば、図1等にした系同様に、多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導され、これにより融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出されることになる。

[0293] そこで、以下に示す材料及び方法にて、タンパク質間相互作用の判定における、図7に示す系の有効性について確認した。なお、この確認実験において検出対象としたのは、p50、p60及びI κ B α によるヘテロ3量体形成である。

[0294] なお、p50とp65とはヘテロ2量体を形成し、NF κ Bを構成することが知られている。さらに、NF κ Bは炎症性サイトカインの発現調節を担う転写因子として核内で機能するが、I κ B α とさらに相互作用することによって細胞質に保持され、その転写機能は抑制されることが知られている（Marc D. Jacobsら、Cell、1998年12月11日、95巻、749～758ページ 参照）。したがって、本実施例において、p50、p65各々に多量化能を有するタンパク質を融合し、I κ B α には蛍光タンパク質を融合させて、細胞内に発現させることで、p50とp65との相互作用によって形成される会合体に、さらに蛍光タンパク質を融合したI κ B α が集積する事で、蛍光輝点が形成され、3量体複合体を検出できるこ

とを確認した。

[0295] <pPB1-p50の作製>

細胞内にて、多量化能を有するタンパク質としてp62のPB1ドメインをN末に融合させたp50タンパク質（PB1-p50）を、第13の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示す通り、pPB1-p50ベクターを構築した。

[0296] p50（NCBI RefSeq アクセション番号：NP_003989.2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質）をコードするヌクレオチド配列の両端に、EcoRI及びXhoIの認識配列を各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、EcoRI及びXhoIにて処理し、同制限酵素にて処理したpAsh-MCLinkerに挿入することにより、pPB1-p50を作製した。

[0297] <pp65-PB1の作製>

細胞内にて、多量化能を有するタンパク質としてp62のPB1ドメインをC末に融合させたp65タンパク質（p65-PB1）を、第14の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示す通り、pp65-PB1ベクターを構築した。

[0298] p65（NCBI RefSeq アクセション番号：NP_068810.3に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質）をコードするヌクレオチド配列の両端に、BamHI及びXhoIの認識配列を各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、BamHI及びXhoIにて処理し、同制限酵素にて処理したpAsh-MNLinkerに挿入することにより、pp65-PB1ベクターを作製した。

[0299] <phmKO2-IκBαの作製>

細胞内にて、蛍光タンパク質としてmKO2をN末に融合させたIκBαタンパク質（mKO2-IκBα）を、第15の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示す通り、phmKO2-IκBαベクターを構築した。

[0300] $I\kappa B\alpha$ (NCBI RefSeq アクセション番号: NP_065390.1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードするヌクレオチド配列の両端に、*Bam*HI 及び *Eco*RI の認識配列を各々配した DNA を人工合成した。次いで、得られた合成 DNA を、*Bam*HI 及び *Eco*RI にて処理し、同制限酵素にて処理した *p*hmKO2-MCLinker (株式会社医学生物学研究所製) に挿入することにより、*p*hmKO2- $I\kappa B\alpha$ ベクターを作製した。

[0301] <細胞培養と遺伝子導入>

下記 (A) 又は (B) の組み合わせにて融合タンパク質を発現させるために、実施例 12 に示す方法と同様の方法にて、前記にて調製したプラスミドベクターを HEK293 細胞に導入した。

(A) PB1-p50、p65-PB1 及び mKO2- $I\kappa B\alpha$

(B) PB1-p50 及び mKO2- $I\kappa B\alpha$ (陰性対照)。

[0302] <細胞の観察>

遺伝子導入処理を施した HEK293 細胞は、IX-71 倒立顕微鏡、U-MGFPHQ フィルター及び ORCA-Flash4.0 デジタルカメラを用いて観察した。得られた結果を図 33 に示す。

[0303] 図 33 に示した結果から明らかな通り、PB1-p50、p65-PB1 及び mKO2- $I\kappa B\alpha$ を細胞内にて発現させた場合に、蛍光輝点が検出された。一方、PB1-p50 及び mKO2- $I\kappa B\alpha$ を細胞内にて発現させた場合には、蛍光輝点を検出することができなかった。したがって、図 7 に示す通り、p50 と p65 が相互作用することにより、多量化能を有するタンパク質を利用して会合体が形成され、そこへ蛍光タンパク質を融合した $I\kappa B\alpha$ がさらに集積することによって、蛍光輝点が生じることが確認された。すなわち、当該蛍光輝点の検出を介して、3 種のタンパク質間の相互作用を判定できることが確認された。

[0304] (実施例 17)

実施例 16 同様に、以下に示す材料及び方法にて、タンパク質間相互作用

の判定における、図7に示す系の有効性について確認した。なお、この確認実験において検出対象としたのは、CDK4、CyclinD1及びp21によるヘテロ3量体形成である。細胞の核内にて、p21は、CDK4とCyclinD1とからなる複合体を認識し、相互作用することが知られている(LaBaer Jら、Genes Dev.、1997年4月1日、11巻7号847～862ページ 参照)。そして、かかるヘテロ3量体の形成により、CDK4とCyclinD1とからなる複合体によって促進される細胞周期の進行(G1期からS期への移行)が阻害されることも明らかになっている。

[0305] <p p21-PB1の作製>

細胞内にて、多量化能を有するタンパク質としてp62のPB1ドメインをC末に融合させたp21タンパク質(p21-PB1)を、第13の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示す通り、p p21-PB1ベクターを構築した。

[0306] p21 (NCBI RefSeq アクセション番号: NP_510867.1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードするヌクレオチド配列の両端に、BamHI及びNotIの認識配列を各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、BamHI及びNotIにて処理し、同制限酵素にて処理したpAsh-MNLinkerに挿入することにより、p p21-PB1ベクターを作製した。

[0307] <pCDK4-PB1の作製>

細胞内にて、多量化能を有するタンパク質としてp62のPB1ドメインをC末に融合させたCDK4タンパク質(CDK4-PB1)を第14の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示す通り、pCDK4-PB1ベクターを構築した。

[0308] CDK4 (NCBI RefSeq アクセション番号: NP_000066.1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードするヌクレオチド配列の両端に、BamHI及びNotIの認識配列を各々配したDNA

を人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、BamHI及びNotIにて処理し、同制限酵素にて処理したpAsh-MNLinkerに挿入することにより、pCDK4-PB1ベクターを作製した。

[0309] <pCDK4の作製>

陰性対照として、他のタンパク質を融合させていないCDK4タンパク質(CDK4)を発現させるべく、以下に示す通り、pCDK4ベクターを構築した。

[0310] CDK4をコードするヌクレオチド配列の両端に、BamHIの認識配列と、終止コドン及びNotIの認識配列とを、各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、BamHI及びNotIにて処理し、同制限酵素にて処理したpAsh-MNLinkerに挿入することにより、pCDK4ベクターを作製した。

[0311] <phmAG1-CyclinD1>

細胞内にて、蛍光タンパク質としてmAG1をN末に融合させたCyclinD1タンパク質(mAG1-CyclinD1)を、第15の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示す通り、phmAG1-CyclinD1ベクターを構築した。

[0312] CyclinD1(NCBI RefSeq アクセション番号: NP_444284.1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードするヌクレオチド配列の両端に、BamHIの認識配列と、終止コドン及びNotIの認識配列とを、各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、BamHI及びNotIにて処理し、同制限酵素にて処理したphmAG1-MCLinkerに挿入することにより、phmAG1-CyclinD1ベクターを作製した。

[0313] <細胞培養と遺伝子導入>

下記(A)、(B)又は(C)の組み合わせにて融合タンパク質を発現させるために、実施例14に示す方法と同様の方法にて、前記にて調製したプラスミドベクターをHEK293細胞に導入した。

- (A) mAG1-CyclinD1、p21-PB1及びCDK4-PB1
- (B) mAG1-CyclinD1、p21-PB1及びPB1（陰性対照）
- (C) mAG1-CyclinD1、p21-PB1及びCDK4（陰性対照）

なお、(B)においては、PB1（p62タンパク質のPB1ドメイン）を発現させるべく、pAsh-MNLinkerを細胞に導入した。

[0314] <細胞の観察>

遺伝子導入処理を施したHEK293細胞は、実施例14に示す方法と同様の方法にて観察した。得られた結果を図34に示す。

[0315] 図34に示した結果から明らかな通り、mAG1-CyclinD1、p21-PB1及びCDK4-PB1を発現する細胞では、蛍光輝点が検出された。一方、CDK4を細胞内にて発現させなかった場合、多量化能を有するタンパク質を融合させずにCDK4を細胞内にて発現させた場合においては、蛍光輝点を検出することができなかった。したがって、図7に示す通り、CDK4とCyclinD1とが相互作用することにより、多量化能を有するタンパク質と蛍光タンパク質とを有する複合体が形成され、そこへ多量化能を有するタンパク質を融合したp21が相互作用することで、蛍光輝点が生じることが確認された。すなわち、当該蛍光輝点の検出を介して、3種のタンパク質間の相互作用を判定できることが確認された。

[0316] （実施例18）

実施例16及び17同様に、タンパク質間相互作用の判定における、図7に示す系の有効性について確認した。なお、この確認実験において検出対象としたのは、カルモジュリン（Calmodulin）と、ミオシン軽鎖キナーゼ2（myosin light chain kinase 2）の部分配列（M13ペプチド、M13peptide）とによる4量体形成である。カルモジュリンとM13ペプチドとの相互作用は、Gタンパク質共役受容体（GPCR）がリガンドを受容した際に生じる細胞内カルシウムイオ

ン濃度の一過的な上昇（セカンドメッセンジャー）に応答して発生することが明らかになっている（Miyawaki A ら、Nature、1997年8月28日、388巻、6645号、882～887ページ 参照）。また、カルモジュリンと、M13ペプチド等のカルモジュリン結合ペプチドとの相互作用によって、これら各2分子からなる4量体が形成されることも明らかになっている（Ye Q ら、Biochemistry、2006年1月24日、45巻、3号、738～745ページ 参照）。そこで、かかる4量体形成を、図7に示した系によって検出できることを、以下に示す材料及び方法にて確認した。さらに、蛍光輝点の検出を通じて、細胞内カルシウムイオン濃度の経時的な変化を検出することも確認した。

[0317] <pM13 peptide-PB1の作製>

細胞内にて、多量化能を有するタンパク質としてp62のPB1ドメインをC末に融合させたM13ペプチド（M13 peptide-PB1）を、第13及び14の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示す通り、pM13 peptide-PB1ベクターを構築した。

[0318] M13ペプチドをコードするヌクレオチド配列（配列番号：50に記載のヌクレオチド配列）の両端に、BamHI及びEcoRIの認識配列を各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、BamHI及びEcoRIにて処理し、同制限酵素にて処理したpAsh-MNLinkerに挿入することにより、pM13 peptide-PB1ベクターを作製した。

[0319] <pCalmodulin-hmAG1及びpCalmodulin-hmUKG1の作製>

細胞内にて、蛍光タンパク質としてmAG1をC末に融合させたカルモジュリンタンパク質（Calmodulin-mAG1）を、第15の融合タンパク質として発現させるべく、または蛍光タンパク質としてmUKG1をC末に融合させたカルモジュリンタンパク質（Calmodulin-mUKG1）を、第15の融合タンパク質として発現させるべく、以下に示

す通り、pCalumodulin-hmAG1ベクター及びpCalumodulin-hmUkG1ベクターを構築した。

[0320] カルモジュリンをコードするヌクレオチド配列（配列番号：52に記載のヌクレオチド配列）の両端に、BamHI及びEcoRIの認識配列を各々配したDNAを人工合成した。次いで、得られた合成DNAを、BamHI及びEcoRIにて処理し、同制限酵素にて処理したp-hmAG1-MNLinker及びp-hmUkG1-MNLinker（いずれも株式会社医学生物学研究所社製）各々に挿入する事により、pCalumodulin-hmAG1ベクター及びpCalumodulin-hmUkG1ベクターを作製した。

[0321] ＜細胞培養と遺伝子導入＞

下記（A）又は（B）の組み合わせにて融合タンパク質を発現させるために、以下に示す方法にて、前記にて調製したプラスミドベクターをHeLaS3細胞に導入した。

（A）Calumodulin-mAG1及びM13peptide-PB1

（B）Calumodulin-mUkG1及びM13peptide-PB1

先ず、HeLaS3細胞を、10%FBS（EQUITECH社製）を含有するDMEM（低グルコース）にて培養した。次いで、HeLaS3細胞を遺伝子導入の前日に35mmガラスベースディッシュ（旭硝子社製）に播種した。そして、遺伝子導入の際には、OptiMEMにプラスミド（1 μ g+1 μ g）を希釈し、ポリフェクト（登録商標）トランスフェクション試薬を10 μ l添加し、攪拌した。さらに培養液600 μ lと混合した後、HeLaS3細胞に添加し、22時間培養した。

[0322] ＜細胞の観察＞

前記にて遺伝子導入し、22時間培養したHeLaS3細胞を、ハンス平衡塩液及び20mM HEPESからなるpH7.4緩衝液中にて、IX

ー 7 1 倒立顕微鏡、U-MGFPHQフィルター、ORCA-ERデジタルカメラを用いて観察した。その後、100 μ M ヒスタミン (Histamine、和光純薬工業社製) を添加し、継時的に蛍光画像を撮影した。なお、ヒスタミンは、HeLa S3細胞にも発現しているGPCRの1種 H1 レセプターのリガンドとして機能することが明らかになっている。得られた結果を図35及び36に示す。

[0323] 図35及び36に示した結果から明らかなように、リガンド (ヒスタミン) 添加前は、Calmodulin-mAG1及びCalmodulin-mUkG1は細胞内に拡散して存在していたが、リガンドを添加してから60秒後には、蛍光輝点の発生が検出され、M13 peptide-PB1を含む会合体の形成が確認された。また、図35に示す通り、その後も継続して観察した結果、リガンド添加に伴って一過的に上昇した細胞質カルシウムイオン濃度が、その後低下したことに伴い、リガンド添加300秒後には蛍光輝点 (会合体) は消失した。

[0324] したがって、本発明によって、このようなヘテロ4量体形成も検出できることが確認された。さらに、本発明のタンパク質間相互作用の検出方法を利用することにより、H1レセプターからのシグナル伝達により、一過的に上昇するカルシウムイオン濃度の実時間測定が可能であることも明らかになった。また、この実施例の結果から、ひいては、タンパク質間相互作用を発生させるセカンドメッセンジャー等の内在性因子、該セカンドメッセンジャー等が寄与するシグナル伝達、及び該シグナル伝達を惹起する細胞外リガンド等の外部からの刺激の検出並びにスクリーニングに適用できることも示された。

[0325] (実施例19)

本発明者らは、上記結果に基づき、タンパク質間相互作用を判定するための系として、図8に示す系を構想した。

[0326] すなわち、第1のタンパク質、第1の多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第16の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び第2

の多量化能を有するタンパク質を含む第17の融合タンパク質とを、細胞内に発現させた又は細胞に導入し、第1のタンパク質と第2のタンパク質とは異なるタンパク質であり、また第1の多量化能を有するタンパク質と第2の多量化能を有するタンパク質とは異なるタンパク質である場合、第1のタンパク質と第2のタンパク質とが相互作用し、さらに多量化能を有するタンパク質同士の多量体形成が誘導されることにより、融合タンパク質が自立的に会合体を形成し、融合タンパク質に含まれる蛍光タンパク質が蛍光輝点として検出される系の構築を考えた。

[0327] そこで、以下に示す材料及び方法にて、タンパク質間相互作用の判定における、図8に示す系の有効性について確認した。なお、この検証において検出対象としたのは、p53タンパク質とMDM2タンパク質との相互作用であり、また該相互作用の阻害剤ヌトリン-3も本検証において用いた。さらに、本検証において、多量化能を有するタンパク質として、Tankyrase1タンパク質のSAMドメイン、PKC ι タンパク質のPB1ドメイン、TELタンパク質のSAMドメイン、DGK δ タンパク質のSAMドメインを適宜組み合わせて用いた。また、蛍光タンパク質として、mAG1タンパク質を用いた。なお、図8に示す系においては、タンパク質相互作用の解析対象である1のタンパク質のみに蛍光タンパク質を融合させているが、本実施例においては双方のタンパク質に融合して検証を行った。

[0328] <各種融合タンパク質を発現させるためのプラスミドベクターの調製>

上述の通りに調製した、pTankyrase-hmAG1-p53、pPKC ι -hmAG1-p53、pTEL-hmAG1-p53及びpDGK δ -hmAG1-p53を、NheI及びAgeIにて制限酵素処理し、ヌクレオチド断片Tankyrase-hmAG1、PKC ι -hmAG1、TEL-hmAG1及びDGK δ -hmAG1を調製した。そして、これらを同制限酵素にて処理し、PB1領域を除いたpPB1-p53(70)に、各々挿入することにより、以下のプラスミドベクターを調製した。

- (a) pT a n k y r a s e - h m A G 1 - p 5 3 (7 0) 、
- (b) p P K C i - h m A G 1 - p 5 3 (7 0) 、
- (c) p T E L - h m A G 1 - p 5 3 (7 0) 、
- (d) p D G K d - h m A G 1 - p 5 3 (7 0) 。

[0329] また、実施例4において調製したp P B 1 - M D M 2を、N h e I及びA g e Iにて処理し、P B 1領域を除いた後、前記ヌクレオチド断片を各々挿入することにより、以下のプラスミドベクターも調製した。(e) p T a n k y r a s e - h m A G 1 - M D M 2、

- (f) p P K C i - h m A G 1 - M D M 2、
- (g) p T E L - h m A G 1 - M D M 2、
- (h) p D G K d - h m A G 1 - M D M 2。

[0330] <細胞培養と遺伝子導入>

前述の通りにして調製したプラスミドベクター(a)～(h)を、下記組み合わせにて、以下に示す方法により、H E K 2 9 3細胞に導入した。

- 組み合わせ1：プラスミドベクター(b)及び(h)、
- 組み合わせ2：プラスミドベクター(b)及び(g)、
- 組み合わせ3：プラスミドベクター(a)及び(f)、
- 組み合わせ4：プラスミドベクター(a)及び(h)、
- 組み合わせ5：プラスミドベクター(a)及び(g)、
- 組み合わせ6：プラスミドベクター(d)及び(f)、
- 組み合わせ7：プラスミドベクター(d)及び(g)、
- 組み合わせ8：プラスミドベクター(c)及び(e)、
- 組み合わせ9：プラスミドベクター(c)及び(h)。

[0331] H E K 2 9 3細胞を、10% F B S及び1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したD M E M (高グルコース)にて培養した。次いで、遺伝子導入の前日に、当該細胞を96ウェルマルチウェルプレート(g r e i n e r b i o - o n e社製)に播種し、1ウェルあたり100 μ Lの培養液にて培養した。そして、O p t i M E M 10 μ Lに、各プラスミドを20

On g ずつ混合して調製したDNA溶液を希釈した。次いで、F u g e n e H Dを0.8 μ L添加した後、攪拌し、更に培養液90 μ lと混合した。そして、得られた混合液を前記培養細胞に添加し、20時間培養した。

[0332] <細胞の観察>

前記培養後に細胞の培養液を除き、ハンクス平衡塩液及び20 mM H E P E SからなるpH 7.4緩衝液100 μ Lを添加した。そして、細胞をI N C e l l A n a l y z e r 1000を用いて観察を行なった。次に、各ウェルに、最終濃度40 μ Mとなるようにヌトリン-3を添加した。室温で1時間静置したのち細胞を観察した。得られた結果を図37～45に示す。

[0333] 図37～45に示した結果から明らかなように、全ての組み合わせに置いて、ヌトリン-3を添加する前には、明確な蛍光輝点が観察された。一方、ヌトリン-3を添加して30分後に再度観察した結果、当該蛍光輝点は解消され、蛍光シグナルは分散されていた。

[0334] このように、図8に示す系でも、p53とMDM2との相互作用に依存して形成された蛍光輝点を検出することができ、当該系の有効性を示すことができた。

産業上の利用可能性

[0335] 以上説明したように、本発明によれば、タンパク質間相互作用をその固有な細胞内環境下において判定することができ、またタンパク質間相互作用の位置情報及び時間情報を取得することができる。また、本発明においては、タンパク質間相互作用の強弱と蛍光輝点の蛍光強度とが相関しているので、前記蛍光強度を指標として、タンパク質間相互作用に関与するアミノ酸残基の同定や、タンパク質間相互作用を調節する物質のスクリーニングにもこの方法を利用できる。

[0336] したがって、本発明のタンパク質間相互作用の判定方法等、並びにこれらの方法に用いられるためのベクター又はキットは、生体内における様々なシグナル伝達や、様々な生体反応の制御等の解明、ひいては疾患メカニズムの

解明を通した医薬品等の開発において有用である。

配列表フリーテキスト

[0337] 配列番号：1 及び 2

<223> p62のPB1ドメイン

配列番号：3 及び 4

<223> TFGのPB1ドメイン

配列番号：5 及び 6

<223> PKC iotaのPB1ドメイン

配列番号：7 及び 8

<223> TELのSAMドメイン

配列番号：9 及び 10

<223> DGK deltaのSAMドメイン

配列番号：11 及び 12

<223> Tankyrase-1のSAMドメイン

配列番号：13 及び 14

<223> コドンをもとにした単量体アザミグリーン1 (mAG1)

配列番号：15 及び 16

<223> 単量体ウミキノコグリーン (mUKG)

配列番号：17 及び 18

<223> 単量体クサビラオレンジ2 (mKO2)

配列番号：19 及び 20

<223> 単量体ミドリイシシアン1 (mMICy)

配列番号：21 及び 22

<223> クサビラシアン1 (KCy1)

配列番号：23 及び 24

<223> 二量体アザミグリーン (AB) (dAG (AB))

配列番号：25 及び 26

<223> TGuv

配列番号：27及び28

<223> PB1hmAG1

配列番号：29及び30

<223> hmAG1PB1

配列番号：31及び32

<223> FKBP12変異体

配列番号：33及び34

<223> p53

配列番号：35及び36

<223> MDM2

配列番号：37及び38

<223> PB1

配列番号：39及び40

<223> フュージョンレッド

配列番号：42及び43

<223> Tankyrase-hmAG1

配列番号：44及び45

<223> PKCιota-hmAG1

配列番号：46及び47

<223> TEL-hmAG1

配列番号：48及び49

<223> DGKdelta-hmAG1

配列番号：50及び51

<223> M13ペプチド

配列番号：52及び53

<223> カルモジュリン

請求の範囲

- [請求項1] 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定するための方法であって、下記工程（1）～（3）を含む方法
- （1） 第1のタンパク質、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第1の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第2の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程
- （2） 前記細胞内における第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程
- （3） 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。
- [請求項2] 前記第2の融合タンパク質が、さらに蛍光タンパク質を含む融合タンパク質である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記蛍光タンパク質が単量体蛍光タンパク質である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程（1）～（3）を含む方法
- （1） 第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第3の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第4の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第5の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程
- （2） 前記細胞内における、第3の融合タンパク質と、第4の融合タンパク質と、第5の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程
- （3） 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。
- [請求項5] 前記蛍光タンパク質が単量体蛍光タンパク質である、請求項4に記載の方法。

載の方法。

[請求項6] 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター。

[請求項7] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、請求項1～3のうちのいずれか一項に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 請求項6に記載のベクター

(b) 第1の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第2の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第1の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(e) 第2の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第1の融合タンパク質をコードするベクターと第2の融合タンパク質をコードするベクターとを保持する形質転換細胞

(g) 第1の融合タンパク質

(h) 第2の融合タンパク質。

[請求項8] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、請求項4又は5に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記多量化能を有するタンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させること

ができるベクター

(b) 第3の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第4の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第5の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第5の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質

転換細胞

(f) 第3の融合タンパク質

(g) 第4の融合タンパク質

(h) 第5の融合タンパク質。

[請求項9]

第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) アフィニティタグ及び第1のタンパク質を含む第1の標識化タンパク質と、アフィニティタグ及び第2のタンパク質を含む第2の標識化タンパク質と、前記アフィニティタグに対して親和性を有する結合パートナーが結合しており、かつ多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む、第6の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第1の標識化タンパク質と、第2の標識化タンパク質と、前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[請求項10]

下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、請求項9に記載の方法に用いられるためのキット

(a) アフィニティタグをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、前記アフィニティタグを含む融合タンパク

質を発現させることができるベクター

(b) 第1の標識化タンパク質をコードするベクター

(c) 第2の標識化タンパク質をコードするベクター

(d) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質を、コードするベクター

(e) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質をコードするベクターを、保持する形質転換細胞

(f) 第1の標識化タンパク質

(g) 第2の標識化タンパク質

(h) 前記結合パートナーが結合している第6の融合タンパク質。

[請求項11] 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第7の融合タンパク質と、蛍光タンパク質を構成する第1の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第8の融合タンパク質と、第1の部分ペプチドに結合することによって蛍光タンパク質が再構成し得る第2の部分ペプチド、及び多量化能を有するタンパク質を含む第9の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第7の融合タンパク質と、第8の融合タンパク質と、第9の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[請求項12] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、請求項11に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 第1の部分ペプチドをコードするDNAとクローニング部位

とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第1の部分ペプチドを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第7の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第8の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第9の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第9の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第7の融合タンパク質

(g) 第8の融合タンパク質

(h) 第9の融合タンパク質。

[請求項13] 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第1のタンパク質を含む第10の融合タンパク質と、多量化能を有するタンパク質を構成する第3の部分ペプチド及び第2のタンパク質を含む第11の融合タンパク質と、第3の部分ペプチドに結合することによって多量化能を有するタンパク質が再構成し得る第4の部分ペプチド、及び蛍光タンパク質を含む第12の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における、第10の融合タンパク質と、第11の融合タンパク質と、第12の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[請求項14] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、請求項13に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 第3の部分ペプチドをコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第3の部分ペプチドを含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第10の融合タンパク質をコードするベクター

(c) 第11の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第12の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第12の融合タンパク質をコードするベクターを保持する形質転換細胞

(f) 第10の融合タンパク質

(g) 第11の融合タンパク質

(h) 第12の融合タンパク質。

[請求項15] 第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質との相互作用を検出するための方法であって、下記工程(1)～(3)を含む方法

(1) 第1のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第13の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び多量化能を有するタンパク質を含む第14の融合タンパク質と、第3のタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第15の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

(2) 前記細胞内における第13の融合タンパク質と第14の融合タンパク質と第15の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

(3) 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質と第3のタンパク質との相互作用を判定する工程。

[請求項16] 下記(a)～(h)からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、請求項15に記載の方法に用いられるためのキット

(a) 多量化能を有するタンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、多量化能を有するタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 蛍光タンパク質をコードするDNAとクローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、蛍光タンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(c) 第13の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第14の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第15の融合タンパク質をコードするベクター

(f) 第13の融合タンパク質

(g) 第14の融合タンパク質

(h) 第15の融合タンパク質。

【請求項17】 第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定するための方法であって、第1の多量化能を有するタンパク質と第2の多量化能を有するタンパク質とは異なるタンパク質であり、かつ下記工程（1）～（3）を含む方法

（1） 第1のタンパク質、第1の多量化能を有するタンパク質及び蛍光タンパク質を含む第16の融合タンパク質と、第2のタンパク質及び第2の多量化能を有するタンパク質を含む第17の融合タンパク質とを、細胞内に発現させる又は細胞に導入する工程

（2） 前記細胞内における第16の融合タンパク質と第17の融合タンパク質との会合により生じる蛍光輝点を検出する工程

（3） 前記蛍光輝点の検出により、第1のタンパク質と第2のタンパク質との相互作用を判定する工程。

【請求項18】 下記（a）～（f）からなる群から選択される少なくとも一の物質及び使用説明書を含む、請求項17に記載の方法に用いられるための

キット

(a) 第1の多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第1の多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(b) 第2の多量化能を有するタンパク質をコードするDNAと、蛍光タンパク質をコードするDNAと、クローニング部位とを含み、該クローニング部位に任意のタンパク質をコードするDNAが挿入されることにより、第2の多量化能を有するタンパク質、前記蛍光タンパク質及び前記任意のタンパク質を含む融合タンパク質を発現させることができるベクター

(c) 第16の融合タンパク質をコードするベクター

(d) 第17の融合タンパク質をコードするベクター

(e) 第16の融合タンパク質

(f) 第17の融合タンパク質。