

明 細 書

発明の名称：

複数の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子のスクリーニング方法 技術分野

[0001] 本開示は、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 複数の標的分子と共に複合体を形成する分子としては、二重特異性抗体やタンパク質分解誘導キメラ（Proteolysis targeting chimera；PROTAC）に代表される二重特異性分子、並びに、ラパマイシンやFK506のようにFKBP（FK506 binding protein）との結合を経て標的分子と結合する分子などが知られている。前者の分子の作成方法として、異なる標的に結合し得る分子を別々に取得した後にそれらを連結させる手法が知られている（非特許文献1）。後者の分子の取得方法として、試験化合物をFKBPと混合し二者複合体を形成させた後、これを標的タンパク質と混合し、三者複合体の形成を質量分析により検出する方法が知られている（特許文献1）。

[0003] Split GFP技術は、単独では発光しないように分割されたGFPタンパク質が近接し会合することで発光するという現象を利用した技術である。各GFP断片に異なるタンパク質を結合させることで、GFPの発光を指標にタンパク質同士の相互作用を検出することができる。具体的には、GFPをベータストランド単位でGFP1-9、GFP10、およびGFP11に3分割し、GFP10およびGFP11にそれぞれ別のタンパク質を結合させGFP1-9を添加すると、これらタンパク質の相互作用を発光で検出できるとの報告がある（非特許文献2）。split GFPを発現させた細胞を使用し、細胞内でのGTPaseとGTPase-binding domainの相互作用による発光を指標として、GTPaseの活性化状態を検出した報告がある（特許文献2、非特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許US9428845号

特許文献2：米国特許出願公開20180164324号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ulrich, H. W. et al. CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 10: 1-18 (2013)

非特許文献2：Cabantous, S. et al. Sci Rep. 2013; 3: 2854. doi: 10.1038/srep02854

非特許文献3：Koraichi, F. et al. Journal of Cell Science 2018; 131: jcs.210419 doi: 10.1242/jcs.210419

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 複数の標的分子と共に複合体を形成する分子を取得しようとした場合、(i) 標的分子ごとにスクリーニングして得たバインダーを連結させる方法や、(ii) 片方の標的分子に対するバインダーを取得したあとにその標的分子とバインダーの複合体を別の標的分子に接触させる方法が考えられる。

[0007] 経口吸収性を高めること、または細胞内標的を狙う場合、候補分子の分子量をある程度小さくする必要がある。そのため、このような目的で候補分子を取得しようとした場合、各標的分子に対するバインダーを取得した後にこれらを連結する(i)の方法では、個々のバインダーの分子量に大きな制限がかかる。一方、分子量を小さくしすぎると、結合に使用できる候補分子側の構造や標的分子側の結合部位に制限が生じるため、適用可能な標的分子が限られてしまう。他方(ii)の方法は、2つの分子を連結させるのではなく、ライブラリから所望の性質を有する分子をスクリーニングするものであるが、単独の標的分子への単一特異性による選別が第一工程となる。この工程において、該標的（第1の標的）分子に対して優位な結合様式を有する分子が濃縮されるため、次の工程では、第1の標的に対する結合様式に偏りのある分子

集団から、所望の性質を有する分子を選別しなければならない。第1の標的分子に対する優位な結合様式が、複数の標的分子と共に複合体を形成するための結合様式と一致するとは限らないため、スクリーニングされる化合物の多様性に制限が生じる。各標的分子との多様な結合様式を生じうるライブラリから、所望の性質を有する分子を直接選別することができるスクリーニング方法が求められる。

[0008] また、単一の標的分子への結合活性のみならず、候補分子に多様な性質を求めるほど、多様な被験分子が含まれるライブラリからスクリーニングを行う必要性が高まる。加えて、複数の標的分子と共に複合体を形成するためには、候補分子が複雑な結合・反応様式をもたらすことが必要であるところ、そのために最適な分子構造は予測が難しいため、できる限り多様性のあるライブラリに適用可能で、候補分子の選択と同定が簡便な、スループット性の高いスクリーニング方法が求められる。

[0009] Split GFP技術は、タンパク質-タンパク質相互作用（PPI）の検出のために利用されているが（非特許文献2）、GFPの発光を指標としているため、これをスクリーニングに適用した場合のスループット性は高くない。すなわち、蛍光検出による場合、ウェルなどの一つ一つの閉鎖空間に、標的分子および単一の候補分子を用意する必要があるため手間とコストがかかり、扱える被験分子の数に制限がかかる。効率化のために、仮に各閉鎖空間に複数の被験分子を含むライブラリを用意しスクリーニングを試みたとしても、特定の候補分子を選択、同定するためには、単一分子のみの発光を確認できるまで段階的に、複数回のアッセイが必要となり、前者同様スループット性は高くない。このような観点から、GFPタンパク質の発光を指標とする方法に代わる新たな方法によって、分割されたタンパク質の近接または会合を検出し、それを回収することが求められている。

[0010] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子のスクリーニング方法を提供することを課題の一つとする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、ライブラリに含まれる被験分子と複数の標的分子を同一の系中に共存させスクリーニングを行うことが、標的分子と多くの反応様式を生み出す、最も効果的な方法であると考えた。そして、そのためにSplit GFP技術に代表される技術にアフィニティーを利用した候補分子の回収方法を適用し、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子のスクリーニング方法を見出した。本手法では、一つの標的分子のみと複合体を形成する被験分子の回収率を抑えつつ、複数の標的分子と共に複合体を形成する候補分子の回収が可能であることが見出された。

[0012] 本発明はこのような知見に基づくものであり、非限定の具体的な一態様において以下を包含する。

〔1〕以下（１）および（２）の工程を含む、第１の標的分子および第２の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子をスクリーニングする方法：

（１）第１の部分に連結した前記第１の標的分子、第２の部分に連結した前記第２の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合する工程であって、該第１の部分および該第２の部分がタンパク質の一部または全部を構成する工程；および

（２）工程（１）の後に、前記第１の部分と前記第２の部分が近接または会合していることを検出し得る第３の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて、前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体を回収する工程。

〔１．１〕工程（２）における前記第１の標的分子が、前記第１の部分に連結した第１の標的分子であり、前記第２の標的分子が、前記第２の部分に連結した第２の標的分子である、〔１〕に記載の方法。

〔２〕工程（２）の後に、回収された複合体に含まれる候補分子を同定する工程（工程（３））をさらに含む、〔１〕または〔１．１〕に記載の方法。

〔３〕前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分が近接または会合した場合に、前記第１の部分および／または前記第２の部分と反応す

る分子である、〔１〕～〔２〕のいずれかに記載の方法。

〔４〕前記第３の分子は、前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が形成された場合に、前記第１の部分および／または前記第２の部分と反応する分子である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分と近接も会合もしていない場合、前記第１の部分および／または前記第２の部分と実質的に反応しない分子である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分と近接も会合もしていない場合、前記第１の部分および前記第２の部分と近接または会合している場合と比較して、１０分の１未満でしか、前記第１の部分および／または前記第２の部分と反応しない分子である、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分と近接も会合もしていない場合、前記第１の部分および前記第２の部分と近接または会合している場合と比較して、２０分の１未満でしか、前記第１の部分および／または前記第２の部分と反応しない分子である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法。

〔８〕前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分と近接も会合もしていない場合、前記第１の部分および前記第２の部分と近接または会合している場合と比較して、４０分の１未満でしか、前記第１の部分および／または前記第２の部分と反応しない分子である、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の方法。

〔９〕前記第３の分子は、前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が形成されない場合に、前記第１の部分および／または前記第２の部分と実質的に反応しない分子である、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の方法。

〔１０〕前記第３の分子は、前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、お

よび、前記候補分子を含む複合体が形成されていない場合、当該複合体が形成された場合と比較して、10分の1未満でしか、前記第1の部分および／または前記第2の部分と反応しない分子である、〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の方法。

〔11〕前記第3の分子は、前記第1の標的分子、前記第2の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が形成されていない場合、当該複合体が形成された場合と比較して、20分の1未満でしか、前記第1の部分および／または前記第2の部分と反応しない分子である、〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の方法。

〔12〕前記第3の分子は、前記第1の標的分子、前記第2の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が形成されていない場合、当該複合体が形成された場合と比較して、40分の1未満でしか、前記第1の部分および／または前記第2の部分と反応しない分子である、〔1〕～〔11〕のいずれかに記載の方法。

〔12.1〕前記第1の標的分子、前記第2の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体は、前記第1の部分に連結した第1の標的分子、前記第2の部分に連結した第2の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体である、〔1〕～〔12〕のいずれかに記載の方法。

〔13〕前記第3の分子は、前記第1の部分と、前記第2の部分を含む複合体を検出し得る分子である、〔1〕～〔12.1〕のいずれかに記載の方法。

〔14〕前記第3の分子は、前記第1の部分および前記第2の部分が近接または会合した場合に、前記第1の部分および前記第2の部分を含む複合体を形成させ得る分子である、〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の方法。

〔15〕前記第3の分子は、前記第1の部分および前記第2の部分が近接または会合した場合に、前記第1の部分および／または前記第2の部分と結合する分子である、〔1〕～〔14〕のいずれかに記載の方法。

〔16〕工程（2）と工程（3）の間に、前記第1の標的分子、前記第2の

標的分子、および、前記候補分子を含む複合体から前記候補分子溶出する工程（工程（2 A））をさらに含む、〔2〕～〔15〕のいずれかに記載の方法。

〔16. 1〕工程（2 A）が、第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を溶出する工程である、〔16〕に記載の方法。

〔17〕工程（2 A）と工程（3）の間に、工程（2 A）で溶出された候補分子をエンコードするポリヌクレオチドを増幅する工程（工程（2 B））をさらに含む、〔16〕または〔16. 1〕に記載の方法。

〔18〕工程（3）が、工程（2 A）で溶出された候補分子をエンコードするポリヌクレオチドの配列、または、工程（2 B）で増幅されたポリヌクレオチドの配列を決定することを含む、〔16〕または〔17〕に記載の方法。

〔19〕工程（1）が、前記第1の標的分子、前記第2の標的分子、前記複数の被験分子を含むライブラリ、および前記第3の分子を混合することを含む、〔1〕～〔18〕のいずれかに記載の方法。

〔19. 1〕工程（1）で混合される、前記第1の標的分子が、前記第1の部分に連結した第1の標的分子であり、前記第2の標的分子が、前記第2の部分に連結した第2の標的分子である、〔19〕に記載の方法。

〔20〕工程（1）の後に、前記第1の標的分子、前記第2の標的分子、および、前記複数の被験分子を含むライブラリと、前記第3の分子とを混合する工程（工程（1 A））をさらに含む、〔1〕～〔18〕のいずれかに記載の方法。〔20. 1〕工程（1 A）で混合される、前記第1の標的分子が、前記第1の部分に連結した第1の標的分子であり、前記第2の標的分子が、前記第2の部分に連結した第2の標的分子である、〔20〕に記載の方法。

〔21〕工程（1）、（2）および（2 B）、または工程（1）、（1 A）、（2）および（2 B）を複数回繰り返す工程を含む、〔16〕～〔20. 1〕のいずれかに記載の方法。

〔22〕工程（1）、（2）、（2 A）および（2 B）、または工程（1）

、(1A)、(2)、(2A)および(2B)を複数回繰り返す工程を含む、〔16〕～〔21〕のいずれかに記載の方法。

〔23〕 *in vitro*で行われる、〔1〕～〔22〕のいずれかに記載の方法。

〔24〕前記被験分子がポリヌクレオチドによりコードされている分子である、〔1〕～〔23〕のいずれかに記載の方法。

〔25〕前記被験分子がペプチドである、〔1〕～〔23〕のいずれかに記載の方法。

〔26〕前記被験分子がポリヌクレオチドに連結されたペプチドである、〔1〕～〔23〕のいずれかに記載の方法。

〔27〕前記被験分子の分子量が3000以下である、〔1〕～〔26〕のいずれかに記載の方法。

〔28〕前記被験分子の分子量が2000以下である、〔1〕～〔27〕のいずれかに記載の方法。

〔29〕前記被験分子が前記第1の標的分子および前記第2の標的分子のいずれか一方に結合することが知られている分子である、〔1〕～〔28〕のいずれかに記載の方法。

〔30〕前記ライブラリが、ディスプレイライブラリまたはDNAエンコードライブラリである、〔1〕～〔29〕のいずれかに記載の方法。

〔31〕前記ディスプレイライブラリが、mRNA ディスプレイライブラリである、〔30〕に記載の方法。

〔32〕前記ライブラリが、 1×10^4 以上の多様性を有するライブラリである、〔1〕～〔31〕のいずれかに記載の方法。

〔33〕前記ライブラリが、 1×10^5 以上の多様性を有するライブラリである、〔1〕～〔32〕のいずれかに記載の方法。

〔34〕前記ライブラリが、 1×10^6 以上の多様性を有するライブラリである、〔1〕～〔33〕のいずれかに記載の方法。

〔35〕前記ライブラリが、 1×10^8 以上の多様性を有するライブラリである、〔1〕～〔34〕のいずれかに記載の方法。

〔36〕前記ライブラリが、 1×10^{10} 以上の多様性を有するライブラリである、〔1〕～〔35〕のいずれかに記載の方法。

〔37〕前記ライブラリが、 1×10^{11} 以上の多様性を有するライブラリである、〔1〕～〔36〕のいずれかに記載の方法。

〔38〕前記ライブラリが、 1×10^{12} 以上の多様性を有するライブラリである、〔1〕～〔37〕のいずれかに記載の方法。

〔39〕前記候補分子がペプチドである、〔1〕～〔38〕のいずれかに記載の方法。

〔40〕前記候補分子が環状ペプチドである、〔1〕～〔39〕のいずれかに記載の方法。

〔41〕前記候補分子が、前記第1の標的分子および前記第2の標的分子に同時に結合し得る分子である、〔1〕～〔40〕のいずれかに記載の方法。

〔42〕前記候補分子が、前記第1の標的分子と結合した場合に、前記候補分子単独の場合と比較して、前記第2の標的分子に対して2倍以上の結合親和性を有する、〔1〕～〔41〕のいずれかに記載の方法。

〔43〕前記候補分子が、前記第1の標的分子と結合した場合に、前記候補分子単独の場合と比較して、前記第2の標的分子に対して5倍以上の結合親和性を有する、〔1〕～〔42〕のいずれかに記載の方法。

〔44〕前記候補分子が、前記第1の標的分子と結合した場合に、前記候補分子単独の場合と比較して、前記第2の標的分子に対して10倍以上の結合親和性を有する、〔1〕～〔43〕のいずれかに記載の方法。

〔45〕前記候補分子が、前記第1の標的分子と結合した場合に、前記候補分子単独の場合と比較して、前記第2の標的分子に対して20倍以上の結合親和性を有する、〔1〕～〔44〕のいずれかに記載の方法。

〔46〕前記候補分子が、以下(i)～(iii)のいずれかの性質を有する分子である、〔1〕～〔45〕のいずれかに記載の方法；

(i) 前記第1の標的分子と結合可能な候補分子であって、該結合に起因して、該候補分子の前記第2の標的分子に対する結合親和性が、該結合前より

も高くなる分子、

(i i) 前記第 1 の標的分子と結合可能な候補分子であって、該結合に起因して、該候補分子と前記第 1 の標的分子の複合体として前記第 2 の標的分子と結合可能になる分子、および

(i i i) 前記第 1 の標的分子と結合可能な候補分子であって、該結合に起因して、前記第 1 の標的分子の前記第 2 の標的分子に対する結合親和性が、該結合前よりも高くなる分子。

[4 7] 前記第 1 の標的分子、前記第 2 の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が、前記第 1 の標的分子、前記第 2 の標的分子、および前記候補分子から構成される、[1] ~ [4 6] のいずれかに記載の方法。

[4 8] 前記候補分子が、前記第 1 の標的分子および前記第 2 の標的分子と共に形成し得る複合体が、3 者複合体である、[1] ~ [4 7] のいずれかに記載の方法。

[4 9] 工程 (1) が以下の工程を含む、[1] ~ [4 8] のいずれかに記載の方法；

(i) 前記第 1 の部分に連結した第 1 の標的分子と被験分子とを混合する工程、および

(i i) 工程 (i) において得られた混合物と前記第 2 の部分に連結した第 2 の標的分子とをさらに混合する工程。

[5 0] 工程 (1) が以下の工程を含む、[1] ~ [4 8] のいずれかに記載の方法；

(i) 前記第 2 の部分に連結した第 2 の標的分子と被験分子とを混合する工程、および

(i i) 工程 (i) において得られた混合物と前記第 1 の部分に連結した第 1 の標的分子とをさらに混合する工程。

[5 1] 前記第 1 の部分と前記第 1 の標的分子、および、前記第 2 の部分と前記第 2 の標的分子が、それぞれリンカーにより連結されている、[1] ~ [5 0] のいずれかに記載の方法。

〔５２〕前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が形成された場合に、前記第１の部分および前記第２の部分が近接または会合する、〔１〕～〔５１〕のいずれかに記載の方法。

〔５３〕前記第１の部分および前記第２の部分が近接または会合した場合に、前記第１の部分および／または前記第２の部分に前記第３の分子が反応または結合する、〔５２〕に記載の方法。

〔５４〕前記被験分子が前記第１の標的分子および前記第２の標的分子のいずれにも結合しない場合、前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が形成されない、〔１〕～〔５３〕のいずれかに記載の方法。

〔５５〕前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体が形成されない場合、前記第１の部分および前記第２の部分が近接も会合もしない、〔５４〕に記載の方法。

〔５６〕前記第１の部分および前記第２の部分が近接も会合もしない場合、前記第１の部分および／または前記第２の部分に前記第３の分子が実質的に反応も結合もしない、〔５５〕に記載の方法。

〔５６．１〕前記第１の標的分子、前記第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体は、前記第１の部分に連結した第１の標的分子、前記第２の部分に連結した第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体である、〔１〕～〔５６〕のいずれかに記載の方法。

〔５７〕第１の部分にＦＫＢＰを連結させた分子、第２の部分にＦＲＢを連結させた分子、および核酸に連結したラパマイシンを混合し、第３の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて核酸に連結したラパマイシンを回収した場合の回収率が、第１の部分にＦＫＢＰを連結させた分子または第２の部分にＦＲＢを連結させた分子のいずれかと、核酸に連結したラパマイシンを混合し、第３の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて核酸に連結したラパマイシンを回収した場合の回収率の５倍以上であるときに、前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分が近接また

は会合した場合に、前記第1の部分および／または前記第2の部分と反応または結合する分子であると判定される、〔1〕～〔56, 1〕のいずれかに記載の方法。

〔58〕第1の部分にFKBPを連結させた分子、第2の部分にFRBを連結させた分子、および核酸に連結したラパマイシンを混合し、第3の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて核酸に連結したラパマイシンを回収した場合の回収率が、第1の部分にFKBPを連結させた分子または第2の部分にFRBを連結させた分子のいずれかと、核酸に連結したラパマイシンを混合し、第3の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて核酸に連結したラパマイシンを回収した場合の回収率の5倍未満であるときに、前記第3の分子は、前記第1の部分および前記第2の部分が近接または会合した場合に、前記第1の部分および／または前記第2の部分と実質的に反応も結合もしない分子であると判定される、〔1〕～〔57〕のいずれかに記載の方法。

〔59〕前記第1の部分と前記第2の部分を含む複合体が、前記タンパク質の一部または全部を含む、〔13〕～〔58〕のいずれかに記載の方法。

〔60〕前記タンパク質が、GFP、ルシフェラーゼ、ユビキチン、またはSNAPタグである、〔1〕～〔59〕のいずれかに記載の方法。

〔61〕前記第1の部分と前記第2の部分が、それぞれGFP10とGFP11であるか、GFP11とGFP10であって、前記第3の分子がGFP1-9を含むタンパク質である、〔1〕～〔60〕のいずれかに記載の方法。

〔62〕前記第1の部分と前記第2の部分が、それぞれSNAPタグのN末端側断片とSNAPタグのC末端側断片であるか、SNAPタグのC末端側断片とSNAPタグのN末端側断片であって、前記第3の分子がSNAPビオチンである、〔1〕～〔60〕のいずれかに記載の方法。

〔63〕前記第1の部分と前記第2の部分が、それぞれユビキチンのN末端側断片とユビキチンのC末端側断片であるか、ユビキチンのC末端側断片とユビキチンのN末端側断片であって、前記第3の分子が抗ユビキチン抗体である、

〔１〕～〔６０〕のいずれかに記載の方法。

〔６４〕前記第１の部分と前記第２の部分、それぞれNano luc-9とNano luc-10であるか、Nano luc-10とNano luc-9であって、前記第３の分子がNano luc1-8を含むタンパク質である、〔１〕～〔６０〕のいずれかに記載の方法。

〔６５〕GFP10が以下（ａ）～（ｃ）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔６１〕のいずれかに記載の方法；

（ａ）配列番号：７３で表されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号：７３で表されるアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（ｃ）配列番号：７３で表されるアミノ酸配列と８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、または９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔６６〕GFP11が以下（ａ）～（ｃ）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔６１〕および〔６５〕のいずれかに記載の方法；

（ａ）配列番号：７４で表されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号：７４で表されるアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（ｃ）配列番号：７４で表されるアミノ酸配列と８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、または９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔６７〕GFP1-9が以下（ａ）～（ｃ）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔６１〕、〔６５〕および〔６６〕のいずれかに記載の方法；

（ａ）配列番号：７２で表されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号：７２で表されるアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（ｃ）配列番号：７２で表されるアミノ酸配列と８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、または９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸

配列。

〔68〕 SNAPタグのN末端側断片が以下（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔60〕および〔62〕のいずれかに記載の方法；

（a）配列番号：83で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号：83で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（c）配列番号：83で表されるアミノ酸配列と80％以上、85％以上、90％以上、95％以上、または98％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔69〕 SNAPタグのC末端側断片が以下（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔60〕、〔62〕および〔68〕のいずれかに記載の方法；

（a）配列番号：84で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号：84で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（c）配列番号：84で表されるアミノ酸配列と80％以上、85％以上、90％以上、95％以上、または98％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔70〕 ユビキチンのN末端側断片が以下（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔60〕および〔63〕のいずれかに記載の方法；

（a）配列番号：76で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号：76で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（c）配列番号：76で表されるアミノ酸配列と80％以上、85％以上、90％以上、95％以上、または98％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔71〕 ユビキチンのC末端側断片が以下（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む〔1〕～〔60〕、〔63〕および〔70〕のいずれかに記載の方法；

（a）配列番号：77で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号：77で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（c）配列番号：77で表されるアミノ酸配列と80％以上、85％以上、90％以上、95％以上、または98％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔72〕 Nanoluc-9が以下（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔60〕および〔64〕のいずれかに記載の方法；

（a）配列番号：80で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号：80で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（c）配列番号：80で表されるアミノ酸配列と80％以上、85％以上、90％以上、95％以上、または98％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔73〕 Nanoluc-10が以下（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔60〕、〔64〕および〔72〕のいずれかに記載の方法；

（a）配列番号：81で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号：81で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（c）配列番号：81で表されるアミノ酸配列と80％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔74〕 Nanoluc1-8が以下（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔60〕、〔64〕、〔72〕および〔73〕のいずれかに記載の方法；

- (a) 配列番号：79で表されるアミノ酸配列、
- (b) 配列番号：79で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および
- (c) 配列番号：79で表されるアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔75〕前記第1の標的分子が、イムノフィリンファミリーに属するタンパク質である、〔1〕～〔74〕のいずれかに記載の方法。

〔76〕前記第1の標的分子が、FKBP (FK506 binding protein／FK506結合タンパク質)、シクロフィリン、FRB、カルシニューリン、およびKras、Nras、Hras等のRASタンパク質からなる群より選択される、〔1〕～〔74〕のいずれかに記載の方法。

〔77〕前記アフィニティーを利用した方法が、プルダウン法である、〔1〕～〔76〕のいずれかに記載の方法。

〔78〕前記アフィニティーを利用した方法が、ビオチンとビオチン結合タンパク質との間のアフィニティー、または抗原と抗体の間のアフィニティーを利用した方法である、〔1〕～〔77〕のいずれかに記載の方法。

〔79〕工程(2A)における溶出が、酵素、または熱により行われる、〔16〕～〔78〕のいずれかに記載の方法。

〔80〕工程(2A)における溶出が、前記タンパク質の第1の部分と前記第1の標的分子の間に位置する第1のリンカー、および、前記タンパク質の第2の部分と前記第2の標的分子の間に位置する第2のリンカーを切断することにより行われる、〔16〕～〔79〕のいずれかに記載の方法。

〔81〕前記第1および第2のリンカーが、酵素により切断される配列を含む、〔80〕に記載の方法。

〔82〕前記酵素がTEVプロテアーゼである、〔81〕に記載の方法。

〔83〕前記第1の部分および第2の部分を提供する前記タンパク質が、以下(a)～(c)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～

〔８２〕のいずれかに記載の方法；

（ａ）配列番号：７１、７５、７８、または８２で表されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号：７１、７５、７８、または８２で表されるアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（ｃ）配列番号：７１、７５、７８、または８２で表されるアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔８４〕前記第１の部分および第２の部分を提供する前記タンパク質が、以下（ａ）～（ｃ）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔８３〕のいずれかに記載の方法；

（ａ）配列番号：７１で表されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号：７１で表されるアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（ｃ）配列番号：７１で表されるアミノ酸配列と８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、または９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔８５〕前記第１の部分および第２の部分を提供する前記タンパク質が、以下（ａ）～（ｃ）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔８３〕のいずれかに記載の方法；

（ａ）配列番号：７５で表されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号：７５で表されるアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

（ｃ）配列番号：７５で表されるアミノ酸配列と８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、または９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔８６〕前記第１の部分および第２の部分を提供する前記タンパク質が、以下（ａ）～（ｃ）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔８３〕のいずれかに記載の方法；

- (a) 配列番号：78で表されるアミノ酸配列、
- (b) 配列番号：78で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および
- (c) 配列番号：78で表されるアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔87〕前記第1の部分および第2の部分を提供する前記タンパク質が、以下(a)～(c)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔83〕のいずれかに記載の方法；

- (a) 配列番号：82で表されるアミノ酸配列、
- (b) 配列番号：82で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および
- (c) 配列番号：82で表されるアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

〔88〕前記第3の分子が、前記第1の部分および前記第2の部分を提供する前記タンパク質に由来する、〔1〕～〔87〕のいずれかに記載の方法。

〔89〕さらに以下の工程を含む、〔1〕～〔88〕のいずれかに記載の方法：

(4) 固相担体に固定された第1の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合し、前記第1の標的分子に結合し得る被験分子を回収する工程；および／または

(5) 固相担体に固定された第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合し、前記第2の標的分子に結合し得る被験分子を回収する工程。

〔90〕工程(4)において、固相担体に固定された第1の標的分子、遊離の第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合する、〔89〕に記載の方法。

〔 9 1 〕 工程（ 5 ）において、固相担体に固定された第 2 の標的分子、遊離の第 1 の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合する、〔 8 9 〕 または〔 9 0 〕 に記載の方法。

〔 9 2 〕 工程（ 4 ）および（ 5 ）が、工程（ 1 ）の前に行われる、〔 8 9 〕 ～〔 9 1 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 9 3 〕 工程（ 4 ）の後に工程（ 5 ）が行われるか、工程（ 5 ）の後に工程（ 4 ）が行われる、〔 8 9 〕 ～〔 9 2 〕 のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0013] 本開示において、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子のスクリーニング方法が提供された。本開示の方法を利用することにより、系中に複数の標的分子と被験分子を共存させた状態から、一つの標的分子のみと複合体を形成する被験分子を排除しつつ、複数の標的分子と共に複合体を形成する候補分子を選別することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]ビオチン化GFP1-9とストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲルシフトをSDS-PAGEで評価した図である。検出はCBB染色で行った。

（レーン1：分子量マーカー、レーン2：ビオチン化GFP1-9とストレプトアビジンの混合物、レーン3：ビオチン化GFP1-9、レーン4：ビオチン化GFP1-9（1／10量）、レーン5：ストレプトアビジン）

[図2]ビオチン化GFP1-9のSEC分析の結果（上図）と、同カラムで分子量マーカーを流した結果（下図）である。（マーカー分子量：左側のピークから、 290.00×10^3 、 142.00×10^3 、 67.00×10^3 、 32.00×10^3 、 12.40×10^3 ）

[図3]ビオチン化splitNanolucとストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲルシフトをSDS-PAGEで評価した図である。検出はCBB染色で行った。（レーン1：分子量マーカー、レーン2：ビオチン化splitNanolucとストレプトアビジンの混合物、レーン3：ビオチン化splitNanoluc、レーン4：ビオチン化splitNanoluc（1／10量）、レーン5：ストレプトアビジン）

[図4]ビオチン化splitNanolucのSEC分析の結果（上図）と、同カラムで分子量マーカーを流した結果（下図）である。（マーカー分子量：左側のピークから、 290.00×10^3 、 142.00×10^3 、 67.00×10^3 、 32.00×10^3 、 12.40×10^3 ）

発明を実施するための形態

[0015] 本開示は、第1の標的分子および第2の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子のスクリーニング方法に関する。ある局面において本開示におけるスクリーニング方法は、以下（1）および（2）の工程を含む。

（1）第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合する工程であって、該第1の部分および該第2の部分がタンパク質の一部または全部を構成する工程；および

（2）工程（1）の後に、該第1の部分と該第2の部分が近接または会合していることを検出し得る第3の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて、該第1の標的分子、該第2の標的分子、および、該候補分子を含む複合体を回収する工程。

[0016] 工程（1）

本開示におけるスクリーニング方法は、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合する工程（工程（1））を含む。本開示においては、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを、一度に混合することができる。また本開示においては、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを、複数回に分けて混合することができる。具体的には、第1の部分に連結した第1の標的分子と第2の部分に連結した第2の標的分子とを混合し、次にこれらの混合物に被験分子を含むライブラリを混合することができる。また別の態様において、第1の部分に連結した第1の標的分子と被験分子を含むライブラリとを混合し、次にこれらの混合物に第2の部分に連結した第2の標的

分子を混合することができる。さらに別の態様においては、第2の部分に連結した第2の標的分子と被験分子を含むライブラリとを混合し、次にこれらの混合物に第1の部分に連結した第1の標的分子を混合することができる。

[0017] すなわち本開示における工程(1)は、一態様において、

(i) 第1の部分に連結した第1の標的分子と第2の部分に連結した第2の標的分子とを混合する工程、および

(ii) (i)において得られた混合物と1もしくは複数の被験分子またはそれを含むライブラリとを混合する工程を含むことができる。

[0018] あるいは本開示における工程(1)は、一態様において、

(i) 第1の部分に連結した第1の標的分子と1もしくは複数の被験分子またはそれを含むライブラリとを混合する工程、および

(ii) (i)において得られた混合物と第2の部分に連結した第2の標的分子とを混合する工程を含むことができる。

[0019] あるいは本開示における工程(1)は、一態様において、

(i) 第2の部分に連結した第2の標的分子と1もしくは複数の被験分子またはそれを含むライブラリとを混合する工程、および

(ii) (i)において得られた混合物と第1の部分に連結した第1の標的分子とを混合する工程を含むことができる。

[0020] あるいは本開示における工程(1)は、一態様において、

(A) 第1の部分に連結させた前記第1の標的分子、

(B) 第2の部分に連結させた前記第2の標的分子、および

(C) 被験分子、

によって形成された複合体を第3の分子と混合する工程

を含むことができる。

[0021] あるいは本開示におけるスクリーニング方法は、工程(1)の後に、工程

(1)において得られる混合物に、第1の部分と第2の部分が近接または会合していることを検出し得る第3の分子を混合する工程(工程(1A))を含んでもよい。

[0022] さらなる態様において、本開示におけるスクリーニング方法は、工程(1)の後に工程(1A)を含むことに代えて、工程(1)自体が、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、第3の分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合する工程であってもよい。この場合、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、第3の分子、および複数の被験分子を含むライブラリは、一度に混合しても複数回に分けて混合してもよい。また複数回に分けて混合する場合、これらの4つの成分を1つずつ順番に混合してもよいし、これら4つのうち2つの成分(例えば、第1の部分に連結した第1の標的分子と第2の部分に連結した第2の標的分子)を含む混合物をあらかじめ用意し、それに他の成分を混合してもよく、これらの4つのうち3つの成分(例えば、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリ)を含む混合物をあらかじめ用意し、それに他の成分を混合してもよい。

[0023] また非限定の一態様において、本開示は、以下(1)および(2)の工程を含む、第1の標的分子および第2の標的分子と複合体を形成し得る候補分子をスクリーニングする方法であってもよい。

(1) (A) 第1の部分に連結させた第1の標的分子、

(B) 第2の部分に連結させた第2の標的分子、および

(C) 被験分子、

によって形成された複合体を、

第1の部分と第2の部分が近接または会合していることを検出し得る第3の分子と混合する工程であって、

該第1の部分および該第2の部分は、タンパク質の一部または全部を構成し、

該第3の分子は、該第1の部分および該第2の部分が近接した場合に該第1の部分および／または該第2の部分と結合する、工程；および

(2) 工程(1)の後に、該第3の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて、該複合体を回収する工程。

[0024] 本開示におけるスクリーニング方法においては、各工程において特定される分子を混合することにより、それらの分子がスクリーニング系において共存する。したがって、一例として本開示における工程(1)は次のように表現することもできる。

(1) 第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを共存させる工程であって、該第1の部分および該第2の部分がタンパク質の一部または全部を構成する工程。

[0025] また本開示においては、各工程において特定される分子を混合することにより、それらの分子が接触してもよい。すなわち、一例として本開示における工程(1)は次のように表現することもできる。

(1) 第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを接触させる工程であって、該第1の部分および該第2の部分がタンパク質の一部または全部を構成する工程。

[0026] なお後述のとおり、本開示における第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体には、候補分子が第1の(または第2の)標的分子と結合し、第1の(または第2の)標的分子が第2の(または第1の)標的分子と結合している態様(候補分子は第2の(または第1の)標的分子とは直接には結合していない態様)も含まれる。したがって、本開示における工程(1)においては、被験分子が第1の標的分子および第2の標的分子の両方と接触することは必須ではない。本開示における工程(1)には、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および複数の被験分子を含む

ライブラリが混合されている限り、あるいはこれらが同一の系に共存している限り、被験分子が第1の標的分子および第2の標的分子のいずれか一方とのみ接触する態様が包含される。

[0027] 工程（2）

本開示におけるスクリーニング方法は、工程（1）において形成された第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を、第1の部分と第2の部分が近接または会合していることを検出し得る第3の分子を介したアフィニティーを利用して回収する工程（工程（2））を含む。本開示におけるスクリーニング方法においては、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体が形成されると、当該複合体において、第1の部分および第2の部分が近接または会合する。また、それに伴い、あるいはそれと連動して、第1の部分および第2の部分を含む複合体が形成される。したがって本開示においては、第1の部分および第2の部分が近接または会合することを、第1の部分および第2の部分を含む複合体が形成されると表現することもできる。そして本開示におけるスクリーニング方法においては、第1の部分および第2の部分が近接または会合した場合に、第3の分子が第1の部分および／または第2の部分に反応または結合することができる。本開示におけるスクリーニング方法においては、このようにして形成された第1の標的分子、第2の標的分子、候補分子、および第3の分子を含む複合体を選択し、当該複合体から、候補分子を回収することができる。一態様において、第1の部分および第2の部分を第1の標的分子および第2の標的分子からそれぞれ切断すれば、第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子からなる複合体を取得することができる。さらに、当該複合体から候補分子を回収することができる。本開示における第3の分子は、上記、「第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体」「第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子を含む複合体」、「第1の部分および第2の部分を含む複合体」、および「第1の部分および

第2の部分と近接または会合していること」の少なくとも1つを検出することが可能な分子である。

[0028] 一方、本開示におけるスクリーニング方法においては、被験分子が第1の標的分子および第2の標的分子のいずれにも結合しない場合、第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体は形成されない。そして、このような複合体が形成されない場合、第1の部分および第2の部分は近接も会合もしない。言い換えれば、候補分子が存在しなければ、第1の部分および第2の部分を含む複合体は形成されない。この場合、第3の分子は第1の部分および／または第2の部分に実質的に反応も結合もしない。そして、この場合、第3の分子を介したアフィニティーを利用した方法により、被験分子は回収されない。したがって、この場合、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、候補分子、および第3の分子を含む複合体は形成されず、仮に被験分子の中に第1の標的分子のみと複合体を形成し得る分子、あるいは第2の標的分子のみと複合体を形成し得る分子が存在していたとしても、本開示におけるスクリーニング方法を用いれば、そのような被験分子が単離されてしまう確率を低減することができる。本開示のスクリーニング方法は、そのような候補分子の存在に起因した検出精度の低下を抑制することが可能である。

[0029] 一態様において、工程（2）において言及される、「第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子」を含む複合体としては、「第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子」を含む複合体を指すことができ、該複合体は、文脈に応じて第3の分子をさらに含んでよい。

[0030] 工程（2A）

一態様において、本開示におけるスクリーニング方法は、第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を回収した後、当該複合体から候補分子を溶出する工程（工程（2A））をさらに含むことができる。一態様において、溶出は、酵素反応または熱反応により行うことができる。

酵素反応による溶出には、後述するTEVプロテアーゼを利用することができる。

[0031] 工程（2 B）

一態様において、本開示におけるスクリーニング方法は、候補分子がポリヌクレオチドを含むもしくはポリヌクレオチドに連結されている場合、候補分子がポリヌクレオチドによってコードされる場合、または、候補分子がポリヌクレオチド等の場合、当該ポリヌクレオチドを増幅する工程（工程（2 B））を含むことができる。ポリヌクレオチドの増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR；polymerase chain reaction）、LAMP（loop-mediated isothermal amplification）、TMA（transcription-mediated amplification）、TRC（transcription-reverse transcription concerned reaction）、LCR（ligase chain reaction）、SDA（standard displacement amplification）、NASBA（nucleic acid sequence-based amplification）等、当業者に周知の方法により行うことができる。

[0032] なお、一態様において、上記で増幅されたポリヌクレオチドを転写することによって、mRNAライブラリを得てもよく、これらを鋳型として再度ペプチドのライブラリを製造し、当該ライブラリを本開示におけるスクリーニング方法に供することもできる。このようなライブラリは第1の標的分子および第2の標的分子と共に複合体を形成し得るペプチドが濃縮されているため、このライブラリを用いて再度パニングを行うことで、第1の標的分子および第2の標的分子と共に複合体を形成し得るペプチドを、より濃縮することができる。本開示におけるスクリーニング方法においては、工程（1）および（2）、工程（1）、（2）および（2 B）、または工程（1）、（1 A）、（2）および（2 B）を複数回（例えば、2回以上、3回以上または4回以上）繰り返すことにより、目的の候補分子を濃縮することができる。また本開示におけるスクリーニング方法においては、工程（1）、（2）、（2 A）および（2 B）、または工程（1）、（1 A）、（2）、（2 A）および（2 B）を複数回（例えば、2回以上、3回以上または4回以上）繰

り返すことによって、目的の候補分子を濃縮することができる。一態様において、候補分子がポリヌクレオチドに連結されたペプチドの場合、このようにして濃縮されたペプチドに含まれる塩基配列情報を基にアミノ酸配列を同定し、第1の標的分子および第2の標的分子と共に複合体を形成し得るペプチドを製造することができる。一態様において、本開示におけるスクリーニング方法は、*in vitro*で行うことができる。

[0033] 工程 (3)

一態様において、本開示におけるスクリーニング方法は、回収された第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子の複合体に含まれる候補分子を同定する工程をさらに含むことができる。第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体が得られれば、当業者に周知の方法によって、そこから候補分子を単離、取得することができる。一態様において、候補分子の同定は、第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体から候補分子を単離した後に行うことができる。候補分子の同定は当業者に周知の方法で行うことが可能であるが、例えば、候補分子がポリヌクレオチドに連結されたペプチドまたは化合物の場合、当該候補分子をエンコードするポリヌクレオチドの塩基配列を決定することにより該ペプチドまたは化合物を同定することができる。具体的には、例えばポリヌクレオチドをPCR増幅し、その塩基配列を解析することで、ポリヌクレオチドに連結されたペプチドのアミノ酸配列または化合物を明らかにすることができる。ポリヌクレオチドがmRNAの場合は当該mRNAからcDNAを合成したものを用いてもよい。

また候補分子にタグが付与されていない場合は、例えばASMS (Affinity Selection Mass Spectrometry) によって候補分子を同定することができる。

[0034] 工程 (4) および (5)

一態様において、本開示におけるスクリーニング方法は、固相担体に固定された第1の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合し、

前記第1の標的分子に結合し得る候補分子を回収する工程（「工程（4）」）、並びに／または、固相担体に固定された第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合し、前記第2の標的分子に結合し得る候補分子を回収する工程（「工程（5）」）を含むことができる。工程（4）においては、固相担体に固定された第1の標的分子、遊離の第2の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合してもよい。工程（5）においては、固相担体に固定された第2の標的分子、遊離の第1の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合してもよい。一態様において、工程（4）の後に工程（5）を行うことができ、または、工程（5）の後に工程（4）を行うことができる。工程（4）および（5）は、工程（1）～（3）と組み合わせることができ、例えば工程（1）の前に工程（4）および（5）を行うことができる。工程（4）および（5）の実施回数に制限はないが、例えば工程（4）または（5）を独立して1回または複数回（例えば、2回以上、3回以上または4回以上）繰り返して実施することでもよく、工程（4）および（5）を1セットとして、1回または複数回（例えば、2回以上、3回以上または4回以上）繰り返して実施することもできる。

[0035] 一態様において、工程（4）および（5）のそれぞれの工程の後に、上述の工程（2A）と同様に、被験分子または候補分子を溶出する工程を含むことができる。候補分子がポリヌクレオチドを含むもしくはポリヌクレオチドに連結されている場合には、工程（4）および（5）のそれぞれの工程の後に、上述の工程（2B）と同様に、ポリヌクレオチドを増幅する工程を含むことができる。一態様において、候補分子の同定は、上述の工程（3）に従い行うことができる。

[0036] 特定の理論に拘束されるものではないが、被験分子を含むライブラリと混合する際に、片方の標的分子（例えば第1の標的分子）を固相担体に固定し、もう一方の標的分子（例えば第2の標的分子）を遊離の状態とすることで、回収される候補分子群の中には、両方の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子が含まれ得ると考えられる。次に、固相担体に固定する標的分子

と遊離の標的分子を入れ替えた状態で、先に得られた候補分子群と混合すると、両方の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子が濃縮されることが考えられる。このように標的分子の固定／遊離状態を交互に変更しながらパニングを行うことで、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子をライブラリから選択することができると考えられる。一態様において、工程（４）および（５）を工程（１）の前に行うことができるが、この順番でパニングを行うことにより、第１の標的分子および／又は第２の標的分子に特異的に結合し得る候補分子を効率的に濃縮することができると考えられる。具体的には、工程（１）以降において、標的分子に対する結合親和性を有しない非特異的な被験分子の残存率を低減することができると考えられる。

[0037] 一態様において、本開示におけるスクリーニング方法は、以下の工程を含む、第１の標的分子および第２の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子をスクリーニングする方法である：

（４）固相担体に固定された第１の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合し、前記第１の標的分子に結合し得る被験分子を回収する工程；および

（５）固相担体に固定された第２の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合し、前記第２の標的分子に結合し得る被験分子を回収する工程。

[0038] 第３の分子

上述のとおり本開示におけるスクリーニング方法においては、第１の部分に連結した第１の標的分子、第２の部分に連結した第２の標的分子、および候補分子との間で複合体が形成された場合、第１の部分および第２の部分が近接または会合する。本開示において第３の分子は、本開示における第１の部分および第２の部分が近接または会合していることを検出することが可能な分子である。また一態様において本開示における第３の分子は、第１の部分および第２の部分が近接または会合した場合に、第１の部分および第２の部分を含む複合体を形成させ得る分子である。一態様において、本開示にお

ける第3の分子は、第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質に由来する分子であることができる。一態様において、第3の分子のアミノ酸配列は、第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質中に存在する野生型のアミノ酸配列と同じでもよいし、異なってもよい。一態様において、本開示における第3の分子は、第1の部分および第2の部分と共に、あるタンパク質の一部または全部を構成することができ、例えば、GFPまたはルシフェラーゼの全部を構成することができる。この場合であっても、第3の分子は、第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質に含まれないタグおよび／またはリンカー配列等を含むことができる。この場合であっても、第3の分子は、第1の部分および第2の部分と共に、該タンパク質の一部または全部を構成することができる。一態様において、本開示における第3の分子には、アミノ酸配列に改変を有するものも含まれる。例えば、第3の分子の調製や安定性等に適したアミノ酸の改変（1または複数のアミノ酸の欠失、挿入、置換および／または付加）が行われてもよい。

[0039] 従来の発光を指標とした方法に代えてアフィニティーを使用して被験分子をスクリーニングする場合、第3の分子は、第1の部分および第2の部分が近接または会合した場合にのみ、該第1の部分および／または第2の部分に反応または結合する分子であることが求められる。そこで本発明者らは、GFP1-9はGFP10（またはGFP11）の非存在下でGFP11（またはGFP10）と会合しうるのか、それとも、GFP1-9がGFP10およびGFP11と会合するためにはGFP10とGFP11の両方の存在を必要とするのかについて、検証を行った。その結果、本発明者らは、GFP1-9はGFP10（またはGFP11）の非存在下ではGFP11（またはGFP10）と会合しないこと、GFP1-9がGFP10およびGFP11と会合するためにはGFP10とGFP11とが近接、会合あるいは相互作用していることが必要であることを見出した。

[0040] さらに本発明者らは、ルシフェラーゼの一種であるNanoluc（登録商標）を用いて、上述したGFPと同様の検証を行った。すなわち、Nanoluc1-8はNanoluc-9（またはNanoluc-10）の非存在下でNanoluc-10（またはNanoluc-9）と会

合しうるのか、それとも、Nanoluc1-8がNanoluc-9およびNanoluc-10と会合するためにはNanoluc-9とNanoluc-10の両方の存在を必要とするのかについて、検証を行った。その結果、本発明者らは、Nanoluc1-8はNanoluc-9（またはNanoluc-10）の非存在下ではNanoluc-10（またはNanoluc-9）と会合しないこと、Nanoluc1-8がNanoluc-9およびNanoluc-10と会合するためにはNanoluc-9とNanoluc-10とが近接、会合あるいは相互作用していることが必要であることを見出した。

[0041] これらの知見は、split GFP技術やNanoluc技術に代表されるsplit-protein系にアフィニティーを利用した候補分子の回収方法を適用し、一方の標的分子のみと複合体を形成する被験分子を排除しつつ、多様性の大きなライブラリの中から候補分子をスクリーニングすることが可能な系を構築するうえで、重要であった。

[0042] 特定の理論に拘束されるわけではないが、本発明者らは以下のように考察する。蛍光を指標にしてライブラリから標的分子に対するバインダーのスクリーニングを試みた場合、蛍光団の成熟までにある程度の時間を要するため、時間経過とともに特定のあるいは類似の性質（例えば高い結合活性）を有するバインダー集団に収束してしまい、多様な性質を有する候補分子を取得することが難しくなる可能性がある。複雑な結合・反応様式をもたらす候補分子の取得確率を高めるには、特定のあるいは類似の性質を有する分子集団ではなく、たとえ結合活性が低かったとしても可能な限り多様な性質を有する候補分子を取得できるスクリーニング方法であることが望ましい。このような観点からも、本開示における候補分子をスクリーニングするためには、発光を指標とする方法に代わる新たな方法として、アフィニティーを使用した候補分子のスクリーニング方法を構築することが重要であった。

[0043] さらに本発明者らは、タンパク質としてユビキチンおよびSNAPタグを使用した場合にもGFPやNanolucを使用した場合と同様に、複数のタンパク質との複合体を形成し得る分子をスクリーニングすることが可能なことを見出した。すなわち本発明者らは、全長ユビキチンに結合することができる一方で、

その断片であるsplitユビキチンには結合することができない抗ユビキチン抗体を使用すれば、splitユビキチンを利用して同様のスクリーニングが可能であることを着想し、これを明らかにした。また、全長SNAPタグは基質であるSNAP-ビオチンと反応することができるのに対し、その断片であるsplit SNAPはSNAP-ビオチンと反応することができない性質を利用すれば、split SNAPを利用して同様のスクリーニングが可能であることを着想し、これを明らかにした。

[0044] したがって、一態様において本開示における第3の分子は、第1の部分および第2の部分が近接または会合した場合に、該第1の部分および／または該第2の部分と反応または結合することができる分子である。また一態様において本開示における第3の分子は、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子との間で複合体が形成された場合に、該第1の部分および／または該第2の部分と反応または結合することができる分子である。

[0045] 本開示における一態様において、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子との間で複合体が形成された場合に、第1の部分および第2の部分は近接または会合していると言うことができる。また一態様において、第1の部分および第2の部分を含む複合体が形成されているときに、第1の部分および第2の部分は近接または会合していると言うことができる。

[0046] 本開示における第1の部分および第2の部分の近接、および、第1の部分および第2の部分の会合は、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子との間で複合体が形成されることに起因するものである限り、その程度および態様を問わない。例えば、本開示における第1の部分と第2の部分とが近接または会合している状態には、第1の部分と2の部分とが分子間力などによって結合した状態、および、これらが結合していない状態のいずれもが含まれる。

[0047] また上述のとおり、本開示におけるスクリーニング方法においては、第1

の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子との間で複合体が形成されない場合、第1の部分および第2の部分は近接も会合もしない。一態様において本開示における第3の分子は、第1の部分および第2の部分が近接も会合もしない場合に、該第1の部分および／または該第2の部分と実質的に反応も結合もしない分子である。また一態様において本開示における第3の分子は、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子との間で複合体が形成されない場合に、該第1の部分および／または該第2の部分と実質的に反応も結合もしない分子である。

[0048] また別の態様において本開示における第3の分子は、第1の部分および第2の部分が近接も会合もしていない場合に、第1の部分および第2の部分が近接または会合している場合と比較して、10分の1未満、20分の1未満、30分の1未満、または40分の1未満でしか、第1の部分および／または第2の部分と反応または結合しない分子である。また別の態様において、本開示における第3の分子は、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体が形成されていない場合、当該複合体が形成された場合と比較して、10分の1未満、20分の1未満、30分の1未満、または40分の1未満でしか、第1の部分および／または第2の部分と反応または結合しない分子である。

[0049] 第3の分子が、第1の部分および／または第2の部分と反応または結合するか否かは、例えば第1の標的分子としてFKBP (FK506 binding protein／FK506結合タンパク質)、第2の標的分子としてFRB (FKBP-rapamycin binding domain of FKBP12-rapamycin associated protein／FKBPーラパマイシン結合タンパク質のFKBPーラパマイシン結合ドメイン)、被験分子としてラパマイシンを使用して本開示におけるスクリーニング方法を行い、第1の部分にFKBPを連結させた分子、第2の部分にFRBを連結させた分子、ラパマイシン、および第3の分子を含む複合体の回収を試みたときに、または、第1の部分にFKBPを連結させた分子、第2の部分にFRBを連結させた分子、およびラパマイ

シンの分子を含む複合体の回収を試みたときに、当該複合体が回収されるか否かによって判定することができる。本開示においては、当該複合体が回収されたときに、上記第3の分子は第1の部分および／または第2の部分と反応または結合した分子と判定することができる。また一態様において、当該複合体が回収されないときに、上記第3の分子は第1の部分および／または第2の部分と実質的に反応も結合もしなかった分子と判定することができる。また本開示においては、ある分子の第1の部分および／または第2の部分への反応または結合の程度が、第1の部分および第2の部分と近接または会合している場合に第1の部分および／または第2の部分と反応または結合することが可能な第3の分子のそれと比較して、10分の1未満、20分の1未満、30分の1未満、または40分の1未満である場合に、当該ある分子は、第1の部分および／または第2の部分と実質的に反応も結合もしなかった分子であると判定することができる。第1の部分にFKBPを連結させた分子、第2の部分にFRBを連結させた分子、ラパマイシン、および第3の分子を含む複合体、または、第1の部分にFKBPを連結させた分子、第2の部分にFRBを連結させた分子、およびラパマイシン、および第3の分子を含む複合体が回収される否か、またはその回収率は、例えば、ラパマイシンに連結された核酸の量（分子数）を指標に算出することができる。

[0050] また本開示においては、（a）第1の標的分子としてFKBP、第2の標的分子としてFRB、被験分子としてラパマイシンを使用して本開示におけるスクリーニング方法を行った場合に得られるラパマイシンの回収率と、（b）第2の標的分子を用いずに、第1の標的分子としてFKBP、被験分子としてラパマイシンを使用して本開示におけるスクリーニング方法を行った場合に得られるラパマイシンの回収率、または、（c）第1の標的分子を用いずに、第2の標的分子としてFRB、被験分子としてラパマイシンを使用して本開示におけるスクリーニング方法を行った場合に得られるラパマイシンの回収率、とを比較したときに、（a）における回収率が（b）または（c）における回収率の5倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、または

40倍以上である場合に、第3の分子は第1の部分および第2の部分が近接または会合した場合に、第1の部分および／または第2の部分と反応または結合する分子であると判定することができる。言い換えれば、この場合、第3の分子は、第1の標的分子および第2の標的分子のいずれか一方のみを含む複合体とは有意に反応または結合せず、被験分子、第1の部分に連結した第1の標的分子および第2の部分に連結した第2の標的分子を含む複合体のみと有意に反応または結合する分子であると判定することができる。また一態様において、上記(a)と上記(b)または(c)とを比較したときに、(a)における回収率が(b)または(c)における回収率の5倍未満、10倍未満、15倍未満、20倍未満、30倍未満、または40倍未満である場合に、第3の分子は第1の部分および第2の部分が近接または会合した場合に、第1の部分および／または第2の部分と実質的に反応も結合もしない分子であると判定することができる。このような評価は、例えば実施例の記載に基づいて行うことができる。

[0051] 上述のとおり本開示におけるスクリーニング方法は、Split GFP技術に代表されるSplit protein系にアフィニティーを利用した候補分子の回収方法を適用したことを特徴の1つとする。すなわち本開示におけるスクリーニング方法は、第3の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、候補分子、および第3の分子を含む複合体、または、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を回収する工程を含む。したがって本開示における第3の分子は、アフィニティーを利用した複合体の回収のためのタグを有していてもよい。一態様において、第3の分子は、ビオチン化のためのタグ配列を有していてもよい。加えて、第3の分子は、精製のためのタグ、リンカー、および／またはその他の配列を含んでいてもよい。

[0052] 第1の部分、第2の部分

本開示の一態様において第1の部分および第2の部分とは、あるタンパク

質の一部を構成する部分または断片であることができる。一態様において、前記部分または断片は、該タンパク質の本来の機能や活性を有さない。本開示における第1の部分および第2の部分は、タンパク質を2つ、3つ、またはそれ以上に分割することによって得られるタンパク質の部分（断片）であることができる。あるいは、本開示の一態様における第1の部分および第2の部分は、これらが近接または会合した時に元のタンパク質の全部または一部を構成する部分であることができる。ここで、分割されたタンパク質の各部分は、一部重複するアミノ酸配列を有していてもよい。一態様において、そのような重複するアミノ酸配列は、分割されたタンパク質の各部分の末端部分に存在することができる。第1の部分および第2の部分が会合した場合に元のタンパク質の全部を構成する態様においては、第1の部分と第2の部分とが会合したタンパク質は、該タンパク質が分割される前に有していた構造、機能または活性を有し得る。また第1の部分および第2の部分が会合した場合に元のタンパク質の一部を構成する態様においては、第1の部分と第2の部分とが近接または会合したタンパク質は、該タンパク質を構成する他の部分、例えば、第3の分子とさらに会合するによって、該タンパク質が分割される前に有していた構造、機能または活性を有し得る。前者のタンパク質の例として、SNAPタグおよびユビキチンが挙げられ、後者のタンパク質の例として、GFPおよびルシフェラーゼが挙げられる。

なお本開示においては、第1の部分および第2の部分が由来するタンパク質を、「第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質」と称する場合がある。

[0053] 本開示において、第1の部分および／または第2の部分のアミノ酸配列は、第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質の野生型のアミノ酸配列と同じでもよいし、異なってもよい。例えば、第1の部分や第2の部分の調製や安定性等に適したアミノ酸の改変（1または複数のアミノ酸の欠失、挿入、置換および／または付加）が行われてもよい。

[0054] 第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体

本開示におけるスクリーニング方法においては、候補分子が第1の標的分子および第2の標的分子と複合体を形成することが可能な分子である場合、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体が形成される。一態様において、当該複合体から第1の部分および第2の部分を除去すると、第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体を取得することができる。本開示において第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体は、好ましくは、第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子から構成される複合体、または第1の標的分子、第2の標的分子、候補分子、および、第3の分子から構成される複合体である。また一態様において、本開示における複合体は、前記3者または4者を含む限り、他の分子を含む4者、5者、または6者以上の複合体であってもよいが、好ましくは、3者複合体である。

[0055] 本開示における複合体は、第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子とが複合体を形成している限り、その態様は問わない。すなわち本開示における複合体には、候補分子が第1の標的分子と第2の標的分子の両方に結合することにより複合体を形成する態様が含まれる。このような態様には、候補分子を介して第1の標的分子および第2の標的分子とが結合しているものや、候補分子、第1の標的分子および第2の標的分子のいずれもが、他の二者の両方と結合しているものが包含される。また一態様において、本開示における第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体には、候補分子が第1の（または第2の）標的分子と結合し、第1の（または第2の）標的分子が第2の（または第1の）標的分子と結合することにより3者の複合体が形成される態様もまた包含される。このような態様においては、候補分子は第2の（または第1の）標的分子とは直接には結合していない。また、一態様において、候補分子が第1の（または第2の）標的分子と結合することで、第1の（または第2の）標的分子の構造が変化し、第1の（または第2の）標的分子と第2の（または第1の）標的分子の結合

親和性が向上することにより3者の複合体の形成が促進される態様もまた包含される。このような態様においては、候補分子は第2の（または第1の）標的分子とは直接には結合していない。

[0056] なお上述のとおり、本開示における第1の部分および第2の部分はタンパク質（具体的には、第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質）の断片である。したがって、本開示における「第1の部分に連結した第1の標的分子および第2の部分に連結した第2の標的分子を含む複合体」は、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質の全部または一部を含む。具体的には、例えば第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質が後述のGFPやルシフェラーゼの場合の一態様において、当該複合体はGFPやルシフェラーゼの一部を含む。一方、例えば第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質がSNAPタグまたはユビキチンの場合の一態様において、当該複合体は、SNAPタグまたはユビキチンの全部を含む。

[0057] 第1の部分に連結した第1の標的・第2の部分に連結した第2の標的

本開示において、第1の部分と第1の標的分子、第2の部分と第2の標的分子はリンカーを介して連結されていてもよい。本開示においては、第1の部分と第1の標的分子の間のリンカーを第1のリンカー、第2の部分と第2の標的分子の間のリンカーを第2のリンカーと呼ぶことができる。リンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は化学合成により導入し得るリンカー（例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996参照）等を用いることができるが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは8アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは12アミノ酸である。

[0058] 例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser

Gly・Ser

Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly

Gly · Gly · Ser · Ser (配列番号 : 88)

Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 89)

Ser · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 90)

Gly · Ser · Gly · Ser (配列番号 : 91)

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 92)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 93)

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 94)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 95)

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 96)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 97)

(Gly · Gly · Gly · Gly · Ser)_n

(Ser · Gly · Gly · Gly · Gly)_n

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser · Gly · Gly · Gly · Ser Gly · Gly · Ser (配列番号 : 124)

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0059] また一態様において、後述のとおり本開示におけるリンカーは、酵素によって切断可能なリンカーを含むことができる。このような酵素としては、TEVプロテアーゼ (Tobacco Etch Virus Protease) が例示され、本開示においては、安定性、活性、特異性などを向上するための改良が加えられたTEVプロテアーゼを利用してもよい。このようなTEVプロテアーゼは試薬会社から購入可能である。TEVプロテアーゼによって切断されるリンカーとしては、以下が例示される :

Glu · Asn · Leu · Tyr · Phe · Gln · Gly (配列番号 : 2)。

[0060] 被験分子・ライブラリ

本開示における被験分子としては、特に制限はなく、例えば、天然物、有

機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチド、アミノ酸等の単一化合物、並びに、化合物ライブラリ、遺伝子ライブラリの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物もしくは動物細胞抽出物等を挙げることができる。これらは精製物であっても、また植物、動物又は微生物等の抽出物等のように粗精製物であってもよい。また被験分子の製造方法も特に制限されず、天然物から単離されたものであっても、化学的又は生化学的に合成されたものであっても、また遺伝子工学的に調製されたものであってもよい。

[0061] 一態様において、本開示における被験分子はポリヌクレオチドによりコードされている分子であることができる。このような分子としてペプチドが挙げられる。また本開示における被験分子は、タグとなるポリヌクレオチドに連結されたペプチドであってもよい。また本開示における被験分子は、分子量が3000以下、または2000以下であってもよい。なおここでの分子量は、被験分子がタグとしてのポリヌクレオチドや、それと連結するためのリンカーを含む場合、ポリヌクレオチドやリンカーを除いた部分の分子量を指す。

[0062] 本開示においてペプチドとは、2以上のアミノ酸がアミド結合及び／又はエステル結合で結合したものをいう。限定を意図しないが、本開示におけるペプチドには、鎖状ペプチド、及び環状ペプチドが含まれる。また、本開示におけるペプチドには、ペプチド、ペプチドとポリヌクレオチドの複合体（ペプチドーポリヌクレオチド複合体）、ペプチドとリボソームとポリヌクレオチドの複合体等が含まれる。また、本開示における「ポリヌクレオチド」にはDNA、mRNA、及びtRNAが含まれる。また、本開示における「ペプチド」には、その薬学的に許容される塩が含まれてもよい。

[0063] 本開示におけるペプチドは、一態様において、2～100個、3～50個、4～30個、または5～20個のアミノ酸が、アミド結合及び／又はエステル結合により連結されている。例えば、一態様において、本開示におけるスクリーニング方法によって得られるペプチドを医薬品として使用する場合

、高い膜透過性を獲得するために、ペプチドを構成するアミノ酸の数は20以下が好ましく、18以下、16以下、15以下、又は14以下がより好ましく、13以下が特に好ましく、具体的には、9、10、11、12、13が例示される。また高い代謝安定性を獲得するためには、ペプチドを構成するアミノ酸の数は8以上であることが好ましく、9以上がより好ましく、10以上が更に好ましく、11以上が特に好ましい。膜透過性と代謝安定性の両立を考慮すると、ペプチドを構成するアミノ酸の数は5～20、又は7～20が好ましく、7～17、8～16、9～16、又は10～16がより好ましく、8～13、10～15、11～15、10～14、10～13、又は11～14がさらに好ましく、11～13が特に好ましい。

[0064] 環状ペプチドの環状部を構成するアミノ酸の数は限定されないが、例えば、4以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上のいずれかと、20以下、18以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下のいずれかとの組み合わせによって特定可能な範囲が挙げられる。膜透過性と代謝安定性の両立を考慮すると、前記環状部を構成するアミノ酸の数は、5～16が好ましく、5～15、5～14、7～14、又は8～14がより好ましく、8～13、9～13、8～12、8～11、又は9～12がさらに好ましく、9～11が特に好ましい。一態様において、環状ペプチドの環状部を構成するアミノ酸の数として、例えば、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16を挙げることができる。なお、本開示においてペプチドの「環状部」とは、4以上のアミノ酸残基が連結され、形成されている環状の部分の意味する。

[0065] 非限定の一態様において、本開示における環状ペプチドは直鎖部を有していてもよい。本開示において、環状ペプチドの部分構造を指す際に使用される「直鎖部」とは、環状部の主鎖構造に含まれない部分であって、該部分の鎖上に少なくとも一つのアミド結合及び／又はエステル結合を有するものをいう。直鎖部のアミノ酸の数（ユニットの数）は0～8であることが好ましく、0～5がより好ましく、0～3がより好ましい。なお、非限定の一態様

において、本開示における直鎖部には天然アミノ酸や非天然アミノ酸（化学修飾や骨格変換されたアミノ酸を含む）が含まれる場合がある。

[0066] 非限定の一態様において、本開示におけるペプチドに含まれる非天然アミノ酸の数は、2以上が好ましく、4以上、又は5以上がより好ましく、6以上が更に好ましく、また、20以下、15以下、14以下、13以下、12以下、10以下が好ましく例示される。本開示におけるペプチドに含まれる非天然アミノ酸の数としては、環状部を構成するアミノ酸の数の30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上以上が例示される。また、本開示におけるペプチドに含まれる非天然アミノ酸の種類は、1以上が好ましく、2以上、3以上、又は4以上がより好ましく、7以上が更に好ましく、また、20以下、15以下、14以下、13以下、12以下、10以下が好ましく例示される。

[0067] なお本開示における被験分子は、本開示における第1の標的分子および第2の標的分子のいずれか一方に結合することが既に知られているものであってもよい。また本開示における被験分子は、公知のスクリーニング系において選択された分子であってもよい。したがって本開示におけるスクリーニング方法は、工程（1）の前に公知のスクリーニング系を使用して被験分子を取得する工程をさらに含むことができる。本開示におけるスクリーニング方法においては、このようにして取得された被験分子（例えば、第1の標的分子および第2の標的分子のいずれか一方に結合することが既に知られている分子等）を工程（1）における被験分子として使用することができる。

[0068] 本開示における被験分子はライブラリを構成することができる。本開示におけるライブラリには、核酸（「ポリヌクレオチド」ともいう）によりタグ付け（すなわち、エンコード）されたライブラリ（例えば、DNAエンコードライブラリ；DNA-encoded library/DEL、mRNAディスプレイライブラリ、DNAディスプレイライブラリ；例えば *Molecules*, 2019 Apr; 24(8): 1629. を参照。）、タグ無しの化合物ライブラリが含まれる。また本開示におけるライブラリとしては、ディスプレイライブラリが好ましい。ディスプレイライブラ

リとしては、ディスプレイを利用したライブラリが例示され、中でも mRNA ディスプレイライブラリ、DNA ディスプレイライブラリ、リボソームディスプレイライブラリが好ましく、mRNA ディスプレイライブラリがより好ましい。

[0069] 核酸によりタグ付け（エンコード）されたライブラリは、ライブラリを構成する各化合物がバーコードとなる特異的なポリヌクレオチドによりタグ付けされたライブラリである。このライブラリを使用して、標的分子に特異的に結合できる候補分子をスクリーニングすることができる。例えば、所望の標的にライブラリを接触させ、標的に結合しない分子を洗い流すことで、標的に結合する候補分子の濃縮が可能である（パニング法）。このような過程を経て選択された候補分子に対応付けられているタグを解析することで標的に結合した候補分子を明らかにすることができる（例えばW02013/100132を参照）。

[0070] 被験分子としてペプチドが用いられる場合、表現型であるペプチドとその遺伝子型であるペプチドをコードする RNA もしくは DNA が対応付けられる。例えば、アミノアシル tRNA のアナログである抗生物質ピューロマイシンがリボソームによる mRNA 翻訳伸長中の蛋白質に非特異的に連結されることを利用する方法が mRNA ディスプレイ (Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:12297-302. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Roberts RW, Szostak JW.) ないしは in vitro virus (FEBS Lett. 1997;414:405-8. In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H.) として報告されている。

[0071] T7 プロモーターなどのプロモーターを含む DNA ライブラリから転写にて得た mRNA のライブラリの 3' 端にピューロマイシンなどのスペーサーを結合しておき、無細胞翻訳系で mRNA をタンパク質に翻訳させるとピューロマイシンがリボソームによってアミノ酸と間違えてタンパク質に取り込ま

れ、mRNAとこれにコードされる蛋白質が連結され、mRNAとその産物が対応付けられたライブラリになる。この過程では大腸菌などの形質転換を含まないため高い効率が実現され、大規模なディスプレイライブラリを構築することが出来る。パニングで濃縮、選択された分子についている遺伝子情報を含むタグであるmRNAからcDNAを合成し、PCR増幅し、塩基配列を解析することで結合したペプチドの配列を明らかにすることが出来る。

[0072] 無細胞翻訳系を利用したディスプレイライブラリには、mRNAディスプレイの他に、ペプチドとピューロマイシンの複合体が結合しているペプチドをコードするcDNAからなるライブラリであるcDNAディスプレイ(Nucleic Acids Res. 2009;37(16):e108.cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions.Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, Sasaki T, Machida M, Kubo T, Funatsu T, Husimi Y, Nemoto N.)、mRNA翻訳中にリボソームと翻訳産物が比較的安定な複合体であることを利用したりリボソームディスプレイ(Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:9022-6. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ.)、bacteriophage endonuclease P2AがDNAと共有結合を形成することを利用したcovalent display(Nucleic Acids Res. 2005;33:e10.Covalent antibody display--an in vitro antibody-DNA library selection system.Reiersen H, Lobersli I, Loiset GA, Hvattum E, Simonsen B, Stacy JE, McGregor D, Fitzgerald K, Wellschof M, Brekke OH, Marvik OJ.)、微生物のプラスミドの複製開始蛋白RepAが複製開始点oriに結合することを利用したCIS display(Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:2806-10. CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. Odegrip R, Coomber D, Eldridge B, Hederer R, Kuhlman PA, Ullman C, Fitzgerald K, McGregor D.)が知られている。また、DNAライブラリを構成するDNAの1分子毎に転写翻訳系をwater-in-oilエマルジョンやリボソームに封入し、翻訳反応を行うin vitro co

mpartmentalization(Nat Biotechnol. 1998;16:652-6. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. Tawfik DS, Griffiths AD.)も知られている。適宜、公知の方法を用いて上記方法を使用することができる。

[0073] タグ無しの化合物ライブラリとしては、核酸ライブラリ、核酸ライブラリを翻訳して得られるペプチドライブラリ、化学合成により得られる化合物のライブラリ等を例示することができる。ここでの「核酸」には、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）あるいは、人工塩基を有するヌクレオチド誘導体を含むこともできる。また、ペプチド核酸（PNA）を含むこともできる。本開示において核酸は、目的とする遺伝情報が保持される限り、これらの核酸のいずれか、あるいは混成とすることもできる。すなわち、DNA-RNAのハイブリッドヌクレオチドやDNAとRNAのような異なる核酸が一本鎖に連結されたキメラ核酸も本開示における核酸に含まれる。

[0074] ペプチドライブラリに含まれるペプチドの鋳型となる核酸のライブラリとしては、mRNAライブラリ、DNAライブラリ等が例示される。ペプチド配列上でアミノ酸残基を固定しない箇所は塩基を混ぜて合成することによって、核酸ライブラリを得ることができる。例えば、DNAライブラリとしては、A, T, G, C、RNAライブラリとしては、A, U, G, Cのそれぞれ4塩基の混合(N)の3の倍数個の繰り返し、もしくはコドンの一文字目二文字目はN、三文字目はW, M, K, Sなどの2塩基の混合として合成する、さらに導入するアミノ酸の種類を16以下に抑えるのであれば、三文字目を1種類の塩基にする方法もある。また、コドンの3文字に相当するコドンユニットを用意し、これを任意の割合で混合して合成に用いることによってアミノ酸残基の出現頻度を自由に調整できる。

[0075] 無細胞翻訳系を用いてこれら核酸ライブラリを翻訳することができる。無細胞翻訳系を使用する場合、目的の核酸の下流にスペーサーをコードする配列を含むことが好ましい。スペーサー配列としては、グリシンやセリンを含む配列が挙げられるがこれに限定されない。またピューロマイシン、その誘導体などリボソームによる翻訳時にペプチドに取り込まれる化合物と核酸ラ

ライブラリの間には、RNA、DNA、ヘキサエチレングリコール（spc 18）のポリマー（例えば5つのポリマー）などで形成されるリンカーを含むことが好ましい。

- [0076] 本明細書において、ライブラリに含まれる被験分子のバリエーション（種類）の数のことを「多様性」という。本開示におけるライブラリに含まれる候補分子の多様性は特に限定されないが、 1×10^3 以上、 1×10^4 以上、 1×10^5 以上、 1×10^6 以上、 1×10^7 以上、 1×10^8 以上、 1×10^9 以上、 1×10^{10} 以上、 1×10^{11} 以上、及び 1×10^{12} 以上が例示される。これら多様性は、実測値に限定されるものではなく、理論値であってよい。

[0077] 候補分子

本開示における候補分子は、第1の標的分子および第2の標的分子と共に複合体を形成することが可能な分子である。該複合体は、第1の標的分子、第2の標的分子および候補分子を含む限り、他の分子を含んでいてもよく、3者複合体、4者複合体、5者複合体、またはそれ以上の分子から構成される複合体であってもよいが、3者複合体が好ましい。

- [0078] 本開示における候補分子は、第1の標的分子および第2の標的分子と共に複合体を形成することが可能である限り限定されるものではないが、好ましくはペプチド、より好ましくは環状ペプチドが例示される。

- [0079] 一態様において本開示における候補分子は、それ単独で第1の標的分子への結合活性および第2の標的分子への結合活性を有する分子であることができる。また一態様において本開示における候補分子は、第1の標的分子および第2の標的分子に同時に結合し得る分子であることができる。また本開示における候補分子には、このような分子に加え、それ単独では第2の（または第1の）標的分子への結合活性を有さないものの、第1の（または第2の）標的分子に結合することによって該第2の（または該第1の）標的分子への結合活性を獲得し、それによって第1の標的分子および第2の標的分子に結合し得る分子も含まれ得る。このような分子として例えば、それ単独の時

よりも第1の（または第2の）標的分子へ結合した時の方が、第2の（または第1の）標的分子に対して2倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、またはそれ以上の結合親和性を有する分子が含まれる。さらに本開示においては、

（i）第1の（または第2の）標的分子と結合可能な候補分子であって、該結合に起因して、該候補分子の第2の（または第1の）標的分子に対する結合活性が、該結合前よりも高くなる分子、

（ii）第1の（または第2の）標的分子と結合可能な候補分子であって、該結合に起因して、該候補分子と該第1の（または該第2の）標的分子の複合体として該第2の（または該第1の）標的分子と結合可能になる分子、および

（iii）第1の（または第2の）標的分子と結合可能な候補分子であって、該結合に起因して、該第1の（または該第2の）の標的分子の第2の標的分子に対する結合親和性が、該結合前よりも高くなる分子もまた候補分子に包含され得る。

[0080] このような候補分子として例えば、第1の（または第2の）標的分子と結合することによって第1の（または第2の）標的分子の構造を変化させ、それによって第1の（または第2の）標的分子の第2の（または第1の）標的分子に対する結合親和性が高くなり、その結果、第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体の形成を導くことが可能な分子が含まれ得る。

[0081] 本開示における「第1の標的分子、第2の標的分子、および、候補分子を含む複合体」においては、候補分子は第1の標的分子のみに結合してもよく、第2の標的分子のみに結合してもよく、第1の標的分子と第2の標的分子の両方に結合してもよい。

[0082] 非限定の一態様において、本開示におけるスクリーニング方法により得られる候補分子は、公知の方法により化学修飾等することで最適化してもよい。また候補分子の誘導体を化学合成してもよい。本開示において「最適化」

とは、よりドラッグライクな分子となるように化学修飾する、より薬効標的に強い活性を有する分子となるように化学修飾する、及び/又は、より毒性が回避された分子となるように化学修飾することを意味する。例えば候補分子がペプチドの場合、ペプチド中のそれぞれのアミノ酸の構造を変換させることにより「最適化」することができる。本開示においては、このように最適化された候補分子または候補分子の誘導体の評価のために、これらを本開示におけるスクリーニング方法に供してもよい。

[0083] 標的分子

本開示において第1の標的分子および第2の標的分子は特に限定されず、タンパク質、ペプチド、核酸、糖、脂質などが例示されるが、中でもタンパク質を標的分子とすることが好ましい。また生体内における標的分子の存在場所も特に限定されない。一態様において、細胞内のタンパク質を標的分子とすることもできる。また一態様として、これまで創薬が困難とされてきた tough target への創薬を可能にし得るタンパク質を標的分子とすることができる。

[0084] 一態様において、第1の標的分子としてイムノフィリンファミリーに属するタンパク質、ユビキチンE3リガーゼ等が例示される。イムノフィリンファミリーに属するタンパク質としては、FKBP (FK506 binding protein/FK506 結合タンパク質)、シクロフィリン等を挙げることができる。また第2の標的分子も特に限定されるものではないが、第1の標的分子として例えばイムノフィリンファミリーに属するタンパク質を使用する場合、カルシニューリン、FRB (FKBP-rapamycin binding domain of FKBP12-rapamycin associated protein/FKBPーラパマイシン結合タンパク質のFKBPーラパマイシン結合ドメイン)、またはこれを含むタンパク質を例示することができる。

[0085] 別の一態様において、第1の標的分子としてKras、Nras、Hras等のRasタンパク質を例示することができる。この場合、一態様において、第2の標的分子としてFKBPを例示することができる。

[0086] 一態様において、標的分子は固相担体に固定されていてもよい。例えば、

工程（４）および（５）において、片方の標的分子を固相担体に固定し、もう一方の標的分子を遊離の状態とすることができる。固相担体としては、標的分子を固定できる担体であれば特に限定されず、本分野で通常使用されるものを使用することができる。例えば、ビーズ（例えば、磁気ビーズ、ガラスビーズ）、メンブレン、マイクロプレート、シリコンチップなどが例示される。標的分子は、これらの固相担体に公知の方法で固定することができる。

。

[0087] アフィニティーを使用した方法

本開示におけるスクリーニング方法においては、第１の部分に連結した第１の標的分子、第２の部分に連結した第２の標的分子、および候補分子を含む複合体を、第３の分子を介したアフィニティーを利用した方法を用いて回収することができる。アフィニティーを利用した方法としてはプルダウン法を例示することができる。プルダウン法は、タンパク質またはタンパク質の複合体にタグを付け、該タグと該タグと相互作用するタンパク質との相互作用を利用し、該タンパク質またはタンパク質の複合体を検出する方法である。プルダウン法の一例として、第３の分子にタグを付け、該タグと相互作用するタンパク質との間の相互作用を利用することにより、第１の部分に連結した第１の標的分子、第２の部分に連結した第２の標的分子、候補分子、および第３の分子を含む複合体を選択することができる。一態様において、第３の分子とタグは、上述した本開示のリンカーを介して連結されていてもよい。また、一態様において、タグ自体を第３の分子として利用することもできる。この場合、近接または会合した第１の部分と第２の部分のいずれかまたは両方にタグ付けし、該タグと相互作用するタンパク質との間の相互作用を利用することにより、前記複合体を選択することもできる。上述のとおり本開示のスクリーニング方法においては、第３の分子は、第１の部分に連結した第１の標的分子、第２の部分に連結した第２の標的分子、および候補分子を含む複合体と特異的に反応または結合することができるので、当該第３の分子とのアフィニティーを利用することにより、第１の標的分子および第

2の標的分子と結合した候補分子を効率的に取得することができる。

[0088] 本開示においてタグとして利用可能なタンパク質と、当該タグと相互作用するタンパク質の組み合わせとしては、ビオチンまたはその誘導体とビオチン結合タンパク質（例えばストレプトアビジン）との組み合わせ、Strep-tag（登録商標）とStrep-Tactin（登録商標）との組み合わせ、SBP(Streptavidin binding peptide)-tagとストレプトアビジンの組み合わせ、公知のペプチドタグ（His-tag、HA-tag、FLAG-tagなど）とそれに対する抗体の組み合わせ等を例示することができる。

[0089] また本開示においては、抗原と抗体の間のアフィニティーを利用して、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を回収することもできる。具体的には、近接または会合した第1の部分および第2の部分を含む複合体を特異的に認識する抗体を使用して、第1の部分に連結した第1の標的分子、第2の部分に連結した第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を回収することができる。

[0090] 一態様において、本開示におけるスクリーニング方法においては、溶出により、候補分子、または候補分子を含む複合体を単離することができる。一態様において、溶出は、酵素反応または熱反応により行うことができる。更なる態様において、溶出は、第3の分子に含まれるリンカーを切断することによって行ってもよい。更なる態様において、溶出は、第1の部分と第1の標的分子の間に位置する第1のリンカー、および／または、タンパク質の第2の部分と第2の標的分子の間に位置する第2のリンカーを切断することにより行ってもよい。その場合、第3の分子に含まれるリンカー、または、第1のリンカーおよび／若しくは第2のリンカーは、例えば酵素反応により切断することができる。したがって本開示における第3の分子に含まれるリンカー、または、第1のリンカーおよび／若しくは第2のリンカーは、酵素により切断可能な配列を含むことができる。酵素と酵素により切断可能な配列の組み合わせとしては、TEVプロテアーゼとENLYFQG（配列番号：2）等が

挙げられる。第1の部分と第1の標的分子の間に位置する第1のリンカー、および／または、タンパク質の第2の部分と第2の標的分子の間に位置する第2のリンカーを切断する溶出方法によれば、第1の部分、第2の部分、または第3の分子等に結合した目的としない被験分子の回収率を更に抑えることができる点で有用である。

[0091] 第1の部分、第2の部分、および第3の分子の具体的な態様

本開示におけるスクリーニング方法においては、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質として、GFP、ルシフェラーゼ、SNAPタグ、ユビキチンなどを例示することができ、本明細書におけるこれらの用語には、それぞれのアミノ酸改変体が含まれる。前記タンパク質として、GFP (Cabantous, S. et al. Sci Rep. 2013; 3: 2854. doi: 10.1038/srep02854, Wen-Xue J. et al. Sci Rep. 2016; 6: 20568. doi: 10.1038/srep20568 を例示として参照のこと。)、SNAPタグ (Analyst, 2012, 137, 4760-4765; Anal. Chem. 2016, 88, 8166-8171を例示として参照のこと。)、ユビキチン (PNAS July 3, 2007 104 (27) 11209-11214を例示として参照のこと。)、および、ルシフェラーゼ (例えば、深海エビ (トゲオキヒオドシエビ [Oplophorus gracilirostris]) 由来のルシフェラーゼ、中でもNanoluc (登録商標) が挙げられる。US2010/0281552、US2012/0174242およびUS2018/0172692、並びに、Andrew, D. et al. Sci Rep. 2017; 7: 8186. doi:10.1038/s41598-017-07569-y; Anal. Chem. 2018, 90, 3001-3004を例示として参照のこと。) が例示される。それぞれのアミノ酸配列としては、GFP (配列番号: 71)、SNAPタグ (配列番号: 82)、ユビキチン (配列番号: 75)、Nanoluc (配列番号: 78)などを例示することができ、これらのアミノ酸改変体を利用してもよい。

[0092] 本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質は、以下(a)～(c)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことができる;

(a) 配列番号: 71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号：71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および

(c) 配列番号：71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質は、当業者に周知の野生型のタンパク質およびアミノ酸が改変されたタンパク質を含む。

[0093] また本開示における第1の部分および第2の部分として、GFP、SNAPタグ、ユビキチン、またはルシフェラーゼ（例えばNano luc）を分割することによって得られる部分を例示することができる。前記分割は、2分割以上であればよく、3分割または4分割であってもよい。3分割する場合には、本開示における第1の部分および第2の部分としては、分割された断片のうち、分子量の小さい断片を使用することが好ましく、GFPにおけるGFP10およびGFP11、Nano lucにおけるNano luc-9およびNano luc-10が例示される。この場合、残りの断片（GFPにおけるGFP1-9、Nano lucにおけるNano luc1-8）を本開示における第3の分子に含めることができる。

なお本開示におけるユビキチンは、13番目のIleがAlaに置換されたユビキチン（I13A）であることが好ましい。

[0094] 具体的には、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質が例えばGFPの場合、全長GFP（配列番号：71）の192番目～210番目のアミノ酸配列からなる部分（配列番号：73）、および、前記全長GFPの211番目～231番目のアミノ酸配列からなる部分（配列番号：74）をそれぞれ、第1の部分および第2の部分、または第2の部分および第1の部分として例示することができる。なおGFPにおいて192番目～210番目のアミノ酸配列からなる部分はGFP10、211番目～231番目のアミノ酸配列からなる部分はGFP11として知られている。一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：73に記載のアミノ酸配列を

含むGFP10を用いることができる。また一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：74に記載のアミノ酸配列を含むGFP11を使用することができる。本明細書において、GFPの断片をsplit GFPと称することがあり、GFP1-9、GFP10、およびGFP11をそれぞれsplitGFP1-9、splitGFP10、およびsplitGFP11と称することがある。

[0095] また、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質が例えばSNAPタグの場合、全長SNAPタグ（配列番号：82）の1番目～91番目のアミノ酸配列からなる部分（SNAPタグのN末端側断片：配列番号：83）、および、全長SNAPタグの92番目～196番目のアミノ酸配列からなる部分（SNAPタグのC末端側断片：配列番号：84）をそれぞれ、第1の部分および第2の部分、または第2の部分および第1の部分として例示することができる。本開示において全長SNAPタグの1番目～91番目のアミノ酸配列からなる部分はSNAP(N)、92番目～196番目のアミノ酸配列からなる部分はSNAP(C)とも称される。一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：83に記載のアミノ酸配列を含むSNAP(N)を用いることができる。また一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：84に記載のアミノ酸配列を含むSNAP(C)を使用することができる。本明細書において、SNAPタグの断片をsplit SNAPと称することがある。

[0096] また、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質が例えばユビキチン（U13A）の場合、全長ユビキチン（配列番号：75）の1番目～37番目のアミノ酸配列からなる部分（ユビキチンのN末端側断片、配列番号：76）、および、全長ユビキチンの35番目～76番目のアミノ酸配列からなる部分（ユビキチンのC末端側断片、配列番号：77）をそれぞれ、第1の部分および第2の部分、または第2の部分および第1の部分として例示することができる。本開示において全長ユビキチンの1番目～37番目のアミノ酸配列からなる部分はsplitUb(N)、35番目～76番目のアミノ酸配列からなる部分はsplitUb(C)とも称される。一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：76に記載のアミノ酸配

列を含むsplitUb(N)を用いることができる。また一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：77に記載のアミノ酸配列を含むsplitUb(C)を使用することができる。

なお本開示においては、splitUb(N)とsplitUb(C)をリンカー（GSGS／配列番号：90）で連結させたタンパク質をsplitUb(N-C)と呼ぶことがある。本開示におけるユビキチンにはこのようなsplitUb(N-C)も含まれる。

本明細書において、ユビキチンの断片をsplitユビキチンまたはsplitUbと称することができる。

[0097] また、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質が例えばルシフェラーゼの一種であるNanolucの場合、全長Nanoluc（配列番号：78）の153番目～163番目のアミノ酸配列からなる部分（配列番号：80）、および、前記全長Nanolucの164番目～174番目のアミノ酸配列からなる部分（配列番号：81）をそれぞれ、第1の部分および第2の部分、または第2の部分および第1の部分として例示することができる。本開示において全長Nanolucの153番目～163番目のアミノ酸配列からなる部分はsplit Nanoluc-9、164番目～174番目のアミノ酸配列からなる部分はsplit Nanoluc-10とも称される。一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：80に記載のアミノ酸配列を含むsplit Nanoluc-9を用いることができる。また一態様において本開示におけるスクリーニング方法においては、配列番号：81に記載のアミノ酸配列を含むsplit Nanoluc-10を使用することができる。本明細書において、Nanolucの断片をsplit Nanolucと称することがあり、Nanoluc1-8、Nanoluc-9、およびNanoluc-10をそれぞれ、splitNanoluc1-8、splitNanoluc-9、およびsplitNanoluc-10と称することができる。

[0098] また本開示における第3の分子としては、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質がGFPである場合、全長GFPの1～191番目のアミノ酸配列を有するGFP1-9（配列番号：72）を含む分子が例示され、より具体的には配列番号：48のアミノ酸配列を有する分子が例示される。またタンパク質がSNAPタグである場合、SNAP-ビオチンが例示される。

またタンパク質がユビキチン（I13A）である場合、抗ユビキチン抗体が例示される。SNAP-ビオチンおよび抗ユビキチン抗体は当業者に周知のものを使用することができるが、全長ユビキチンに結合することができる一方で、その断片であるsplitユビキチンには結合することができない抗ユビキチン抗体が好ましく例示される。本開示における抗ユビキチン抗体は、splitUb(N)またはsplitUb(C)が近接または会合していない場合にはこれらを認識せず、splitUb(N)およびsplitUb(C)が近接または会合している場合に特異的に認識する抗体であることがより好ましい。抗ユビキチン抗体としては、Mouse IgG1モノクローナル抗体（クローン：FK2、[MBL社]）、Mouse IgG1モノクローナル抗体（クローン：1B3、[MBL社]）が例示される。また、タンパク質がNanolucである場合、全長Nanolucの1～152番目のアミノ酸配列を有するsplit Nanoluc1-8（配列番号：79）を含む分子が例示され、より具体的には配列番号：85のアミノ酸配列を有する分子が例示される。

[0099] 本開示におけるスクリーニング方法においては、例えば第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質がGFPの場合、例えばストレプトアビジンとビオチンとの相互作用を利用し、ビオチン化されたGFP1-9、GFP10に連結した第1の標的分子、GFP11に連結した第2の標的分子、および候補分子の複合体を回収することができる。また、前記タンパク質がNanolucの場合、例えばストレプトアビジンとビオチンとの相互作用を利用し、ビオチン化されたsplit Nanoluc1-8、splitNanoluc-9に連結した第1の標的分子、splitNanoluc-10に連結した第2の標的分子、および候補分子の複合体を回収することができる。また、SNAPタグは基質であるSNAP-ビオチンと結合すると、酵素反応によりビオチン化されたSNAPタグが生成される。したがって、本開示におけるタンパク質としてSNAPタグを使用する場合、SNAPタグに結合したビオチンとストレプトアビジンとの相互作用を利用することにより、ビオチン化されたSNAPタグ、第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子の複合体を回収することができる。本開示における第3の分子は、ビオチン化のためのタグ配列（例えば、Aviタグ配列（配列番号：1））、溶出のための切断配列（

例えば、TEVプロテアーゼによる切断配列)、精製のためのタグ配列(例えば、Hisタグ配列)、および／またはその他の配列を含んでいてもよい。

[0100] また一態様において、本開示におけるスクリーニング方法においては、第3の分子そのものを使用して第1の標的分子、第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を回収することもできる。例えば本開示におけるタンパク質としてユビキチンが用いられる場合、第3の分子である抗ユビキチン抗体とユビキチンとの間のアフィニティーに基づいて、splitUb(N)と連結した第1の標的分子、splitUb(C)と連結した第2の標的分子、および候補分子を含む複合体を回収することもできる。

[0101] 本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の分子には、上記アミノ酸配列を有するものに加え、上記アミノ酸配列において改変を有するものも含まれる。

[0102] 具体的には、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質には、配列番号：71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質に加え、

(1) 配列番号：71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質であって、それぞれ配列番号：71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質、および

(2) 配列番号：71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であって、それぞれ配列番号：71、75、78、または82で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質、
が包含される。

[0103] また、本開示における第1の部分、および第2の部分には、上記配列番号：73、74、76、77、80、81、83または84で表されるアミノ

酸配列を含むタンパク質に加え、

(1) 配列番号：73、74、76、77、80、81、83または84で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質であって、それぞれ配列番号：73、74、76、77、80、81、83または84で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質、および

(2) 配列番号：73、74、76、77、80、81、83または84で表されるアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であって、それぞれ配列番号：73、74、76、77、80、81、83または84で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

が包含される。

[0104] また、本開示における第3の分子としては、上記配列番号：72または79で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質が例示されるが、上述のとおり、プルダウンに利用されるビオチン化のためのAviタグ配列、溶出に利用されるTEVプロテアーゼによる切断配列、精製のためのHisタグ、および／またはその他の配列を含んでもよい。すなわち、一態様において、本開示における第3の分子としては、配列番号：72または79で表されるアミノ酸配列を含んでいさえすれば、本開示のスクリーニング法を実施できる限り、これにどのような配列が付加されていてもよい。例えば、本実施例では、GFP1-9として、Aviタグ（配列番号：1）、TEVプロテアーゼ切断配列（配列番号：2）、Hisタグ配列（配列番号：3）、およびGFP1-9（配列番号：72）を含むGFP1-9（配列番号：48）を使用している。

[0105] また、本開示における第3の分子には、

(1) 配列番号：48、72または79で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質であって、配列番号：48、72または79で表

されるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質、および
(2) 配列番号：48、72または79で表されるアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であって、配列番号：48、72または79で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

も包含される。

[0106] アミノ酸の付加、欠失、置換、及び／又は挿入は、当分野で公知の方法により行うことが可能である。例えば、アミノ酸配列をコードする核酸に対して、例えば部位特異的変異誘発法 (Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492(1985)) や overlap extension PCRを行うことができる。これらを適宜、単独でまたは組み合わせて行ってもよい。

[0107] 一般に、タンパク質における1つまたは複数(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または10を超える)のアミノ酸の改変(例えば、保存的な置換、欠失、挿入、および／または付加)は、そのペプチドの機能に影響を及ぼさず、または元のタンパク質の機能を強化しさえすることが知られている。アミノ酸は、その側鎖の特徴に応じて、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)に分類される。またアミノ酸の側鎖は、脂肪族側鎖(G、A、V、L、I、P)、ヒドロキシ基を含む側鎖(S、T、Y)、硫黄原子を含む側鎖(C、M)、カルボン酸およびアミドを含む側鎖(D、N、E、Q)、塩基を含む側鎖(R、K、H)、および芳香族を含む側鎖(H、F、Y、W)に分類することもできる。配列番号：71～84のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むタンパク質に含まれるアミノ酸を、同じ特徴を有するグループに分類される他のアミノ酸で改変されたタンパク質もまた、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の分子に含まれる。ただし、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、

第2の部分、および第3の分子は、配列番号：48、71～84のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等である限り、非保存的改変も含んでよい。

[0108] また本発明の一態様において、配列番号：48、71～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と高い配列の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質もまた、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の分子に包含される。本開示において高い同一性とは、アミノ酸配列全体あるいは塩基配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列の同一性を指す。配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0109] 本開示において「機能的に同等」とは、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の分子がアミノ酸の改変の前に有していた機能を保持していることをいう。具体的には、本開示における第1の部分と第2の部分が近接または会合していることを、第3の分子により検出することができる限り、それらはアミノ酸の改変の前後で機能的に同等であると判断される。一方、アミノ酸の改変を行ったことにより、本開示における第1の部分と第2の部分が近接または会合していることを、第3の分子により検出することができなくなった場合に

は、それらはアミノ酸の改変の前後で機能的に同等ではないと判断される。例えばGFPであれば、GFP10およびGFP11が近接した際にGFP1-9と会合する性質を保持していれば本開示のスクリーニング方法に利用できるため、仮にアミノ酸の改変がされていたとしても、前記性質を有していれば機能的に同等である。ルシフェラーゼ（例えば、Nanoluc）、SNAPタグ、およびユビキチンについても同様である。

[0110] 本開示における、アミノ酸配列において改変を有する、第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の分子は、当該タンパク質をコードする核酸を用いて調製することができる。このような核酸を調製するための方法として、例えば、site-directed mutagenesis法 (Kramer, W. and Fritz, H.-J. (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymology*, 154: 350-367) が挙げられる。あるいは、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, E.M. (1975) *Journal of Molecular Biology*, 98, 503) によっても、配列番号：48、71～84のいずれかに記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする核酸を得ることも可能である。すなわち、本開示における改変された、第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の部分をコードする核酸は、配列番号：48、71～84のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものであってもよい。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、当業者であれば、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4×SSC、50mM Hepes pH7.0、10×デンハルト溶液、20 μg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度で、より厳しい条

件としては「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度で、さらに厳しい条件としては「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」程度で実施することができる。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほど、配列番号：48、71～84のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列と高い相同性を有する核酸の単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0111] これにより単離された核酸は、アミノ酸配列のレベルにおいて、配列番号：48、71～84のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と高い相同性を有すると考えられる。また塩基配列のレベルにおいて、配列番号：48、71～84のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、上述の通り、アミノ酸配列全体あるいは塩基配列全体で、少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、または75%以上、さらに好ましくは80%以上、または85%以上、特に好ましくは90%以上、（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列の同一性を指す。

[0112] 本開示の核酸は、例えば、本開示における第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の分子、ならびにこれらのアミノ酸改変体の調製などに利用することが可能である。これら第1の部分および第2の部分を提供するタンパク質、第1の部分、第2の部分、および第3の分子、ならびにこれらのアミノ酸改変体を調製する場合には、通常、これらをコードする核酸を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して、発現させた改変されたタンパク質を単離、精製、培養する。このようなタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させ

ることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国New England BioLabs社発売のベクターpMALシリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ）、ヒスチジンタグ（例えば配列番号：3）を付加して調製する方法（Novagen社のpETシリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組み換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（Mandel, M., Higa, A. (1970) Journal of Molecular Biology, 53, 158-162、Hanahan, D. (1983) Journal of Molecular Biology, 166, 557-580）を用いることができる。宿主細胞内で発現させたタンパク質は、該宿主細胞またはその細胞培養物もしくは培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することが可能である。タンパク質を上記のマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。

[0113] 本開示の一態様において、核酸はベクターに挿入されたものであってもよい。ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）等で大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有するベクターが挙げられるがこれに限定されない。このようなベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBlue script、pCR-Script等が挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT

7等が挙げられる。タンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue等の大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature（1989）341, 544-546；FASEB J.（1992）6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら、Science（1988）240, 1041-1043）、またはT7プロモーター等を持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（ファルマシア社製）、「QIAexpress system」（キアゲン社製）、pEGFP、またはpET等が挙げられる。

[0114] また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol.（1987）169, 4379）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。また植物体内で発現するベクターとしてpMH1、pMH2、pCAMBIAなどのベクターが挙げられる。

[0115] 大腸菌以外にも、例えば、タンパク質を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロゲン社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17), p5322）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（ギブコBRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウィルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウィルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）等が挙げられる。

- [0116] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーター等を持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418等) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13等が挙げられる。
- [0117] 形質転換細胞は、例えば、タンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質の製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。
- [0118] 真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞 (例えば、上述のCHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞に加え、3T3、ミエローマ細胞、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero等の細胞)、両生類細胞 (例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340))、あるいは昆虫細胞 (例えば、sf9、sf21、Tn5等の細胞) が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。
- [0119] 植物細胞としては、後述の植物由来の細胞の他、例えば、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。
- [0120] また真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えば、アスペルギル

ス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られているがこれらに限定されない。

[0121] 非限定の一態様において、本開示は、本開示におけるスクリーニング方法によって得られた候補分子の製造方法に関する。例えば候補分子がペプチドの場合、当該ペプチドのアミノ酸配列に基づきペプチドを製造することができる。

[0122] 本明細書において、「 $1E+N$ 」は 1×10^N のN乗を意味する。例えば、 $1E+8$ は 1×10^8 の8乗を、 $1E+6$ であれば 1×10^6 の6乗を意味する。同様に、 $1.8E+12$ であれば 1.8×10^{12} の12乗を、 $3.03E+05$ であれば 3.03×10^5 の5乗を意味する。

[0123] 本明細書において、「および/または」との用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば、「A、B、および/またはC」には、以下の7通りのバリエーションが含まれる；

(i) A、(ii) B、(iii) C、(iv) AおよびB、(v) AおよびC、(vi) BおよびC、(vii) A、B、およびC。

[0124] 本明細書において、範囲を示す「～」とはその両端の値を含み、例えば、「A～B」は、A以上であり、かつB以下である範囲を意味する。

[0125] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0126] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

実施例中では以下の略号を使用した。

DMSO	ジメチルスルホキシド
DTT	ジチオスレイロール
FA	ギ酸
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン
TECP	トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン

T E A トリエチルアミン
H F I P ヘキサフルオロイソプロパノール

[0127] 実施例1 ビオチン化GFP1-9タンパク質の調製

ベクター調製

pET-15bベクターに、配列番号：15（D-1）の合成DNAをNde1/BamH1の制限酵素を使用して挿入した発現ベクターを調製した。

[0128] 合成DNA 配列番号：15（D-1）

DNA配列：

CATATGGGTGGCACCAGCAGCAAGGGCGAGGAAGTGTTCACCGGTGTGGTCCGATCCTGGTGGAGCTG
GACGGCGATGTTAACGGTCACAAATTTAGCGTGCGTGGTGAGGGCGAAGGTGACGCGACCATCGGCAAG
CTGACCCTGAAATTCATTAGCACCACCGGTAAACTGCCGGTGCCGTGGCCGACCCTGGTTACCACCCTG
ACCTACGGTGTGCAGGCGTTTAGCCGTTATCCGGACCACATGAAGCGTCACGATTTCTTTAAAGCGCG
ATGCCGGAGGGCTACGTTCAAGAACGTACCATTAGCTTCAAGGACGATGGCAAGTATAAAACCCGTGCG
GTGGTTAAATTTGAGGGCGATACCCTGGTTAACCGTATCGAGCTGAAGGGTACCGACTTCAAAGAAGAT
GGCAACATTCTGGGTCACAAGCTGGAATACAACCTTTAACAGCCACAACGTGTATATCACCGCGGACAAG
CAGAAAAACGGCATTAAAGCGAACTTCACCGTGCGTCACAACGTTGAGGACGGTAGCGTTCAACTGGCG
GATCACTACCAGCAAAACACCCGATTGGTGATGGTACCCGTGGCAGCGGTAGCATTGAAGGTCGTCAT
AGCGGCAGCGGTAGCCCGGTGCTGCTGCCGGACAACCACTATCTGAGCACCCAGACCGTTCTGAGCAAA
GATCCGAACGAGGCGGGCACTCGTGGCAGCGGTAGCATCGAAGGTCGTCACAGCGGCAGCGGTAGCCGT
GACCACATGGTGCTGCACGAATACGTTAACGCGGCGGGCATCACCCACGGTATGGACGAACTGTATAAA
GGCAGCGGCGGCACCTAAGGATCC

[0129] タンパク質にビオチン化のためのAviタグ配列（配列番号：1）、切断のためのTEVプロテアーゼ認識配列（配列番号：2）、精製のためのHisタグ（配列番号：3）を付加するために、Nco1/Nde1制限酵素を用いて、インサートタグ配列（配列番号：16）を目的タンパク質のN末端に挿入した。Ligation産物を使用して、大腸菌DH5 α コンピテントセル（東洋紡, #DNA-903）を形質転換し、クローニング後、挿入箇所の配列解析を行い、タグ付加発現ベクターの完成を確認した。

[0130] さらに発現効率とHisタグ精製の効率を上げるため、HisタグとORF配列の間の配列にGly-Gly-Ser-Ser（配列番号：88）の配列をPCRで挿入した。具体的には、1x Prime STAR Max Premix（タカラ）、2 μ M Fw-primer（配列番号：13）、2 μ M Rv-primer（配列番号：14）、1.4ng タグ付加発現ベクターを混合し、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 45秒のサイクルを30サイクル繰り返した。PCR産物を使用して、大腸菌DH5 α コンピテントセル（東洋紡, #DNA-903）を形質転換し、クローニング後、挿入箇所の配列解析を行い、本実施例で使用するGFP1-9発現ベクターの完成を確認した。

[0131] タンパク質発現および精製

大腸菌BL21（DE3）コンピテントセル（Novagen）を、GFP1-9発現ベクターと、pACYC184ベクターに大腸菌BirA遺伝子を導入したBirA発現ベクターで形質転換し、発現株を構築した。

[0132] 構築した大腸菌発現株を培地A（10g/L Tryptone, 5g/L Yeast Extract, 10g/L NaCl, 100 μ g/mL アンピシリン, 34 μ g/mL クロラムフェニコール）に植菌し、37℃、200rpmで培養した。OD₆₀₀=0.7に達した時点で、氷水にフラスコを5分浸して、4℃まで培養液の温度を下げた。0.5mM IPTG（イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド）、50 μ M Biotinになるように加え、19℃、200rpmで一晩培養することでビオチン化修飾を受けた目的タンパク質を発現させた。培養菌体は遠心により回収し、液体窒素で凍結した後、-80℃で保存した。

[0133] 凍結菌体をextraction buffer（50mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 1% CHAPS, 5% Glycerol, Proteinase Inhibitor Cocktail（EDTA-free））を用いて懸濁し、5kUnit/E.coliになるようにrLysozyme（Novagen, #71110-3）を添加した後、室温で20分放置した。再度懸濁し、超音波破碎した後、1M MgCl₂を0.2%v/vになるように、25U/ μ L benzonase（EMD millipore, #70746-2.5K UN）を0.03%v/vになるように加えて、再度室温で20分静置した。サンプルを遠心し回収した上清を、0.22 μ mフィルターでろ過した。

[0134] ろ過したサンプルを、HisTrap HP 5mL（GE Healthcare, #17-5248-02）を

使用して精製した。GFP10、GFP11部分を切断するため、溶出サンプルに終濃度2mMになるようにCaCl₂を加え、サンプルの1/100量 (w/w) のFactor Xa Protease (New England Biolabs, #P8010L) を加えた。透析カセット: Slide-A-Lyzer 10K Dialysis Cassettes G2 30 mL Capacity (Thermo Fisher, #87732) を用いて、サンプルを透析Buffer (50 mM Tris-HCl(pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) に置換した。

[0135] 透析サンプルを回収後、Streptavidin Mutein Matrix (Roche, # 03708152001) を用いて精製した。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、計10 mLをAmicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) により、3 mL volumeになるように濃縮した。6 M Gdn Buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 3 M Guanidine-Hydrochloride (pH8.0)) を等量加え、40分間氷上で変性させた。変性前後での吸収波長スペクトルの変化を確認して、変性していることを確認した後、HiLoad 26/600 Superdex 75 pg (GEヘルスケア, #28-9893-34) により、ゲル濾過精製した。ゲル濾過精製のRunning bufferとして、50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 3 M Guanidine Hydrochloride (pH8.0), 1 mM DTTを用いた。最後に変性剤のグアニジン除去し、リフォールディングさせるため、得られたサンプルを透析カセット: Slide-A-Lyzer 10K Dialysis Cassette 30 mL capacity (Thermo Fisher, #87732) で透析した。

[0136] SDS-PAGE分析の結果、目的タンパク質の理論分子量に対応する位置に単一バンドを示した。また、ビオチン化タンパク質とストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲルシフトアッセイにより、目的タンパク質がビオチン化されていることを確認した。SEC分析の結果、目的タンパク質の主成分は、32 kDaの分子量マーカースと同程度の保持時間を示し、かつ単量体として存在していることを確認した。SDS-PAGEのレーン情報を表1、結果を図1に、SEC分析の結果を図2に示す。SEC分析のカラムには、AdvanceBio SEC 300A 2.7 μm 4.6×150mm (Agilent社, #PL1580-3301)を使用した。

[0137]

[表1]

レーン	試料名	添加物	タンパク質量 (μ g)
1	Marker	-	-
2	GFP1-9	Streptavidin	1
3	GFP1-9	-	1
4	GFP1-9	-	0.1
5	-	Streptavidin	-

[0138] 実施例2 mRNA Displayを利用したsplitGFPの再会合アッセイ

複数の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子をライブラリからスクリーニングする際、一つの標的分子のみと複合体を形成する被験分子の回収率を低く抑えた系が必要となる。

[0139] そこで、GFP10（配列番号：40）、GFP11（配列番号：41）、およびGFP10-11連結体（配列番号：39）それぞれの、GFP1-9（配列番号：48）に対する結合能を評価した。GFP10、GFP11、およびGFP10-11連結体のそれぞれに核酸を連結させたDisplay分子を調製し、これらをGFP1-9とインキュベートし、GFP1-9に結合した分子の核酸部分をqPCRした。なお、本実施例では、N末端にAviタグ配列、TEVプロテアーゼ認識配列、およびHisタグ配列が付加されたGFPの1～9番目のストランドをGFP1-9、C末端にGSリンカーが付加されたGFPの10番目のストランドをGFP10、C末端にGSリンカーが付加されたGFPの11番目のストランドをGFP11、GFP9とGFP10が連結されC末端にGSリンカーが付加されたタンパク質をGFP10-11と表記することがある。

[0140] (1) mRNAの合成

鋳型DNA（配列番号：17（D-3）～配列番号：19（D-5））から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro 転写反応によりmRNA（配列番号：29（mR-1）～配列番号：31（mR-3））を合成し、RNeasy kit（Qiagen社）により精製した。

[0141] 鋳型DNA 配列番号：17（D-3）

DNA配列：GFP10-11

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGACCTGCCGACGACCA
CTACCTGTCTACCCAGACCATCCTGCTGAAAGACCTGAACGAAAAACGTGACCACATGGTTCTGCTGGA
ATACGTTACCGCGGCGGGTATCACCGACGCGTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAA

[0142] 鋳型DNA 配列番号 : 18 (D-4)

DNA配列 : GFP10

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGACCTGCCGGACGACCA
CTACCTGTCTACCCAGACCATCCTGCTGAAAGACCTGAACGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAA
AA

[0143] 鋳型DNA 配列番号 : 19 (D-5)

DNA配列 : GFP11

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGAAAAACGTGATCATAT
GGTGCTGCTGGAATATGTGACCGCGCGGGCATTACCGATGCGTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTC
TAAAAAAA

[0144] mRNA 配列番号 : 29 (mR-1)

GFP10-11 RNA配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGGACCUGCCGGACGACCACUACCUGUCUACCCAGACCAU
CCUGCUGAAAGACCUGAACGAAAAACGUGACCACAUGGUUCUGCUGGAAUACGUUACCGCGGGCGGUUAU
CACCAGCGCUGCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAAA

[0145] mRNA 配列番号 : 30 (mR-2)

GFP10 RNA配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGGACCUGCCGGACGACCACUACCUGUCUACCCAGACCAU
CCUGCUGAAAGACCUGAACGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAAA

[0146] mRNA 配列番号 : 31 (mR-3)

GFP11 RNA配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGGAAAAACGUGAUCUAUUGGUGCUGCUGGAAUAUGUGAC
CGCGGCGGGCAUUACCGAUGCGUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAAA

[0147] (2) mRNA Displayによる再会合アッセイ

mRNAとペプチドが連結されたDisplay分子を調製し、ビオチン化GFP1-9による回収率を調べた。W02013/100132に記載の方法で、上記で精製したmRNAの3'末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結し、これを翻訳することによりmRNA-ペプチドのDisplay分子を調製した。翻訳系は、原核生物由来の再

構成無細胞タンパク質合成系であるPUREfrex2.0 (GeneFrontier社) を用い、付属のプロトコルに従い翻訳した。

[0148] 各Display分子の提示率を確認するために、RNaseONE (Promega) によりRNA部分を分解し、TricinePAGEで、分泳動離した。Display分子を形成している場合は翻訳ペプチドとピューロマイシンリンカーの連結体となり、Display分子を形成していない場合は翻訳ペプチドの結合していないリンカーのみとなり、前者よりも低い位置に検出され、計二本のバンドが検出される。そのバンド比から、以下の式によりDisplay分子の提示率(%)を計算した。

[0149] $\text{Display分子の提示率(\%)} = \frac{\text{翻訳ペプチドとリンカーからなるバンド強度}}{\text{バンド強度の合計}} \times 100$

[0150] RNaseONEによる具体的な反応液は、1xReaction buffer、 $0.84\mu\text{M}$ 連結体、 $0.5\text{U}/\mu\text{L}$ RNaseONEを混合し、 37°C で1時間反応させた。

[0151] TricinePAGEの検出は、蛍光標識したピューロマイシンリンカーを検出した。TricinePAGEの結果得られた提示率は表2のようになった。

[0152] [表2]

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列	提示率
配列番号: 39	GFP10-11	MDLPDDHYLSTQTILLKDLNEKRDHMLLEYVTAAGITDASGSGSGSGSKK	56%
配列番号: 40	GFP10	MDLPDDHYLSTQTILLKDLNGSGSGSGSGSKK	84%
配列番号: 41	GFP11	MEKRDHMLLEYVTAAGITDASGSGSGSGSGSKK	92%

[0153] 再会合アッセイに使用する際は、蛍光標識のないピューロマイシンリンカーを使用し、翻訳産物は、mRNA部分での結合を回避するために逆転写を行った。具体的な方法としては、1xM-MLV RT Reaction buffer (Promega, #368B)、 0.5 mM dNTP、 $8\text{U}/\mu\text{L}$ M-MLV RT (H-) Point Mutant (Promega, #368B)、 $3\mu\text{M}$ Rv-primer (配列番号: 5)、 $0.5\mu\text{M}$ 翻訳産物になるように混合し、 42°C で1時間反応させた。

[0154] 1xTBSのバッファー中で、 $0.42\mu\text{M}$ の各Display分子と、 $1\mu\text{M}$ のビオチン化GFP1-9と混合し、室温で1時間反応させた。

[0155] Streptavidinコーティング磁気ビーズを用いたプルダウンによりビオチン化GFP1-9もしくはこれを含む複合体を回収し、tTBS (ナカライテスク) で数

回洗浄後、GFP1-9とビオチンとの間に導入したTEVプロテアーゼ認識配列を認識するTEVプロテアーゼにより切断し核酸の溶出を行った。具体的なTEV溶出液は、1xTEV buffer、1 mM DTT、0.2 U/ μ L AcTEVプロテアーゼ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#12575015）を、洗浄後のビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、相補性をもつprimer(Fw-primer（配列番号：4）、Rv-primer（配列番号：5））でqPCRをかけた。qPCRの反応液は、1xExtaq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、20 0000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95°Cで2分加熱後、95°C 10秒、57°C 20秒、72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。ビオチン化GFP1-9と反応させる前の各Display分子も同様にqPCRを行い、インプットの核酸量(分子数)を算出した。表中では核酸量（分子数）の単位を「分子」と表記した。

[0156] 各配列で検量線を引くために、核酸量（分子数）で、1E+8/ μ L、1E+7/ μ L、1E+6/ μ L、1E+5/ μ L、1E+4/ μ L、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0157] GFP1-9との結合により回収された各Display分子の核酸量を、GFP1-9と混合する前に存在していた各Display分子の核酸量（インプットの値）で割った見かけの回収率を算出し、さらに提示率で補正した回収率を、表3にまとめた。

[0158] 見かけの回収率(%) = 回収された核酸量(分子数)/インプットの核酸量(分子数) $\times$ 100

[0159] 回収率 (%) = 回収された核酸量(分子数) / (インプットの核酸量(分子数) $\times$ 各提示率 $\times$ 0.01) $\times$ 100

[0160] [表3]

	配列	GFP1-9	インプット核酸量 (分子)	回収された 核酸量 (分子)	見かけの回収率 (%)	回収率 (%)
1	GFP10-11	+	1.00E+12	1.31E+11	13.08042%	23.358%
2	GFP10	+	9.79E+11	2.32E+08	0.02374%	0.028%
3	GFP11	+	8.22E+11	8.95E+07	0.01089%	0.012%

[0161] 結果、GFP1-9によりGFP10-11連結体が回収され、GFP10単独、もしくはGFP1

1単独の回収率は、連結体の回収率に対し1000倍程度低いことが示された。すなわち、GFP1-9はGFP10（またはGFP11）の非存在下ではGFP11（またはGFP10）と会合しないこと、GFP1-9がGFP10およびGFP11と会合するためにはGFP10とGFP11とが近接、会合あるいは相互作用していることが必要であることが示された。この結果から、GFP10をある標的タンパク質に結合させた分子、GFP11を別の標的タンパク質に結合させた分子、およびGFP1-9を使用すると、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子（例えば、複数の標的分子の間の結合を増強または阻害する分子、複数の標的分子を連結する分子、複数の標的分子による複合体の形成を誘発する分子など）の効率的なスクリーニングが可能になることが示された。

[0162] 実施例3 GFPの再会合を利用した、ラパマイシン回収検証実験

次に、GFP10、GFP11にそれぞれ別のタンパク質を結合させた融合タンパク質を調製し、前記タンパク質が複合体を形成することによるGFP10、GFP11の近接効果で、GFP1-9により前記タンパク質の複合体を選択的に回収することが可能かを検証した。複合体形成のためのタンパク質ペアのモデルとして、FKBP（FK506-binding protein）とFRB（FKBP-Rapamycin binding domain of FKBP12-Rapamycin associated protein）を用いた。この二つのタンパク質はラパマイシン存在下で複合体を形成することが知られている。

[0163] ラパマイシンに化学的に核酸を結合させたラパマイシン-核酸を調製し、GFP1-9により、2つの融合タンパク質とラパマイシンの複合体が回収されるかどうかを検証した。

[0164] (1) ラパマイシン-クリックタグの調製

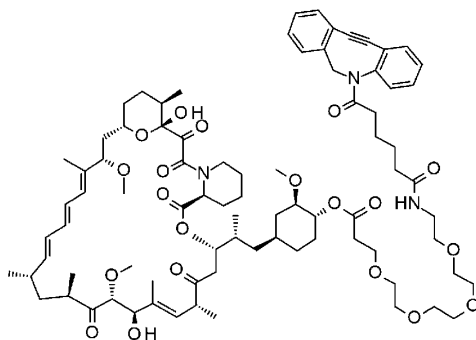
LCMSの分析条件は、下記のとおりである。

[表4]

分取条件	装置	カラム (I.D. x 長さ (mm))	移動相	勾配 (A/B)	流速 (ml/ 分)	カラム 温度 (°C)	波長
SQD FA05	Acquity UPLC/SQ D2	Aldrich Ascentis Express C18 2.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, in H ₂ O B) 0.1% FA in CH ₃ CN	95/5 => 0/100 (1.0 分間) => 0/100 (0.4 分 間)	0.9	35	210-400nm PDA total
LTQ TEA/HFIP 20_01	Acquity UPLC/LT Q Orbitrap XL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 50)	A) 15mM TEA, 400mM HFIP in H ₂ O B) 15mM TEA, 400mM HFIP in MeOH	80/20=>2/98 (9 .0 分 間) =>2/98 (1.0 分 間) =>80/20 (0. 1 分 間) =>80/20 (1. 9 分間)	0.20mL/ 分 (10.0 分) =>0. 40mL/mi n (2.0 分)	40	190-400nm PDA total

[0165] (1-1) ジベンゾシクロオクチン (D B C O) 修飾されたラパマイシン誘導体の合成

ラパマイシン, 42-[22-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-17, 22-ジオキソ-4, 7, 10, 13-テトラオキサ-16-アザドコサン-1-オアート]
(化合物 n k O 1) の合成



[0166] 窒素雰囲気下、ジベンゾシクロオクチン-PEG4-酸 (7.5 mg、0.013 mmol) をテトラヒドロフラン (THF) (64.3 μ L) に溶解し混合物を0°Cに冷却後、トリエチルアミン (2.7 μ L、0.019 mmol) および2, 4, 6-トリクロロベンゾイルクロリド (2.0 μ L、0.013 mmol) を加えて0°Cで1時間攪拌した。反応混合物にラパマ

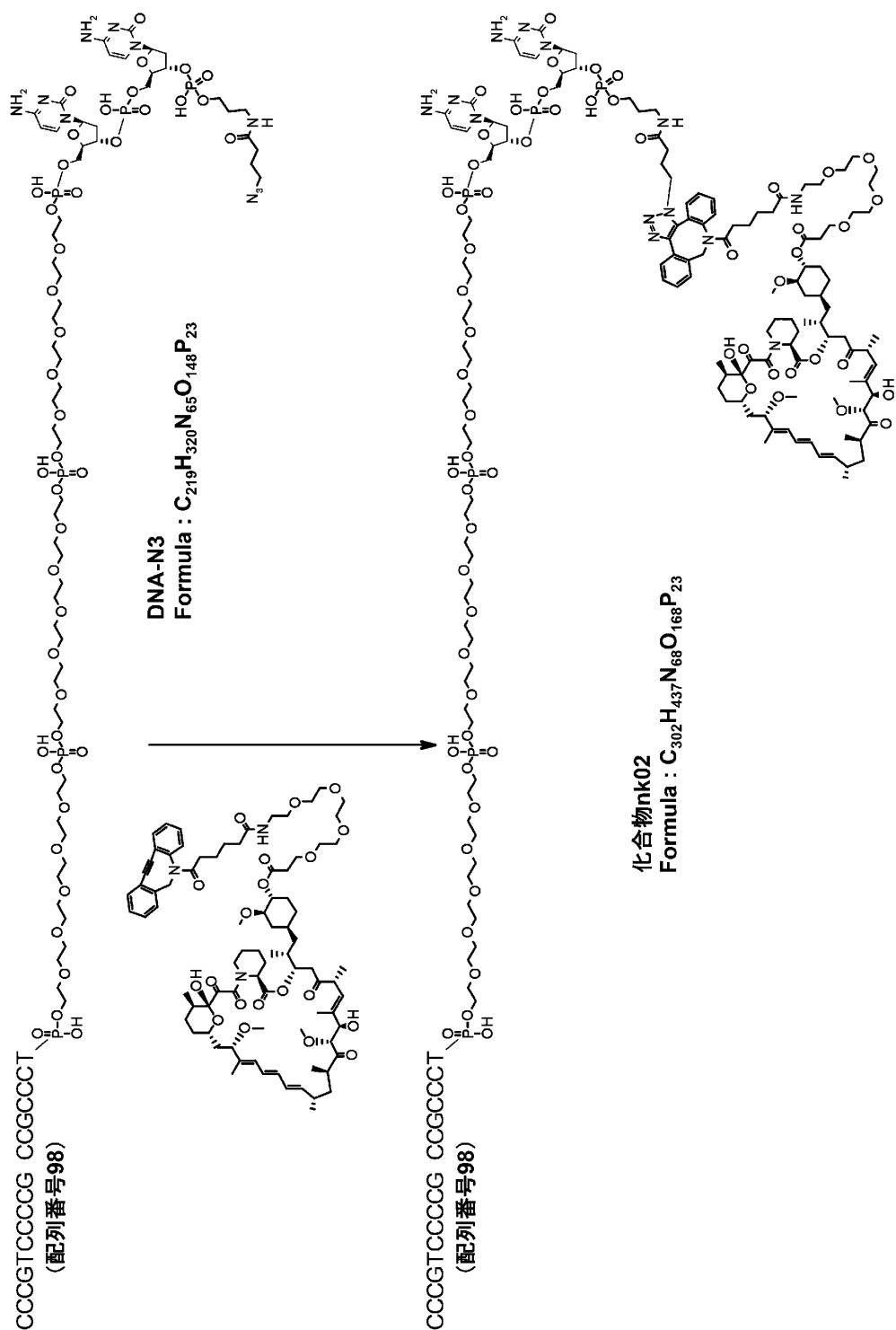
イシン (11.8 mg、0.013 mmol) および 4-ジメチルアミノピリジン (1.6 mg、0.013 mmol) を添加した。反応混合物を 0℃ で 5 分間攪拌したのち、15℃ で 3 時間攪拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、ラパマイシン, 42-[22-(11,12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-17,22-ジオキソ-4,7,10,13-テトラオキサ-16-アザドコサン-1-オアート] (化合物 nk01) (3.9 mg、21%) を得た。

[0167] LCMS (ESI) $m/z = 1477$ (M+H) +

保持時間: 1.15 分 (分析条件 SQDFA05)

[0168] (1-2) ラパマイシン-核酸の調製

化合物 nk02 の合成



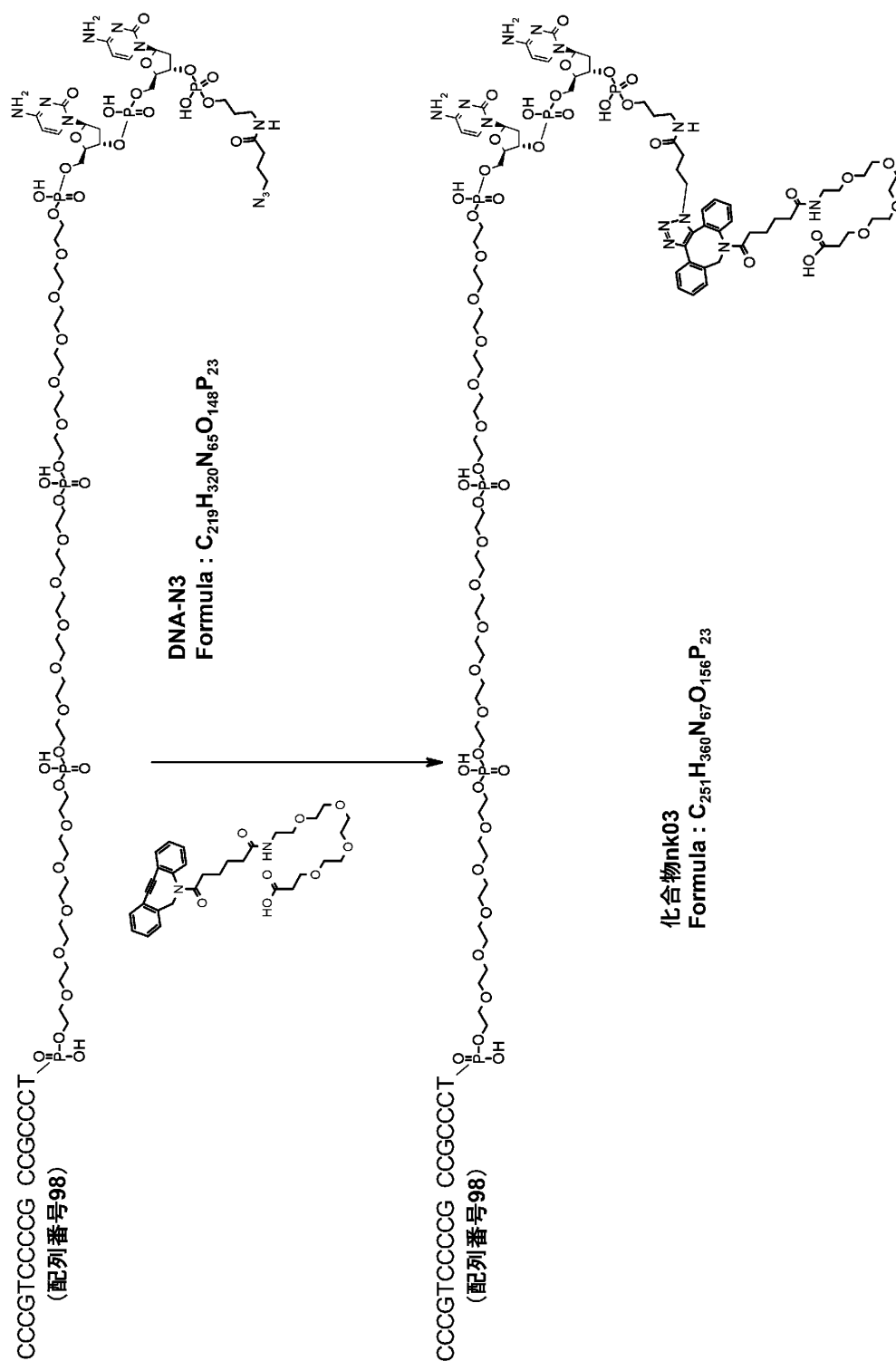
[0169] 1 0 mM 42-[22-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-17, 22-ジオキソ-4, 7, 10, 13-テトラオキサ-16-アザドコサン-1-オアート] (

化合物nk01)のDMSO溶液(20 μ L)、2mM DNA-N3(配列番号:98)の10mM酢酸ナトリウム水溶液(20 μ L)、DMSO(20 μ L)をそれぞれ加えて、37℃で16時間静置した。反応混合物に水(60 μ L)、クロロホルム-イソアミルアルコール混合液(120 μ L)を加えて、液液抽出を行い、水層を凍結乾燥し、得られた残差をDMSO(80 μ L)に溶かし、粗生成物(化合物nk02)のDMSO溶液を得た。

[0170] LC-HRMS: $m/z = 934.5680$ (M-9H)⁹⁻, Calcd 934.5685 (M-9H)⁹⁻, (Calcd for C₃₀₂H₄₃₇N₆₈O₁₆₈P₂₃: Molecular Weight 8420.4)

保持時間: 6.57分 (分析条件 LTQ TEA/HFIP20__01)

[0171] 化合物nk03の合成



[0172] 2.0 mM ジベンゾシクロオクチン-PEG4-酸のDMSO溶液 (2.

5 μ L)、2 mM DNA-N3 (配列番号: 98) の水溶液 (5 μ L)、20 mM 酢酸ナトリウム水溶液 (2.5 μ L) をそれぞれ加えて、37°C で16時間静置した。反応液を凍結乾燥し、得られた残差をDMSO (20 μ L) に溶かし、粗生成物 (化合物nk03) のDMSO溶液を得た。

[0173] LC-HRMS: $m/z = 1503.7145$ ($M-5H$)⁵⁻, Calcd 1503.7196 ($M-5H$)⁵⁻, (Calcd for $C_{251}H_{360}N_{67}O_{156}P_{23}$: Molecular Weight 7524.3)
保持時間: 3.61分 (分析条件 LTQ TEA/HFIP20__01)

[0174] (2) ラパマイシン-核酸の調製

化合物nk02もしくは化合物nk03に、T4 RNA ligaseにより、qPCRで検出するための核酸を連結し、モデル実験に使用するためのラパマイシン-クリックタグ-核酸分子 (化合物nk04, 化合物nk06) およびクリックタグ-核酸分子 (化合物nk05, 化合物nk07: ネガティブコントロールに使用) を調製した。

[0175] 鋳型DNA (配列番号: 20 (D-6), 配列番号: 120 (D-22), 配列番号: 121 (D-23)) から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7 (Promega社, P1300) を用いたin vitro 転写反応により鋳型mRNA (配列番号: 32 (mR-4), 配列番号: 122 (mR-17), 配列番号: 123 (mR-18)) を合成し、RNeasy Mini kit (Qiagen社) により精製した。1xligation buffer (50 mM HEPES · KOH (pH8.2), 10 mM MgCl₂, 2.67 mM DTT, 0.67 mM ATP)、10% PEG8000、32 μ M 化合物nk02もしくは化合物nk03、10 μ M mR-4、2 U/ μ L T4RNALigase (NEB, #M0204L) になるように混合し、37°C 1時間インキュベートし、ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応後、RNeasy Mini kit (Qiagen社) により精製し、調製した。配列番号: 32と化合物nk02が連結されたものを化合物nk04、配列番号: 32と化合物nk03が連結されたものを化合物nk05、配列番号: 122もしくは配列番号: 123と化合物nk02が連結された混合物を化合物nk06、配列番号: 122もしくは配列番号: 123と化合物nk03が連結された混合物を化合物nk07とした。

- [0176] 配列番号 : 120、配列番号 : 121の(Random)9は、AAC, ACT, AGG, AGT, ATT, CAG, CAT, CCG, CGG, CGT, CTA, GAA, GCT, GGT, GTA, TGC, TGG, TTTのいずれかのコドンがランダムに9残基出現する。
- [0177] 配列番号 : 122、配列番号 : 123の(Random)9は、AAC, ACU, AGG, AGU, AUU, CAG, CAU, CCG, CGG, CGU, CUA, GAA, GCU, GGU, GUA, UGC, UGG, UUUのいずれかのコドンがランダムに9残基出現する。
- [0178] 鋳型DNA 配列番号 : 20 (D-6)
GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAGTTTATGTTTTAGGAGAT
TCTGAGGCCGACCGGCACCGGCACCGGCATAGGGCGGCGGGGACAAA
- [0179] mRNA 配列番号 : 32 (mR-4)
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGCAGUUUAUGUUUAGGAGAUUCUGAGGCCGACCGGCAC
CGGCACCGGC GAUAGGGCGGCGGGGACAAA
- [0180] 鋳型DNA 配列番号 : 120 (D-22)
GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG(Random)9ATGCCGACCGG
CACCGGCACCGGCATAGGGCGGCGGGGACAAA
- [0181] 鋳型DNA 配列番号 : 121 (D-23)
GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG(Random)9TAGCCGACCGG
CACCGGCACCGGCATAGGGCGGCGGGGACAAA
- [0182] mRNA 配列番号 : 122 (mR-17)
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUG(Random)9AUGCCGACCGGCACCGGCACCGGC GAUAG
GGCGGCGGGGACAAA
- [0183] mRNA 配列番号 : 123 (mR-18)
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUG(Random)9UAGCCGACCGGCACCGGCACCGGC GAUAG
GGCGGCGGGGACAAA

(3) 融合タンパク質の調製

FKBPとGFP11を連結した融合タンパク質 (His6-FKBP12-Link12-GFP11、(塩基配列の配列番号 : 21、アミノ酸配列の配列番号 : 86) およびFRBとGFP10を連結した融合タンパク質 (GFP10-Link12-FRB-His6、塩基配列の配列番号

: 22、アミノ酸配列の配列番号: 87) を調製した。

[0184] 具体的には、発現ベクターにpET11aを用い、大腸菌BL21 (DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD600が0.5になるまで、アンピシリン入りのTB培地で培養し、0.5 mMのIPTGで誘導をかけ、Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11は37℃で4時間、GFP10-Link12-FRB-Hisx6は15℃で一晩培養した。回収した可溶性画分をProfinity IMAC Ni-Charged Resin(BIO-RAD)を用いて基本プロトコルに従い精製し、保存buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, pH 8.0) に入れて、-80℃で保存した。

[0185] 融合されるタンパク質の間には、12残基のGSリンカーを入れた。各タンパク質のアミノ酸配列は表5の通りである。

[0186] [表5]

配列番号	タンパク質名	アミノ酸配列
配列番号: 86	Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11	MHHHHHHMGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGKKFDSSRD RNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIP PHATLVFDVELLKLEGGGGSGGGSGGSTSEKRDHMLLEYVTAAGITDAS
配列番号: 87	GFP10-Link12-FRB-Hisx6	MDLPDNHYLSTQTILLKDLNDVGGGGSGGGSGGSEMWHGLEEASRLYFG ERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAGQWCRKYM KSGNVKDLTQAWDLYYHVFERRISKQHHHHHH

[0187] (4) GFPの再会合を利用した、ラパマイシン回収検証実験

化合物nk06と、GFP1-9、ラパマイシンを介して複合体を形成するタンパク質 (FKBPまたはFRB) とGFP11または10を連結した融合タンパク質 (Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11もしくはGFP10-Link12-FRB-Hisx6) を用いて、GFP10および11の近接効果によるGFP1-9との再会合の利用により、前記複合体を回収することができるかを、化合物nk06の核酸の回収量を指標に検証した。

[0188] 化合物nk06もしくは化合物nk07のmRNA部分での結合を回避するために、mRNA部位の逆転写を行った。1xM-MLV RT Reaction buffer (Promega, #368B)、0.5 mM dNTP, 8U/μL M-MLV RT (H-) Point Mutant (Promega, #368B)、3μM Rv-primer (配列番号: 6)、0.5μM化合物nk06もしくは化合物nk07になるように混合し、42℃で1時間反応させた。

[0189] 条件1では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11, GFP10-Link12-FRB-Hisx6、およびビオチン化GFP1-9をそれぞれ1μMになるように混合し、化合物nk06の逆転写産物を0.375μMに

なるように加えて、室温で1時間反応させた。

[0190] 条件2では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11, GFP10-Link12-FRB-Hisx6をそれぞれ1 μ Mになるように混合し、化合物nk06の逆転写産物を0.375 μ Mになるように加えて、室温で1時間反応させた。

[0191] 条件3では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11と、ビオチン化GFP1-9をそれぞれ1 μ Mになるように混合し、化合物nk06の逆転写産物を0.375 μ Mになるように加えて、室温で1時間反応させた。

[0192] 条件4では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、GFP10-Link12-FRB-Hisx6とビオチン化GFP1-9をそれぞれ1 μ Mになるように混合し、化合物nk06の逆転写産物を0.375 μ Mになるように加えて、室温で1時間反応させた。

[0193] 条件5では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11, GFP10-Link12-FRB-Hisx6、およびビオチン化GFP1-9をそれぞれ1 μ Mになるように混合し、化合物nk07の逆転写産物を0.375 μ Mになるように加えて、室温で1時間反応させた。

[0194] Streptavidinコーティング磁気ビーズを用いたプルダウンによりビオチン化GFP1-9もしくはこれを含む複合体を回収し、tTBS (ナカライテスク) で数回洗浄後、溶出buffer(1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer (配列番号: 4)、0.5 μ M Rv-primer (配列番号: 6))を加えて懸濁し、95°Cで10分間加熱して、核酸を溶出した。反応後、上清を回収し、相補性をもつprimer(Fw-primer (配列番号: 4)、Rv-primer (配列番号: 6))でqPCRをかけた。qPCRの反応液は、1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、200000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, 50513)、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95°Cで2分加熱後、95°C 10秒、57°C 20秒、72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0195] 各配列で検量線を引くために、核酸量で、1E+8/ μ L、1E+6/ μ L、1E+4/

μL、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0196] Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11とGFP10-Link12-FRB-Hisx6を介してGFP1-9との結合により回収された、化合物nk06もしくは化合物nk07の核酸の回収率を、インプットの値（アッセイに持ち込んだ化合物nk06もしくは化合物nk07の量）で割った回収率を以下の式から算出して、表6にまとめた。

[0197] 回収率（%）＝回収された核酸量/インプットの核酸量 × 100

[0198] [表6]

	サンプル				インプット核酸量 (分子)	回収された核酸量 (分子)	回収率 (%)
条件1	化合物nk06	splitGFP1-9	GFP10-FRB	FKBP12-GFP11	4.06E+11	3.50E+10	8.623%
条件2	化合物nk06	—	GFP10-FRB	FKBP12-GFP11	4.06E+11	9.54E+06	0.002%
条件3	化合物nk06	splitGFP1-9	—	FKBP12-GFP11	4.06E+11	8.21E+08	0.202%
条件4	化合物nk06	splitGFP1-9	GFP10-FRB	—	4.06E+11	2.24E+08	0.055%
条件5	化合物nk07	splitGFP1-9	GFP10-FRB	FKBP12-GFP11	4.89E+11	4.28E+08	0.088%

[0199] 結果、化合物nk06、Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11、GFP10-Link12-FRB-Hisx6、およびビオチン化GFP1-9のすべてが揃った条件（条件1）でのみ回収率が高かった。このことから、ビオチン化GFP1-9を介して化合物nk06が回収されるためには、Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11およびGFP10-Link12-FRB-Hisx6の両方が存在することが必要であり、GFPシステムを使用することでラパマイシンのように2種のタンパク質の相互作用を促進することができる分子を選択的に取得することが可能であることが示唆された。

[0200] ラパマイシンは、FKBP12タンパク質にはKd=12nM程度の結合力を示すことが知られている（J Am Chem Soc. 2005;127:4715-21）が、GFP10-Link12-FRB-Hisx6が存在しない条件では、ラパマイシンは回収されなかった（条件2）。実施例2の結果と合わせると、GFP10とGFP11のそれぞれに別の標的タンパク質を連結させれば、これら標的タンパク質との3者複合体を形成し得る試験化合物を選択的に回収することができ、いずれかの標的タンパク質とのみ複合体を形成し得る試験化合物は回収されないことが示された。

[0201] 実施例4 GFP以外のタンパク質の応用例

次に、GFP以外の分子でも、試験化合物を介した近接効果により標的タンパク質を回収することが可能か検証した。使用したタンパク質は、ヒトO6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (hAGT)を改変して作成され、ベンジルグア

ニン誘導体が特異的反応異質となるSNAPタグ、モノユビキチン、および、深海エビ（トゲオキヒオドシエビ[*Oplophorus gracilirostris*]）由来のルシフェラーゼ、Nanoluc（登録商標）である。

[0202] 実施例4-1 mRNA Displayを利用したsplitSNAP-tagの再会合アッセイ

split SNAP - tagは、SNAP - tagを91番目と92番目の残基間で分割したタンパク質であり、両者が近接することによって酵素活性が回復するため細胞内でのPPIのイメージングに用いられている。

[0203] この性質を応用し、split SNAP - tagのN末端分子、もしくはsplit SNAP - tagのC末端分子のみでは、ビオチン修飾されたSNAP - tag基質（SNAP - Biotin）とは反応せず、全長体のみが反応でき、これにより全長体の選択的な回収が可能か否かを検証するための実験を行った。

[0204] 実施例4-1-1 鋳型DNAの合成

pSNAPf vector（New ENGLAND BioLabs社）を鋳型とし、C末端にGSリンカーが付加されたSNAPタグN末端断片、C末端にGSリンカーが付加されたSNAPタグC末端断片、C末端にGSリンカーが付加された全長SNAPタグをそれぞれコードするDNA配列（配列番号：23（D-9）～配列番号：25（D-11））をPCRによって調製した。なお、本実施例では、C末端にGSリンカーが付加されたSNAP-tagN末端断片をSNAP(N)と、C末端にGSリンカーが付加されたSNAP-tagC末端断片をSNAP(C)、C末端にGSリンカーが付加された全長SNAPタグをSNAP（full）と表記することがある。

[0205] C末端にGSリンカーが付加されたSNAPタグN末端断片をコードするDNA（配列番号：23（D-9））の調製は、下記のプライマーを用いて二段階のPCRを実施することにより行った。

[0206] 1st PCRにおいては、pSNAPf vector（New ENGLAND BioLabs社）を鋳型とし、Fw-primer（配列番号：7）、Rv-primer（配列番号：8）を用いた。

[0207] 2nd PCRにおいては、1st PCR産物を鋳型とし、Fw-primer（配列番号：9）、Rv-primer（配列番号：10）を用いてPCRを行うことで目的のDNA配列（配列番号：23（D-9））を得た。

[0208] DNA 配列番号 : 23 (D-9)

DNA配列 : SNAP(N)

```
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGGACAAAGACTGCGAAAT
GAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACCG
TATCATCTTCCTGGGCAAAGGAACATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGCT
GGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTACCAGCCTGAGGCCAT
CGAGGAGTTCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCCAGTGTTCAGCAGGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTC
TGGCTCTAAAAAA
```

[0209] C末端にGSリンカーが付加されたSNAPタグC末端断片をコードするDNA（配列番号 : 24 (D-10)）の調製は、下記のプライマーを用いて二段階のPCRを実施することにより行った。

[0210] 1st PCRにおいては、pSNAPf vector (New ENGLAND BioLabs社)を鋳型とし、Fw-primer（配列番号 : 11）、Rv-primer（配列番号 : 12）を用いた。

[0211] 2nd PCRにおいては、1st PCR産物を鋳型とし、Fw-primer（配列番号 : 9）、Rv-primer（配列番号 : 10）を用いてPCRを行うことで目的のDNA配列(配列番号 : 24 (D-10))を得た。

[0212] DNA 配列番号 : 24 (D-10)

DNA配列 : SNAP(C)

```
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGGTCGACGAGAGCTTTAC
CCGCCAGGTGCTGTGAAAGTCTGAAAGTGGTGAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACAGCCACCTGGC
CGCCCTGGCCGGAATCCCGCCGCCACCGCCGCGTGAAAACCGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCCAT
TCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGCAGGGCGACCTGGACGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGT
GAAAGAGTGGCTGCTGGCCACGAGGGCCACAGACTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTCTGCAGGCGGATC
CGCGTTTAAACTCGAGGTTAATGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAA
```

[0213] C末端にGSリンカーが付加された全長SNAPタグをコードするDNA（配列番号 : 25 (D-11)）の調製は、下記のプライマーを用いて二段階のPCRを実施することにより行った。

[0214] 1st PCRにおいては、pSNAPf vector (New ENGLAND BioLabs社)を鋳型とし

、Fw-primer（配列番号：7）、Rv-primer（配列番号：12）を用いた。

[0215] 2nd PCRにおいては、1st PCR産物を鋳型とし、Fw-primer（配列番号：9）、Rv-primer（配列番号：10）を用いてPCRを行うことで目的のDNA配列（配列番号：25（D-11））を得た。

[0216] DNA 配列番号：25（D-11）

DNA配列：SNAP（full）

```
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGGACAAAGACTGCGAAAT
GAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACCG
TATCATCTTCCTGGGCAAAGGAACATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGCT
GGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTACCAGCCTGAGGCCAT
CGAGGAGTTCCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCCAGTGTTCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCT
GTGGAAGTGTGAAAGTGGTGAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACAGCCACCTGGCCGCCCTGGCCGG
CAATCCCGCCGCCACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTG
CCACCGGGTGGTGCAGGGCGACCTGGACGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCT
GCTGGCCCACGAGGGCCACAGACTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTCTCTGCAGGCGGATCCGCGTTTAAACT
CGAGGTTAATGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAAA
```

[0217] 実施例4-1-2 mRNAの合成

鋳型DNA（配列番号：23（D-9）～配列番号：25（D-11）から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro 転写反応によりmRNA（配列番号：33（mR-5）～配列番号：35（mR-7））を合成し、RNeasy kit（Qiagen社）により精製した。

[0218] mRNA 配列番号：33（mR-5）

RNA配列：SNAP(N)_A7_mRNA

```
GGGUUAACUUUAAUAAGGAGAUUAAUAUUGGACAAAGACUGCGAAAUGAAGCGCACCACCCUGGAUAG
CCCUCUGGGCAAGCUGGAACUGUCUGGGUGCGAACAGGGCCUGCACCUGAUCAUCUCCUGGGCAAAGG
AACAUUCUGCCGCCGACGCCGUGGAAGUGCCUGCCCCAGCCGCCGUGCUGGGCGGACCAGAGCCACUGAU
GCAGGCCACCGCCUGGCUAACGCCUACUUUCACCAGCCUGAGGCCAUCGAGGAGUCCCUGUGCCAGC
CCUGCACCACCCAGUGUCCAGCAGGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAAA
```

[0219] mRNA 配列番号：34（mR-6）

RNA配列 : SNAP(C)_A7_mRNA

GGGUUAAUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGGUCGACGAGAGCUUUACCCGCCAGGUGCUGGAAACU
GCUGAAAGUGGUGAAGUUCGGAGAGGUCAUCAGCUACAGCCACCUGGCCGCCUGGCCGGCAAUCCCGC
CGCCACCGCCGCCGUGAAAACCGCCUGAGCGGAAUCCCGUGCCCAUUCUGAUCCCCUGCCACCGGGU
GGUGCAGGGCGACCUGGACGUGGGGGGCUACGAGGGCGGGCUCGCCGUGAAAGAGUGGCUGCUGGCCA
CGAGGGCCACAGACUGGGCAAGCCUGGGCUGGGUCCUGCAGGCGGAUCCGCUUUAACUCGAGGUUAA
UGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0220] mRNA 配列番号 : 35 (mR-7)

RNA配列 : SNAP(full)_A7_mRNA

GGGUUAAUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGGACAAAGACUGCGAAAUGAAGCGCACCCUGGAUAG
CCCUCUGGGCAAGCUGGAACUGUCUGGGUGCGAACAGGGCCUGCACCGUAUCAUUCUGGGCAAAGG
AACAUUCUGCCGCCGACGCCGUGGAAGUGCCUGCCCCAGCCGCCGUGCUGGGCGGACCAGAGCCACUGAU
GCAGGCCACCGCCUGGCUCAACGCCUACUUUCACCAGCCUGAGGCCAUCGAGGAGUUCCUGUGCCAGC
CCUGCACCCACCCAGUGUCCAGCAGGAGAGCUUUACCCGCCAGGUGCUGUGGAAACUGCUGAAAGUGGU
GAAGUUCGGAGAGGUCAUCAGCUACAGCCACCUGGCCGCCUGGCCGGCAAUCCCGCCGCCACCGCCGC
CGUGAAAACCGCCUGAGCGGAAUCCCGUGCCCAUUCUGAUCCCCUGCCACCGGGUGGUGCAGGGCGA
CCUGGACGUGGGGGGCUACGAGGGCGGGCUCGCCGUGAAAGAGUGGCUGCUGGCCACGAGGGCCACAG
ACUGGGCAAGCCUGGGCUGGGUCCUGCAGGCGGAUCCGCUUUAACUCGAGGUUAAUGGCUCUGGCUC
UGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0221] 実施例4-1-3 mRNA Displayによる再会合アッセイ

W02013/100132に記載の方法で、上記で精製したmRNAの3' 末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結し、これを翻訳することによりmRNA-ペプチドのDisplay分子を調製した。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPUREfrex2.0 (GeneFrontier社) を用い、付属のプロトコルの組成に従い翻訳した。

[0222] 各Display分子の提示率を確認するために、RNaseONE (Promega) によりRNA部分を分解し、TricinePAGEで、泳動分離した。Display分子を形成している場合は翻訳ペプチドとピューロマイシンリンカーの連結体となり、Display分

子を形成していない場合は翻訳ペプチドの結合していないリンカーのみとなり、前者よりも低い位置に検出され、計二本のバンドが検出される。そのバンド比から、上述の式に従いDisplay分子の提示率(%)を計算した。RNase0NEによる具体的な反応液は、1xReaction buffer、0.84 μ M 連結体、0.5 U/ μ L RNase0NEを混合し、37°Cで1時間反応させた。

[0223] TricinePAGEの検出は、蛍光標識したピューロマイシンリンカーを検出した。TricinePAGEの結果得られた提示率は表7のようになった。

[0224] [表7]

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列	提示率
配列番号：4 2	SNAP (N)	MDKDCEMKRTTLDSPGKLELSGCEQGLHRTIFLGKGTSAAD AVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFVPAL HHPVFQGGSGSGSGSGSKK	64%
配列番号：4 3	SNAP (C)	MVDESFTROVLWKLKVVKFGEVISYSHLAALAGNPAAAV KTALSGNPVPIIPCHRVVGGDLVGGYEGGLAVKEWLLAHE GHRLGKPGLPAGGSAFKLEVNGSGSGSGSGSKK	19%
配列番号：4 4	SNAP (full)	MDKDCEMKRTTLDSPGKLELSGCEQGLHRTIFLGKGTSAAD AVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFVPAL HHPVFQGESFTROVLWKLKVVKFGEVISYSHLAALAGNPAA TAAVKTALSGNPVPIIPCHRVVGGDLVGGYEGGLAVKEWL LAHEGHRLGKPGLPAGGSAFKLEVNGSGSGSGSGSKK	33%

[0225] mRNA部分での結合を回避するために、mRNA部位の逆転写を行った。1xM-MLV RT Reaction buffer (Promega, #368B)、0.5 mM dNTP、8 U/ μ L M-MLV RT (H-) Point Mutant (Promega, #368B)、3 μ M Rv-primer (配列番号：5)、0.5 μ M 翻訳産物になるように混合し、42°Cで1時間反応させた。

[0226] 各Display分子単独、またはSNAP(N)のDisplay分子とSNAP(C)のDisplay分子を等量混合したmixtureを、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社)のバッファ一中、4°Cで30分静置した。この溶液に、1/4量の5 mM DTT、2500 nMのSNAP - Biotin(New ENGLAND BioLabs社)のPBS溶液を加え、37°Cで30分酵素反応を行った。

[0227] Streptavidinコーティング磁気ビーズを用いたプルダウンにより、酵素反応によりビオチン化されたDisplay分子もしくは未反応のSNAP - Biotinを回収し、tTBS (ナカライテスク)で数回洗浄後、精製水を加え95°Cで5分間インキュベートし核酸の溶出を行った。

[0228] 反応後、上清を回収し、相補性をもつprimer(Fw-primer (配列番号：99)

、Rv-primer（配列番号：10）でqPCRをかけた。qPCRの反応液は、1xExtaq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、200000倍希釈 SYBR Green I（Lonza, #50513）、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase（TAKARA）を混合し、95℃で2分加熱後、95℃ 10秒、55℃ 20秒、72℃ 60秒のサイクルを50サイクル繰り返した。

[0229] 各配列で検量線を引くために、セレクション前に調製した各Display分子（インプット）を核酸量で、1E+8/ μ L、1E+6/ μ L、1E+4/ μ L、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0230] SNAP-Biotinとの反応と、それに引き続くStreptavidinコーティング磁気ビーズを用いたプルダウンにより回収された各Display分子の核酸量を、反応系に加えた核酸の理論量で除することで見かけの回収率（見かけの回収率（%）＝回収された核酸量/加えた核酸量の理論値 $\times$ 100）を算出し、さらに提示率で補正した「回収率」（回収率（%）＝回収された核酸量/（加えた核酸量の理論値 $\times$ 提示率 $\times$ 0.01） $\times$ 100）を、表8にまとめた。

[0231] [表8]

	配列	回収された核酸量 (分子)	見かけの回収率 (%)	回収率 (%)
1	SNAP (N)	6.26E+07	0.062%	0.097%
2	SNAP (C)	6.76E+06	0.007%	0.035%
3	SNAP (full)	4.78E+09	4.740%	14.364%
4	SNAP (N)+SNAP (C)	4.59E+07	0.046%	0.240%

[0232] 結果、SNAP(full)を提示したクローンはSNAP-Biotinの存在下のみ効率的に回収され、その他のコントロールと比較して少なくとも50倍以上回収率が高いことが明らかとなった。

[0233] この結果から、SNAP(N)をある標的タンパク質に結合させた分子、SNAP(C)を別の標的タンパク質に結合させた分子、およびSNAP-Biotinを使用すると、GFPと同様に、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子の効率的なスクリーニングが可能になることが示された。

[0234] 実施例4-2 mRNA Displayを利用したsplitUbiquitinの再会合アッセイ

splitユビキチンは細胞内のタンパク質間相互作用解析に用いられるツールであり、ユビキチンの13番目のIleをAlaに置換（I13A）することで、N末端分子とC末側分子が自然に会合しないことが報告されている。

[0235] 前述のとおり、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子をライブラリからスクリーニングする場合、一つの標的分子のみと複合体を形成する被験分子の回収率を低く抑えた系が必要となる。splitユビキチンをこのスクリーニングに利用することができるかを検証するために、splitユビキチンN末端分子、もしくはsplitユビキチンC末端分子のみでは、抗ユビキチン抗体に結合せず、全長体でのみ前記抗体に結合することの検証実験を行った。ユビキチンのI13A変異体を実験に用いた。なお、本実施例では、C末端にGSリンカーが付加されたユビキチンN末端断片をsplitUb(N)と、C末端にGSリンカーが付加されたユビキチンC末端断片をsplitUb(C)、splitUb(N)とsplitUb(C)がGSGSリンカーで連結され、C末端にGSリンカーが付加されたタンパク質をsplitUb(N-C)と表記することがある。

[0236] 実施例4-2-1 mRNAの合成

鋳型DNA（配列番号：26（D-12）～配列番号：28（D-14））から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro 転写反応によりmRNA（配列番号：36（mR-8）～配列番号：38（mR-10））を合成し、RNeasy kit（Qiagen社）により精製した。

[0237] 鋳型DNA 配列番号：26（D-12）

DNA配列：splitUb(N)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATGCAGATCTTCGTGAA
GACCCTGACCGGAAGACCGCCACTCTGGAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCGAAATGTGAAGGCCAA
GATCCAAGATAAAGAAGGCATCCCCGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAAA

[0238] 鋳型DNA 配列番号：27（D-13）

DNA配列：splitUb(C)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCATCCCCCGACCA
GCAGAGGCTCATCTTTGCAGGCAAGCAGCTGGAAGATGGCCGCACTCTTTCTGACTACAACATCCAGAA

AGAGTCGACCCTGCACCTGGTCCTGCGCCTGAGGGGTGGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAA
AA

[0239] 鋳型DNA 配列番号 : 28 (D-14)

DNA配列 : splitUb(N-C)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATGCAGATCTTCGTGAA
GACCCTGACCGGCAAGACCGCCACTCTGGAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCGAAAATGTGAAGGCCAA
GATCCAAGATAAAGAAGGCATCCCCGGCTCTGGCTCTGGCATCCCCCGACCAGCAGAGGCTCATCTT
TGCAGGCAAGCAGCTGGAAGATGGCCGCACTCTTTCTGACTACAACATCCAGAAAGAGTCGACCCTGCA
CCTGGTCCTGCGCCTGAGGGGTGGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAA

[0240] mRNA 配列番号 : 36 (mR-8)

RNA配列 : splitUb(N)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGAUGCAGAUUCUGUGAAGACCCUGACCGGCAAGACCGC
CACUCUGGAGGUGGAGCCCAGUGACACCAUCGAAAAUGUGAAGGCCAAGAUCCAAGAUAAAGAAGGCAU
CCCCGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0241] mRNA 配列番号 : 37 (mR-9)

RNA配列 : splitUb(C)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGGGCAUCCCCCGACCAGCAGAGGCUCAUCUUUGCAGG
CAAGCAGCUGGAAGAUGGCCGCACUCUUUCUGACUACAACAUCCAGAAAGAGUCGACCCUGCACCUGGU
CCUGCGCCUGAGGGGUGGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0242] mRNA 配列番号 : 38 (mR-10)

RNA配列 : splitUb(N-C)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGAUGCAGAUUCUGUGAAGACCCUGACCGGCAAGACCGC
CACUCUGGAGGUGGAGCCCAGUGACACCAUCGAAAAUGUGAAGGCCAAGAUCCAAGAUAAAGAAGGCAU
CCCCGGCUCUGGCUCUGGCAUCCCCCGACCAGCAGAGGCUCAUCUUUGCAGGCAAGCAGCUGGAAGA
UGGCCGCACUCUUUCUGACUACAACAUCCAGAAAGAGUCGACCCUGCACCUGGUCCUGCGCCUGAGGGG
UGGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0243] 実施例4-2-2 mRNA Displayによる再会合アッセイ

WO2013/100132に記載の方法で、上記で精製したmRNAの3' 末端にリンカー

を介してピューロマイシンを連結し、これを翻訳することによりmRNA-ペプチドのDisplay分子を調製した。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPUREfrex2.0 (GeneFrontier社) を用い、付属のプロトコルの組成に従い翻訳した。

[0244] 各Display分子の提示率を確認するために、RNaseONE (Promega) によりRNA部分を分解し、TricinePAGEで、分泳動離した。Display分子を形成している場合は翻訳ペプチドとピューロマイシンリンカーの連結体となり、Display分子を形成していない場合は翻訳ペプチドの結合していないリンカーのみとなり、前者よりも低い位置に検出され、計二本のバンドが検出される。そのバンド比から、上述の式に従いDisplay分子の提示率 (%) を計算した。RNaseONEによる具体的な反応液は、1xReaction buffer、0.42 μ M 連結体、0.5 U/ μ L RNaseONEを混合し、37°Cで1時間反応させた。

[0245] 各Display分子の提示率を確認する場合は、蛍光標識したピューロマイシンリンカーを用いており、蛍光検出値を評価した。Tricine PAGEの結果得られた提示率は表9のようになった。

[0246] [表9]

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列	提示率
配列番号 : 4 5	splitUb (N)	MMQIFVKTLTGKTATLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPGSGSGSGSKK	89%
配列番号 : 4 6	splitUb (C)	MGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRG GGSGSGSGSKK	56%
配列番号 : 4 7	splitUb (N-C)	MMQIFVKTLTGKTATLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPGSGSG GIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRG GGSGSGSGSKK	77%

[0247] mRNA部分での結合を回避するために、mRNA部位の逆転写を行った。1xM-MLV RT Reaction buffer (Promega, #368B)、0.5 mM dNTP、8 U/ μ L M-MLV RT (H-) Point Mutant (Promega, #368B)、3 μ M Rv-primer (配列番号 : 5)、0.5 μ M 翻訳産物になるように混合し、42°Cで1時間反応させた。

[0248] 翻訳調製した各Display分子を、1xTBS、2mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファ中で、抗ユビキチン抗体 (Mouse IgG1モノクローナル抗体 ; クローン名FK2) 固定ビーズである、Anti-Multi Ubiquitin mAb-Magnetic Beads (MBL社, #D058-11) と混合し、室温で1時間反応させた。

- [0249] ユビキチンN末端断片とC末端断片が独立する際の相互作用も一緒に評価するため、splitUb(N)のディスプレイ分子とsplitUb(C)のDisplay分子を1:1で混合した条件も同様に行った。
- [0250] 上清を取り除き、tBS (ナカライテスク) で数回洗浄後、上清と等量の溶出buffer(1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP)を加えて懸濁し、95℃で10分間加熱して、核酸を溶出した。上清を回収し、相補性をもつprimer(Fw-primer (配列番号: 4)、Rv-primer (配列番号: 5)) でqPCRをかけた。qPCRの反応液は、1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μM Fw-primer、0.5 μM Rv-primer、200000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.02 U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃ 10秒、57℃ 20秒、72℃ 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。抗ユビキチン抗体固定ビーズと反応させる前の各Display分子も同様にqPCRを行い、インプットの核酸量を算出した。
- [0251] 各配列で検量線を引くために、核酸量で、1E+8/μL、1E+6/μL、1E+4/μL、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。
- [0252] 抗ユビキチン抗体との結合により回収された各Display分子の核酸量を、反応系中と混合する前に存在していた各Display分子の核酸量 (インプットの値) で割った見かけの回収率を算出し、さらに提示率で補正した回収率を表10にまとめた。
- [0253] 見かけの回収率(%) = 回収された核酸量/インプットの核酸量 × 100
- [0254] 回収率 (%) = 回収された核酸量 / (インプットの核酸量 × 各提示率 × 0.01) × 100
- [0255] [表10]

	配列	回収された核酸量 (分子)	見かけの回収率 (%)	回収率 (%)
1	splitUb (N-C)	6.69E+10	12.345%	16.050%
2	splitUb (N)	1.63E+10	0.931%	1.040%
3	splitUb (C)	1.16E+10	0.571%	1.012%
4	splitUb (N) + splitUb (C)	7.16E+09	0.194%	0.344%

[0256] 結果、splitUb(N-C)の存在下では効率的に回収され、その他のコントロールと比較して少なくとも16倍以上回収率が高いことが明らかとなった。

[0257] この結果から、splitユビキチン (I13A) のN末分子をある標的タンパク質に結合させた分子、splitユビキチンのC末端分子を別の標的タンパク質に結合させた分子、および抗ユビキチン抗体を使用すると、GFPと同様に、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子の効率的なスクリーニングが可能になることが示された。

[0258] 実施例4-3 電荷ペプチドの相互作用を利用したsplitUbiquitinの再会合アッセイ

次に、splitUb(N)とsplitUb(C)にそれぞれ電荷をもったペプチド配列（プラスの電荷をもつアミノ酸を多く含むK-peptide（「Kpep」と表記することもある。）、もしくはマイナスの電荷をもつアミノ酸を多く含むE-peptide（「Epep」と表記することもある。））を付加したコンストラクト（配列番号：55（P-11）～配列番号：57（P-13））からなるDisplay分子を調製した。付加したペプチド同士が電荷により引き合うとsplitUb同士が近接して抗ユビキチン抗体で回収され、逆に電荷により反発し合うと回収されない。これが検証されると、splitUbに付加された分子同士の複合体形成を、ユビキチンと抗ユビキチン抗体を介した回収率で評価することが可能になる。

[0259] 実施例4-3-1 mRNAの合成

鋳型DNA（配列番号：49（D-15）～配列番号：51（D-17））から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro 転写反応によりmRNA（配列番号：52（mR-11）～配列番号：54（mR-13））を合成し、RNeasy kit（Qiagen社）により精製した。

[0260] 鋳型DNA 配列番号：49（D-15）

DNA配列：Kpep-splitUb(N)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGTGAGCGCGCTGAAAGA
AAACGTGAGCGCCCTGAAAGAAAAAGTGAGCGCGCTGACCGAAAAAGTGAGCGCGCTGAAAGAGAAAGT
GAGCGCGCTGAAAGAAGGCTCTGGCTCTGGCTCTATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGG

CAAGACCGCCACTCTGGAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCGAAAATGTGAAGGCCAAGATCCAAGATAA
AGAAGGCATCCCCGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAA

[0261] 鋳型DNA 配列番号 : 50 (D-16)

DNA配列 : Epep-splitUb(N)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGTGAGCGCGCTGGAAAA
CGAAGTGAGCGCGCTGGAAAAAGAAGTGAGCGTGCTGGAAAAAGAAGTGAGCGCGCTGGAAAAAGAAGT
GCGCGCGCTGGAAAAAGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTATGCAGATCTTCGTGAAGACCTGACCGG
CAAGACCGCCACTCTGGAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCGAAAATGTGAAGGCCAAGATCCAAGATAA
AGAAGGCATCCCCGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAA

[0262] 鋳型DNA 配列番号 : 51 (D-17)

DNA配列 : Epep-splitUb(C)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCATCCCCCGACCA
GCAGAGGCTCATCTTTGCAGGCAAGCAGCTGGAAGATGGCCGCACTCTTTCTGACTACAACATCCAGAA
AGAGTCGACCCTGCACCTGGTCCTGCGCCTGAGGGGTGGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAGT
GAGCGCGCTGGAAAACGAAGTGAGCGCGCTGGAAAAAGAAGTGAGCGTGCTGGAAAAAGAAGTGAGCGC
GCTGGAAAAAGAAGTGCGCGCGCTGGAAAAAGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTAAAAAA

[0263] mRNA 配列番号 : 52 (mR-11)

RNA配列 : Kpep-splitUb(N)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAUACAUAUGAAAGUGAGCGCGCUGAAAGAAAACGUGAGCGCCUGAA
AGAAAAAGUGAGCGCGCUGACCGAAAAAGUGAGCGCGCUGAAAGAGAAAGUGAGCGCGCUGAAAGAAGG
CUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAUGCAGAUUCUGUGAAGACCCUGACCGGCAAGACCGCCACUCUGGA
GGUGGAGCCCAGUGACACCAUCGAAAAUGUGAAGGCCAAGAUGCAAGAUAAAGAAGGAUCCCCGGCUC
UGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0264] mRNA 配列番号 : 53 (mR-12)

RNA配列 : Epep-splitUb(N)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAUACAUAUGAAAGUGAGCGCGCUGGAAAACGAAGUGAGCGCGCUGGA
AAAAGAAGUGAGCGUGCUGGAAAAAGAAGUGAGCGCGCUGGAAAAGAAGUGCGCGCGCUGGAAAAAGG
CUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAUGCAGAUUCUGUGAAGACCCUGACCGGCAAGACCGCCACUCUGGA

GGUGGAGCCCAGUGACACCAUCGAAAAUGUGAAGGCCAAGAUCCAAGAUAAAGAAGGCAUCCCCGGCUC
UGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0265] mRNA 配列番号 : 54 (mR-13)

RNA配列 : Epep-splitUb(C)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUUGGGCAUCCCCCGACCAGCAGAGGCUCAUCUUUGCAGG
CAAGCAGCUGGAAGAUGGCCGCACUCUUUCUGACUACAACAUCCAGAAAGAGUCGACCCUGCACCUGGU
CCUGCGCCUGAGGGGUGGCGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAGUGAGCGCGCUGGAAAACGAAGU
GAGCGCGCUGGAAAAAGAAGUGAGCGUGCUGGAAAAAGAAGUGAGCGCGCUGGAAAAAGAAGUGCGCGC
GUCUGAAAAAGGCUCUGGCUCUGGCUCUGGCUCUAAAAAA

[0266] 実施例4-3-2 mRNA Displayによる再会合アッセイ

W02013/100132に記載の方法で、上記で精製したmRNAの3'末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結し、これを翻訳することによりmRNA-ペプチドのDisplay分子を調製した。翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPUREfrex2.0 (GeneFrontier社)を用い、付属のプロトコルの組成に従い翻訳した。

[0267] 各Display分子の提示率を確認するために、RNaseONE (Promega)によりRNA部分を分解し、TricinePAGEで、分泳動離した。Display分子を形成している場合は翻訳ペプチドとピューロマイシンリンカーの連結体となり、Display分子を形成していない場合は翻訳ペプチドの結合していないリンカーのみとなり、前者よりも低い位置に検出され、計二本のバンドが検出される。そのバンド比から、上述の式に従いDisplay分子の提示率(%)を計算した。RNaseONEによる具体的な反応液は、1xReaction buffer、0.42 μ M 連結体、0.5U/ μ L RNaseONEを混合し、37°Cで1時間反応させた。

[0268] 各Display分子の提示率を確認する場合は、蛍光標識したピューロマイシンリンカーを用い、蛍光検出値を評価した。TricinePAGEの結果得られた提示率は表11のようになった。

[0269]

[表11]

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列	提示率
配列番号 : 5 5	Kpep-splitUb (N)	MKVSALKENVSALKEKVSALTEKVSALKEKVSALKEGSGSGS GSMQIFVKTLTGKTATLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPGSG SGSGSKK	61%
配列番号 : 5 6	Epep-splitUb (N)	MKVSALENEVSALKEKVSLEKEVSALKEKVSLEKEGSGSGS GSMQIFVKTLTGKTATLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPGSG SGSGSKK	22%
配列番号 : 5 7	Epep-splitUb (C)	MGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRG GGSGSGSGSKVSALENEVSALKEKVSLEKEVSALKEKVRAL EKSGSGSGSKK	32%

- [0270] mRNA部分での結合を回避するために、mRNA部位の逆転写を行った。1xM-MLV RT Reaction buffer (Promega, #368B)、0.5 mM dNTP、8 U/ μ L M-MLV RT (H-) Point Mutant (Promega, #368B)、3 μ M Rv-primer (配列番号 : 5)、0.5 μ M 翻訳産物になるように混合し、42°Cで1時間反応させた。
- [0271] 条件1では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、Kpep-splitUb(N)のDisplay分子、Epep-splitUb(C)のDisplay分子、をそれぞれ0.2 μ Mになるように加えて、室温で1時間反応させた。
- [0272] 条件2ではEpep-splitUb(N)のDisplay分子、Epep-splitUb(C)のDisplay分子をそれぞれ0.2 μ M、条件3ではKpep-splitUb(N)のDisplay分子を0.4 μ M、条件4ではEpep-splitUb(N)のDisplay分子を0.4 μ M、条件5ではEpep-splitUb(C)のDisplay分子を0.4 μ Mになるように加えた点を除き、条件1と同様の条件で反応させた。
- [0273] 抗ユビキチン抗体固定ビーズである、Anti-Multi Ubiquitin mAb-Magnetic (MBL社, #D058-11)と混合し、室温で30分反応させた。
- [0274] 上清を取り除き、tTBS (ナカライテスク) で数回洗浄後、上清と等量の溶出buffer(1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP)を加えて懸濁し、95°Cで5分間加熱して、核酸を溶出した。上清を回収し、相補性をもつprimer(Fw-primer (配列番号 : 4)、Rv-primer (配列番号 : 5))でqPCRをかけた。qPCRの反応液は、1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、2 00000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95°Cで2分加熱後、95°C 10秒、57°C 20秒、72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。抗ユビキチン抗体固定ビーズと反応さ

せる前の各Display分子も同様にqPCRを行い、インプットの核酸量を算出した。

[0275] 各配列で検量線を引くために、核酸量で、 $1\text{E}+8/\mu\text{L}$ 、 $1\text{E}+6/\mu\text{L}$ 、 $1\text{E}+4/\mu\text{L}$ 、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0276] 抗ユビキチン抗体により回収された、核酸の回収率を、インプットの値（アッセイに持ち込んだDisplay分子の量）で割った回収率を以下の式から算出して、表12にまとめた。

[0277] 見かけの回収率（%）＝回収された核酸量/インプットの核酸量 × 100

[0278] 回収率（%）＝ 回収された核酸量 / （インプットの核酸量 × 各提示率 × 0.01） × 100

[0279] [表12]

	サンプル		インプット核酸量 (分子)	回収された核酸量 (分子)	見かけの回収率 (%)	回収率 (%)
条件1	Kpep-splitUb (N)	Epep-splitUb (C)	9.34E+11	2.53E+07	0.0027%	0.0124%
条件2	Epep-splitUb (N)	Epep-splitUb (C)	7.89E+11	1.28E+06	0.0002%	0.0007%
条件3	Kpep-splitUb (N)	—	4.59E+11	2.28E+06	0.0005%	0.0008%
条件4	Epep-splitUb (N)	—	4.75E+11	3.77E+05	0.0001%	0.0004%
条件5	Epep-splitUb (C)	—	3.14E+11	3.69E+06	0.0012%	0.0037%

[0280] 結果、Kpep-splitUb(N)とEpep-splitUb(C)が揃った条件（条件1）でのみ回収率が高かった。このことから、splitUb(N)とsplitUb(C)に付加された分子同士が相互作用し、複合体を形成する場合のみ、splitUb(N)とsplitUb(C)が近接し、抗ユビキチン抗体により、回収できることが証明された。

[0281] 実施例4-4 mRNA Displayを利用したsplit Nanolucの再会合アッセイ

Nanolucは10本のβストランドから成る発光タンパク質であり、これを1-8番目のβストランド、9番目のβストランド、10番目のβストランドに3分割し、親和性を調整することで、PPIを発光にて検出するためのsplit Nanolucシステムが報告されている。本システムでは前述のsplit GFPシステム同様、PPIを検出したい2種類のタンパク質に対し、9番目のストランドおよび10番目のストランドを結合させる。9番目ないし10番目のストランド単体と1-8番目のストランドを混合して基質を加えても発光は観測できない一方、この2つのタンパク質が近接したときのみ残りの1-8番目のβストランドと複合体を形成

し、基質を添加することで発光が観測できるため、wash freeのELISAなどへの利用がなされている。一方で、9番目および10番目のストランド単体が1-8番目のストランドとどの程度結合するかに関しては明らかにされておらず、選択的プルダウンに利用できるかは検証が必要だった。

[0282] そこで、9番目と10番目のストランドをリンカーで連結した分子は1-8番目のストランドを用いることでプルダウン可能な一方、9番目ないし10番目のストランド単体、ないしこの2者を単に混合した場合には1-8番目のストランドではプルダウンできないことを検証した。この仮説が検証されれば、目的物の選択的プルダウンが可能になる。なお、本実施例では、N末端にAviタグ配列およびHisタグ配列が付加されたNanolucの1-8番目のストランドをsplitNanoluc1-8、C末端にGSリンカーおよびTEVプロテアーゼ認識配列が付加された9番目のストランドをsplitNanoluc-9、C末端にGSリンカーおよびTEVプロテアーゼ認識配列が付加された10番目のストランドをsplitNanoluc-10、splitNanoluc-9とsplitNanoluc-10がGSリンカーで連結され、C末端にGSリンカーおよびTEVプロテアーゼ認識配列が付加されたタンパク質をsplitNanoluc9-10と表記することがある。

[0283] 実施例4-4-1 ビオチン化splitNanoluc1-8タンパク質の調製
ベクター調製

pET-15bベクターに、配列番号：58（D-18）の合成DNAをNco1/BamH1の制限酵素を使用して挿入した発現ベクターを調製した。

[0284] 合成DNA 配列番号：58（D-18）

DNA配列：

```
CCATGGGCCTGAACGATATTTTTGAAGCGCAGAAGATTGAGTGGCACGAACACCATCATCATCATCAGG
GTGGTAGCAGCGTGTTACCCCTGGAGGACTTTGTTGGCGATTGGGAACAGACCGCGGCGTACAACCTGG
ACCAGGTGCTGGAGCAAGGTGGCGTTAGCAGCCTGCTGCAGAACCTGGCGGTGAGCGTTACCCCGATCC
AACGTATTGTTGCTAGCGGCGAGAACGCGCTGAAGATCGACATTACGTGATCATTCCGTATGAAGGCC
TGAGCGCGGATCAGATGGCGCAAATCGAGGAAGTGTTCAGGTGGTTTACCCGTTGACGATCACCCT
TTAAAGTGATCCTGCCGTATGGTACCCTGGTGATTGACGGCGTTACCCGAACATGCTGAACCTACTTCG
```

GTCGTCCGTATGAAGGCATCGCGGTTTTTGATGGTAAGAAAATTACCGTTACCGGCACCCTGTGGAACG
GCAACAAGATTATTGACGAACGCCTGATTACCCCGGACTAATGAGGATCC

[0285] タンパク質発現および精製

大腸菌SHuffle T7 Express Competent E.coli (NEW ENGLAND BioLabs, Cat .No C3029H)を、splitNanoluc発現ベクターと、pACYC184ベクターに大腸菌BirA遺伝子を導入したBirA発現ベクターで形質転換し、発現株を構築した。

[0286] 構築した大腸菌発現株を培地A (LB培地 (invitrogen, #12780-052) , 100 $\mu\text{g/mL}$ アンピシリン, 50 $\mu\text{g/mL}$ スペクチノマイシン二塩酸塩, 34 $\mu\text{g/mL}$ クロラムフェニコール) でOD600=0.5になるまで培養した後、氷水にフラスコを5分浸して、4°Cまで培養液の温度を下げた。200 μM IPTG (イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド) , 50 μM Biotinになるように加え、16°C、200rpmで一晩培養することでビオチン化修飾を受けた目的タンパク質を発現させた。培養菌体は遠心により回収し、液体窒素で凍結した後、-80°Cで保存した。

[0287] 凍結菌体をextraction buffer (50mM リン酸水素ナトリウム pH7.5, 500 mM NaCl, ProteinaseInhibitorCocktail (EDTA-free)) を用いて懸濁し、5kU/E.coliになるようにrLysozyme (Novagen, #71110-3) を添加した後、室温で20分放置した。再度懸濁し、超音波破碎した後、1 M MgCl_2 を0.2%v/v になるように、25 U/ μL benzonase (EMD Millipore, #70746-2.5KUN) を0.03%v/vになるように加えて、再度室温で20分静置した。サンプルを遠心し回収した上清を、0.22 μm フィルターでろ過した。

[0288] ろ過したサンプルを、HisTrap HP 1mL (GE Healthcare, #17-5247-01) を使用して精製した。

[0289] 精製サンプルを回収後、Streptavidin Mutein Matrix (Roche, # 03708152001) を用いて精製した。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC801024) により、1/10 volumeになるように濃縮した。

[0290] 濃縮サンプルを、ゲル濾過精製した。ゲル濾過精製のRunning bufferとし

て、50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, pH8.0を用いた。

[0291] SDS-PAGE分析の結果、目的タンパク質の理論分子量に対応する位置に単一バンドを示した。また、ビオチン化タンパク質とストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲルシフトアッセイにより、目的タンパク質がビオチン化されていることを確認した。

[0292] [表13]

レーン	試料名	添加物	タンパク質量 (μg)
1	Marker	–	–
2	SplitNanoluc1-8	Streptavidin	1
3	SplitNanoluc1-8	–	1
4	SplitNanoluc1-8	–	0.1
5	–	Streptavidin	–

[0293] 実施例4-4-2 mRNA Displayを利用したsplit Nanolucの再会合アッセイ

複数の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子をライブラリからスクリーニングする場合、一つの標的分子のみと複合体を形成する被験分子の回収率を低く抑えた系が必要となる。

[0294] そこで、splitNanoluc-9（配列番号：66）、splitNanoluc-10（配列番号：67）、およびsplitNanoluc9-10連結体（配列番号：65）それぞれの、splitNanoluc1-8（配列番号：85）に対する結合能を評価した。splitNanoluc-9、splitNanoluc-10、およびsplitNanoluc9-10連結体のそれぞれに核酸を連結させたDisplay分子を調製し、これらをsplitNanoluc1-8とインキュベートし、splitNanoluc1-8に結合した分子の核酸部分をqPCRした。

[0295] (1) mRNAの合成

鋳型DNA（配列番号：59（D-19）～配列番号：61（D-21））から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro 転写反応によりmRNA（配列番号：62（mR-14）～配列番号：64（mR-16））を合成し、RNeasy kit（Qiagen社）により精製した。

[0296] 鋳型DNA 配列番号：59（D-19）

DNA配列：splitNanoluc9-10

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGCATGCTGTTTCG

由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPUREfrex2.0 (GeneFrontier社)を用い、付属のプロトコルに従い翻訳した。

[0303] 各Display分子の提示率を確認するために、RNaseONE (Promega) によりRNA部分を分解し、TricinePAGEで、分泳動離した。Display分子を形成している場合は翻訳ペプチドとピューロマイシンリンカーの連結体となり、Display分子を形成していない場合は翻訳ペプチドの結合していないリンカーのみとなり、前者よりも低い位置に検出され、計二本のバンドが検出される。そのバンド比から、以下の式によりDisplay分子の提示率(%)を計算した。

[0304] $\text{Display分子の提示率(\%)} = \frac{\text{翻訳ペプチドとリンカーからなるバンド強度}}{\text{バンド強度の合計}} \times 100$

[0305] RNaseONEによる具体的な反応液は、1xReaction buffer、 $0.84 \mu\text{M}$ 連結体、 $0.5 \text{ U}/\mu\text{L}$ RNaseONEを混合し、 37°C で1時間反応させた。

[0306] TricinePAGEの検出は、蛍光標識したピューロマイシンリンカーを検出した。TricinePAGEの結果得られた提示率は表14のようになった。

[0307] [表14]

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列	提示率
配列番号: 65	SplitNanoluc9-10	MGSMFLFRVTINSGGGSGGGSGVSGWRLFKKISGSGSGSGSE NLYFQGKK	38%
配列番号: 66	SplitNanoluc-9	MGSMFLFRVTINSGSGSGSGSENLYFQGKK	16%
配列番号: 67	SplitNanoluc-10	MVSGWRLFKKISGSGSGSGSENLYFQGKK	69%

[0308] 再会合アッセイに使用する際は、蛍光標識のないピューロマイシンリンカーを使用し、翻訳産物は、mRNA部分での結合を回避するために逆転写を行った。具体的な方法としては、1xM-MLV RT Reaction buffer (Promega, #368B)、 0.5 mM dNTP、 $8 \text{ U}/\mu\text{L}$ M-MLV RT (H-) Point Mutant (Promega, #368B)、 $3 \mu\text{M}$ Rv-primer (配列番号: 68)、 $0.5 \mu\text{M}$ 翻訳産物になるように混合し、 42°C で1時間反応させた。

[0309] 各Display分子を、1xTBS、 2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、 33 nM のDisplay分子に対して、 $1 \mu\text{M}$ のビオチン化splitNanoluc1-8を加え混合し、室温で1時間反応させた。

[0310] Streptavidinコーティング磁気ビーズを用いたプルダウンによりビオチン

化splitNanoluc1-8もしくはこれを含む複合体を回収し、tTBS（ナカライテスク）で数回洗浄後、splitNanoluc-9もしくはsplitNanoluc-10と連結した自らをコードするmRNA部分の間に導入したTEVプロテアーゼ認識配列を認識するTEVプロテアーゼにより切断し核酸の溶出を行った。具体的なTEV溶出液は、1x TEV buffer、1 mM DTT、0.2 U/ μ L AcTEVプロテアーゼ（サーモフィッシュサイエンティフィック社、#12575015）を、洗浄後のビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、相補性をもつprimer(Fw-primer（配列番号：4）、Rv-primer（配列番号：68））でqPCRをかけた。qPCRの反応液は、1x Ex taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、200000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃ 10秒、57℃ 20秒、72℃ 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。ビオチン化splitNanoluc1-8と反応させる前の各Display分子も同様にqPCRを行い、インプットの核酸量を算出した。

[0311] 各配列で検量線を引くために、核酸量で、1E+8/ μ L、1E+6/ μ L、1E+4/ μ L、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0312] splitNanoluc1-8との結合により回収された各Display分子の核酸量を、splitNanoluc1-8と混合する前に存在していた各Display分子の核酸量（インプットの値）で割った見かけの回収率を算出し、さらに提示率で補正した回収率を、表15にまとめた。

[0313] 見かけの回収率(%) = 回収された核酸量/インプットの核酸量 $\times$ 100

[0314] 回収率(%) = 回収された核酸量 / (インプットの核酸量 $\times$ 各提示率 $\times$ 0.01) $\times$ 100

[0315] [表15]

	配列	インプット核酸量 (分子)	回収された核酸量 (分子)	見かけの回収率 (%)	回収率 (%)
1	splitNanoluc9-10	2.73E+10	3.45E+09	12.632%	33.155%
2	splitNanoluc-9	3.23E+10	2.53E+06	0.008%	0.049%
3	splitNanoluc-10	4.53E+10	5.04E+06	0.011%	0.016%
4	splitNanoluc-9+ splitNanoluc-10	5.75E+10	9.62E+06	0.017%	0.104%

[0316] 結果、splitNanoluc1-8によりsplitNanoluc9-10の連結体が回収され、split

tNanoluc-9単独、もしくはsplitNanoluc-10単独の回収率は、連結体の回収率に対し300倍以上低いことが示された。すなわち、Nanoluc1-8はNanoluc-9（またはNanoluc-10）の非存在下ではNanoluc-10（またはNanoluc-9）と会合しないこと、Nanoluc1-8がNanoluc-9およびNanoluc-10と会合するためにはNanoluc-9とNanoluc-10とが近接、会合あるいは相互作用していることが必要であることが示された。この結果から、splitNanoluc-9をある標的タンパク質に結合させた分子、splitNanoluc-10に別の標的タンパク質に結合させた分子、およびsplitNanoluc1-8を使用すると、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子の効率的なスクリーニングが可能になることが示された。

[0317] 実施例5 ペプチドライブラリ中のラパマイシン-核酸濃縮検証実験

前述した、GFPの再会合を利用したラパマイシン回収検証実験において、GFP10、GFP11、GFP1-9の三者を利用して効率的にラパマイシンを回収できることが示された。そこで、ペプチドディスプレイライブラリにラパマイシン-核酸（化合物nk04）を1/（ 1×10^3 乗）、もしくは1/（ 1×10^6 乗）の割合になるように混合した、混合ライブラリを調製し、1ラウンドのmRNA Displayのパニング操作を行うことで、目的のラパマイシン-核酸が濃縮されるかを検証した。

[0318] ペプチドディスプレイライブラリの調製

翻訳に使用するアシル化tRNAの合成

W02013/100132に記載の手法でパニングに使用するアシル化tRNAを調製した。W02018/225864に記載のMeHnl7F2, S3F5MePyr, MeSnPr, MeA3Pyr, F3Cl, Pic2, MeG, Nle, MeStBuOH, SNtBuAca, SiPen, nBuG, MeHph, SPh2C, Ala(4-Thz)を含む15種類のアミノ酸を用いて、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物を調製した。それぞれのアシル化tRNAの翻訳液中の最終濃度は $10 \mu\text{M}$ ～ $20 \mu\text{M}$ であった。Pnaz保護のpCpAアミノ酸は、脱保護を実施せずにフェノール抽出以降の作業を行った。Initiatorアミノアシル化tRNAは、W02017/150732に記載の化合物AAtR-3 (Ac bz-MeCys(StBu)-tRNA^{fMet}CAU) と同一化合物であり、最終濃度が $25 \mu\text{M}$ になるように翻訳液中に添加して用いた。

[0319] ペプチド化合物ライブラリをコードするランダム化された2本鎖DNAライブラリ

W02013/100132に記載の手法でDNAライブラリを構築した。TTT、TTG、CTT、ATT、ATG、GTT、CCG、ACT、GCT、CAT、CAG、AAC、GAA、TGG、CGG、AGT、AGG、GGT、CTG、GTG、TCT、TCG、TGC、CGTを含む24種類のトリプレットがランダムに8回ないし9回繰り返して出現するものを用意した。

[0320] 翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE systemを用いた。具体的には、1 mMのGTP、1 mMのATP、20 mMのクレアチンリン酸、50 mMのHEPES-KOH pH7.6、100 mMの酢酸カリウム、10 mMの酢酸マグネシウム、2 mMのスペルミジン、1 mMのジチオスレイトール、1 mg/mL E.coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社) (非特許文献：Yokogawa T et al. 2010に記載の方法で、一部のtRNAを除去している)、4 μg/mLのクレアチンキナーゼ、3 μg/mLのミオキナーゼ、2 unit/mLの無機ピロフォスファターゼ、1.1 μg/mLのヌクレオシドニリン酸キナーゼ、0.26 μMのEF-G、2.7 μMのIF1、0.4 μMのIF2、1.5 μMのIF3、40 μMのEF-Tu、35 μMのEF-Ts、1.2 μMのリボソーム、2.73 μMのAlaRS、1 μMのGlyRS、0.4 μMのIleRS、0.5 μMの変異体PheRS (W02016/148044)、0.16 μMのProRS、1 μMの変異体SerRS (W02016/148044)、0.09 μMのThrRS、1 μMの変異体ValRS (W02016/148044)、0.11 μMのLysRS、0.5 μMのHisRS、3 μMのin vitro転写大腸菌tRNA Ala1B、250 μMのグリシン、100 μMのイソロイシン、250 μMのプロリン、250 μMのスレオニン、250 μMのリジン、5 mMのN-メチルバリン、5 mMのN-メチルセリン、5 mMのN-メチルアラニン、5 mMのN-メチルフェニルアラニン、1 mM Ala(4-Thz)、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物、25 μM Initiatorアミノアシル化tRNA (W02020/138336A1)、0.5 μM Penicillin G Amidase (PGA)、1 μMのEF-P-Lys、前述の二本鎖DNAライブラリからW02013/100132に従って調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を1 μMになるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで翻訳を行った。

[0321] 翻訳したライブラリに対して、核酸の分子数として1/(1×10³乗)の割

合になるようにラパマイシン-核酸(化合物nk04)を加えた混合物を混合ライブラリA、同様に1/(1×10の6乗)の割合になるようにラパマイシン-核酸(化合物nk04)を加えた混合物を混合ライブラリBとして調製した。混合ライブラリAと混合ライブラリBを使用し、W02013/100132に倣ってパニングを1ラウンド実施した。

[0322] 条件1では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、2 μ M Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11、2 μ M GFP10-Link12-FRB-Hisx6、1 μ M ビオチン化GFP1-9に対して、混合ライブラリAを0.3 μ Mになるように加えて、室温で1.5時間反応させた。

[0323] 条件2では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社) のバッファー中で、2 μ M Hisx6-FKBP12-Link12-GFP11、2 μ M GFP10-Link12-FRB-Hisx6、1 μ M ビオチン化GFP1-9に対して、混合ライブラリBを0.3 μ Mになるように加えて、室温で1.5時間反応させた。

[0324] Streptavidinコーティング磁気ビーズを用いたプルダウンによりビオチン化GFP1-9もしくはこれを含む複合体を回収し、tTBS (ナカライテスク) で数回洗浄後、GFP1-9とビオチンとの間に導入したTEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し核酸の溶出を行った。具体的なTEV溶出液として、1 x TEV buffer、1 mM DTT、0.2 U/ μ L AcTEVプロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#12575015) を、洗浄後のビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、ライブラリA (もしくはB) の全配列 (化合物nk04の付加核酸配列を含む) に相補性をもつプライマー (Fw-primer (配列番号: 117)、Rv-primer (配列番号: 118)) でPCRした後、そのPCR産物のqPCRを行い、ライブラリの配列の評価を行った。ただし、化合物nk04付加核酸配列とそれ以外のライブラリ由来の配列で同プライマーを使用した際のPCR増幅効率に差がないことは確認している (データ示していない)。qPCRのプライマーには、前述のプライマー (Fw-primer (配列番号: 4)、Rv-primer (配列番号: 6)) もしくは、化合物nk04の付加核酸配列のみに相補性をもつプライマー ((Fw-primer (配列番号: 69)、Rv-primer (配列番号: 70))

）を使用した。qPCRの反応液は、1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、200000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃ 10秒、57℃ 20秒、72℃ 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0325] 各配列で検量線を引くために、インプット核酸量で、1E+8/ μ L、1E+6/ μ L、1E+4/ μ L、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0326] 化合物nk04の核酸の回収率と、ライブラリA（もしくはB）の全核酸回収率を比較することで、パニングを1ラウンド行った後のライブラリ中の化合物nk04の分子濃度（%）を以下の式により算出した（表16）。

[0327] 化合物nk04の分子濃度（%）＝化合物nk04付加核酸配列核酸濃度（分子数/ μ L）/ライブラリの核酸濃度（分子数/ μ L） $\times$ 100

[0328] [表16]

条件	ライブラリ	1ラウンドのパニング実施	ライブラリの核酸濃度 (分子数/ μ L)	化合物nk04付加核酸配列 核酸濃度 (分子数/ μ L)	化合物nk04の 分子濃度 (%)
条件 1	A	無	9.02E+10	2.48E+08	0.2751%
条件 2	B	無	9.58E+10	7.49E+05	0.0008%
条件 1	A	有	5.25E+12	6.39E+12	121.6000%
条件 2	B	有	5.53E+12	1.43E+11	2.6000%

[0329] 結果、パニング実施前後で、ライブラリ中の化合物nk04の分子濃度が400～3000倍になっており、splitGFPを使用したmRNA display panningによって、二つの標的を認識する分子が効率的に濃縮されることが示された。

[0330] 実施例6 splitGFP技術を使用したbispecific分子のパニング

前述の通り、ペプチドディスプレイライブラリと混合したラパマイシン-核酸を、GFPの再会合により濃縮することが示された。次に、 1×10^5 の12乗からなるペプチドディスプレイライブラリから、同手法で、2つの標的タンパク質に結合するペプチドを取得可能か、mRNAディスプレイパニングを行い検証した。

[0331] パニングの1ラウンド目では、ビーズに片側の標的タンパク質のビオチン化体を固定し、もう片側の標的タンパク質を遊離の状態が存在させセクションを行った。2ラウンド目では、ビーズに固定するビオチン化標的タンパク

質と遊離の標的タンパク質を入れ替えて、セレクションした。

[0332] 3ラウンド目以降は、GFP10およびGFP11にそれぞれの標的タンパク質を結合させた融合タンパク質を調製し、これら二つの融合タンパク質と、ビオチン化GFP1-9の存在下でセレクションを行った。

[0333] 実施例6-1 パニング標的タンパク質の調製

[0334] パニングに使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したGTPase KRas(KRAS)を用いた。C末端にソルターゼ認識配列 (L P X T G 配列 (Xは任意のアミノ酸) (配列番号116))、Hisタグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、KRAS-FLAGSorHisTEV-Bio (配列番号100) を調製した。

[0335] 具体的には、発現ベクターにpET21a(+)を用いて大腸菌BL2 (DE3) を、ビオチンライゲース (BirA) 発現ベクターとともに、形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.7になるまで、アンピシリンとクロラムフェニコール入りのLB培地で培養し、1 mMのIPTGで誘導をかけ、0.1 mMのbiotin存在下で、30℃で5時間培養した。回収した可溶性画分をNi Sepharose High Performance (GE) を用いて精製し、その後、Streptavidin Mutein Matrix (Roche) を用いて精製した。精製は、それぞれ製品添付の基本プロトコルに従い行った。Superdex x 75 Increase 10/300 GL(GE)を用いて、サイズ分画クロマトグラフィーを行い、精製した最終産物を、保存buffer (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10% Glycerol, pH 7.6) に入れて、-80℃で保存した。

[0336] SDS-PAGE分析の結果、目的タンパク質の理論分子量に対応する位置に単一バンドを示した。SEC分析の結果、目的タンパク質が理論値付近の分子量マーカースと同程度の保持時間を示し、かつ単量体として存在していることを確認した。SEC分析のカラムには、TSKgel G2000SWXL (TOSOH, #08540)を使用した。

[0337] パニングに使用する標的タンパク質として、N末端に精製タグ、thrombin切断サイトを付加した、HAT-KRAS-nonbio (配列番号101) を調製した。

[0338] 具体的には、発現ベクターにpETBlue1を用い、大腸菌Tuner(DE3)pLacI (No

vagen)を形質転換して発現株を作成した。OD600が0.6になるまで、アンピシリン入りのLB培地で培養し、0.1 mMのIPTGで誘導をかけ、30℃で一晩培養した。回収した可溶性画分をNi Sepharose excel (GE healthcare) を用いて基本プロトコルに従い精製した。HiLoad 26/600 Superdex 75 pg(GE healthcare)を用いて、サイズ分画クロマトグラフィーを行い、精製した最終産物を保存buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, pH 8.0) に入れて、-80℃で保存した。

- [0339] SDS-PAGE分析の結果、目的タンパク質の理論分子量に対応する位置に単一バンドを示した。
- [0340] パニングに使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を用いた。C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、GST-HisTEVAvi (配列番号103) を調製した。
- [0341] 具体的には、発現ベクターにpGEX-4T-1を用い、大腸菌BL21 star (DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD600が1.2になるまで、TB培地で培養し、0.5 mMのIPTGで誘導をかけ、37℃で4時間培養した。回収した可溶性画分をProfinity IMAC Ni-Charged Resin(BIO-RAD)を用いて製品添付の基本プロトコルに従い精製し、保存buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, pH 8.0) に入れて、-80℃で保存した。
- [0342] SDS-PAGE分析の結果、目的タンパク質の理論分子量に対応する位置に単一バンドを示した。
- [0343] 上述で調製したGST-HisTEV-Aviをビオチン存在下でビオチンライゲース (BirA) により処理し、GST-HisTEV-Bio (配列番号102) を得た。
- [0344] BirAを大腸菌で調製・精製した。具体的には、発現ベクターにpET30aを用い、大腸菌BL21 (DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD600が4になるまで、アンピシリン入りのTB培地で培養し、0.5 mMのIPTGで誘導をかけ、15℃で16時間培養した。回収した可溶性画分をProfinity IMAC Ni-Charged Resin(BIO-RAD)を用いて基本プロトコルに従い精製し、保存buffer (50 mM Tr

is-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, pH 8.0) に入れて、-80℃で保存した。

- [0345] ビオチン化反応液は、46 mM Tris HCl pH8.3、9 mM Mg(OAc)₂、35 μM biotin、0.825 μM BirA、30.5 μM GST-HisTev-Aviになるように調製し、室温で1時間静置した。ビオチン化タンパク質とストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲルシフトアッセイにより、目的タンパク質がビオチン化されていることを確認した。
- [0346] パニングに使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を用いた。C末端に精製用Hisタグ、ソルターゼ認識配列を付加した、GST-SorAHis (配列番号104) を調製した。
- [0347] 具体的には、発現ベクターにpGEX-4T-1を用い、大腸菌BL21 Star (DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が1.2になるまで、アンピシリン入りのLB培地で培養し、0.5 mMのIPTGで誘導をかけ、15℃で一晩培養した。回収した可溶性画分をProfinity IMAC Ni-Charged Resin(BIO-RAD)を用いて製品添付の基本プロトコルに従い精製し、保存buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, pH 8.0) に入れて、-80℃で保存した。
- [0348] SDS-PAGE分析の結果、目的タンパク質の理論分子量に対応する位置に単一バンドを示した。
- [0349] パニングに使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したFKBP12を用いた。C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、FKBP-HisTEVAvi (配列番号114) を調製した。具体的には、発現ベクターにpET11aを用い、大腸菌BL21(DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.5になるまで、アンピシリン入りのLB培地で培養し、1.0 mMのIPTGで誘導をかけ、37℃で3時間培養した。回収した可溶性画分をHis Trap FF(Cytiva)を用いて製品添付の基本プロトコルに従い精製し、Amicon Ultra-15 10k cut(Merck Millipore)で濃縮して0.22 μm filter処理したものを、Superdex 75pg column (Cytiva)によりSEC精製した。保存buffer (50 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 1mM TCEP) に入れて、-80℃で保存した。

- [0350] SDS-PAGE分析の結果、目的タンパク質の理論分子量に対応する位置に単一バンドを示した。
- [0351] 上述で調製したFKBP-HisTEV-Aviをビオチン存在下でビオチンライゲース（BirA）により処理し、FKBP-HisTEV-Bio（配列番号115）を得た。ビオチン化タンパク質とストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲルシフトアッセイにより、目的タンパク質がビオチン化されていることを確認した。
- [0352] 上述の調製タンパク質の配列を下表に示す。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。
- [0353]

[表17]

配列番号	タンパク質名	アミノ酸配列
配列番号： 1 0 0	KRAS- FLAGSorHisTEV- Bio	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRKQVVIDGE TCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYRE QIKRVKDSIEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAK TRQGVDDAFYTLVREIRKHKEKMSKDGSSDYKDDDDKGGSSLPMTG GGSSHHHHHHSSGENLYFQSGGGGLNDIFEAQK*IEWHE
配列番号： 1 0 1	HAT-KRAS- nonbio	MKDHLIHNHVKEEHAHAHSSGSLVPRGSSGGSTEYKLVVVGADGVGK SALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSA MRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSIEDVPMVLV GNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREI RKHKEKMSKDG
配列番号： 1 0 2	GST-HisTEV-Bio	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAESMLEGAV LDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHV THPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSK YIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDGGSSHHHHHHSSGENLYFQSGGG GLNDIFEAQK*IEWHE
配列番号： 1 0 3	GST-HisTEVAvi	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAESMLEGAV LDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHV THPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSK YIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDGGSSHHHHHHSSGENLYFQSGGG GLNDIFEAQKIEWHE
配列番号： 1 0 4	GST-SrtAHis	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAESMLEGAV LDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHV THPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSK YIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDGGSSDYKDDDDKGGSSLPMTGGG GSSHHHHHHHH
配列番号： 1 1 4	FKBP-HisTEVAvi	MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGKKFDSSRDNRNKP KFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH ATLVFDVELLKLEGGSSLPMTGGGGSSHHHHHHSSGENLYFQSGGGGL NDIFEAQKIEWHE
配列番号： 1 1 5	FKBP-HisTEV-Bio	MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGKKFDSSRDNRNKP KFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH ATLVFDVELLKLEGGSSLPMTGGGGSSHHHHHHSSGENLYFQSGGGGL NDIFEAQK*IEWHE

[0354] 実施例6-2：GFP10またはGFP11が連結された標的タンパク質の調製

上記方法により調製したC末端にソルターゼ認識配列を含むKRAS-SorHisTEV AviとGST-SorAHisのコンストラクトに対し、L P X T G配列（Xは任意のアミノ酸）を認識するトランスペプチダーゼであるe S r t Aを用いたソルターゼ反応によりGFP10またはGFP11を付加し、融合タンパク質を調製した。

[0355] 実施例6-2-1 Sortase A pentamutant (eSrtA)の調製

非特許文献Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011 Jul 12;108(28):11399-11404.の方法に準じ、eSrtAを大腸菌で発現させ、精製した。なお、ここで合成したソルターゼAは野生型ではなく、より高活性のP94R/D160N/D165A/K190E/K196T五重変異体 (Sortase A pentamutant (eSrtA))である (配列番号: 105)。

[0356] [表18]

配列番号	タンパク質名	アミノ酸配列
配列番号: 105	eSrtA	MQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYGPATREQLNRGVSF AEEN ESLDDQNISIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRK YK MTSIRNVKPTAVEVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEETGVWETRKIFVA TEVKLEHHHHHH

[0357] 実施例6-2-2 tri-Gly付加GFPペプチドの合成

N末にソルターゼの基質になるGly-Gly-Glyを含むGFPペプチド (Sor-sp11-L12, 配列番号: 106およびSor-sp10-12, 配列番号: 107) を、固相合成法による常法により合成した。

[0358] [表19]

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列
配列番号: 106	Sor-sp11-L12	GGGGSGGGSGGSTSEKRDHMLLEVYVTAAGITDAS
配列番号: 107	Sor-sp10-12	GGGGSGGGSGGSMDLPDDHYLSTQTILLKDLN

[0359] 実施例6-2-3 ソルターゼ反応による、標的タンパク質へのGFP10またはGFP11の付加

KRASとGFP10を連結した融合タンパク質 (KRAS-sp10、アミノ酸配列の配列番号: 109)、KRASとGFP11を連結した融合タンパク質 (KRAS-sp11、アミノ酸配列の配列番号: 108)、GSTとGFP10を連結した連結タンパク質 (GST-sp10、アミノ酸配列の配列番号: 110) の調製を行った。

[0360] 具体的には、反応Buffer (0.05M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂) 中、40 μM KRAS-SorTEVHisAvi、1 mM Sor-sp10-12 (もしくは、1 mM Sor-sp11-L12)、1 μM eSrtAを氷上

にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。反応後の液に20mMのEDTAを加えて反応を停止させた。

[0361] 同様に、GSTSorAHisについても同様の反応液を調製し、GFP10を付加した。反応は、37℃で2時間インキュベートした。

[0362] ソルターゼ反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。これらの反応で得られた標的タンパク質の全長配列を下表に示す。

[0363] [表20]

配列番号	タンパク質名	アミノ酸配列
配列番号： 108	KRAS-sp11	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQNHVFVEYDPTIEDSYRKQVVIDG ETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHY REQIKRVKDSQEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIET SAKTRQGVDDAFYTLVREIRKHKEKMSKGGSSDYKDDDDKGGSSL PMTGGGGSGGGSGGSTSEKRDHMLLEVYTAAGITDAS
配列番号： 109	KRAS-sp10	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQNHVFVEYDPTIEDSYRKQVVIDG ETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHY REQIKRVKDSQEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIET SAKTRQGVDDAFYTLVREIRKHKEKMSKGGSSDYKDDDDKGGSSL PMTGGGGSGGGSGGSMPLDDHYLSTQTILLKDLN
配列番号： 110	GST-sp10	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFEL GLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEG AVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDLFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGD HVTHPDMFLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKS SKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDGGSSDYKDDDDKGGSSLPMT GGGGSGGGSGGSMPLDDHYLSTQTILLKDLN

[0364] 実施例6-3 ペプチドディスプレイライブラリの調製

実施例6-3-1 翻訳に使用するアシル化tRNAの合成

W02018/143145および W02018/225864 に記載の手法に準じてパニングに使用するアシル化tRNAを調製した。Pro(4-pip-4-F2), Asp(SMe), Hph(3-Cl), cisPro(4-pip-4-F2), MeHnl(7-F2), Ser(3-F-5-Me-Pyr), MeSer(nPr), MeAla(3-Pyr), Phe(3-Cl), Pic(2), MeGly, Nle, MeSer(tBuOH), Ser(NtBu-Aca), Ser(iPen), nBuGly, MeHph, Ser(Ph-2-Cl)を含む19種類のアミノ酸を用いて、

Elongatorアミノアシル化tRNA混合物を調製した。それぞれのアシル化tRNAの翻訳液中の最終濃度は $10\mu\text{M}$ ～ $20\mu\text{M}$ であった。Pnaz保護のpCpAアミノ酸は、脱保護を実施せずにフェノール抽出以降の作業を行ったInitiatorアミノアシル化tRNAは、W02020/138336に記載の化合物AA_tR-18 (BdpFL-Phe-tRNA(fMet)_cau) と同一化合物であり、最終濃度が $25\mu\text{M}$ になるように翻訳液中に添加して用いた。

[0365] 実施例6-3-2 ペプチドライブラリをコードするランダム化された2本鎖DNAライブラリ

W02013/100132に記載の手法に準じて、DNAライブラリを構築した。TTT、TTG、CTT、CTG、ATT、ATG、GTT、GTG、TCT、TCG、CCG、ACT、GCT、TAC、CAT、CAG、AAC、GAT、GAG、TGC、TGG、CGT、CGG、AGT、AGG、GGTの26種類のトリプレットがランダムに8回ないし9回繰り返して出現するものを用意した。(配列番号：111、119)

[0366] DNAライブラリ (配列番号：111)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(Random_triplet)₉TAGC
CGACCGGCACCGGCACCGGCAAAAAA

[0367] DNAライブラリ (配列番号：119)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(Random_triplet)₈TAGC
CGACCGGCACCGGCACCGGCAAAAAA

[0368] 実施例6-3-3 ペプチドディスプレイライブラリの翻訳

翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE systemを用いた。具体的には、1 mMのGTP、1 mMのATP、20 mMのクレアチンリン酸、50 mMのHEPES-KOH pH7.6、100 mMの酢酸カリウム、1 mMの酢酸マグネシウム、2 mMのスペルミジン、1 mMのジチオスレイトール、1 mg/mL E.coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社) (非特許文献：Yokogawa T et al. 2010に記載の方法で、一部のtRNAを除去している)、 $4\mu\text{g/mL}$ のクレアチンキナーゼ、 $3\mu\text{g/mL}$ のミオキナーゼ、2 unit/mLの無機ピロフォスファターゼ、 $1.1\mu\text{g/mL}$ のヌクレオシドニリン酸キナーゼ、 $0.26\mu\text{M}$ のEF-G、 $2.7\mu\text{M}$ のI

F1, 0.4 μ MのIF2, 1.5 μ MのIF3, 40 μ MのEF-Tu, 59 μ MのEF-Ts, RNasein 0.4 U/ μ L, 1.2 μ Mのリボソーム, 1 μ MのEF-P-Lys, 2.73 μ MのAlaRS, 1 μ MのGlyRS, 0.4 μ MのIleRS, 0.5 μ Mの変異体PheRS (W02016/148044), 0.16 μ MのProRS, 1 μ Mの変異体SerRS (W02016/148044), 0.09 μ MのThrRS, 1 μ Mの変異体ValRS (W02016/148044), 0.11 μ MのLysRS, 3 μ Mのin vitro転写大腸菌tRNA Ala1B, 250 μ Mのグリシン、100 μ Mのイソロイシン、250 μ Mのプロリン、250 μ Mのスレオニン、250 μ Mのリジン、5 mMのN-メチルバリン、5 mMのN-メチルセリン、5 mMのN-メチルアラニン、5 mMのN-メチルフェニルアラニン、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物、25 μ M Initiatorアミノアシル化tRNA(W02017/150732に記載の化合物AAtR-3 (Ac bz-MeCys(StBu)-tRNA^{fMet}CAU)), 0.5 μ M Penicillin G Amidase (PGA)、前述の二本鎖DNAライブラリからW02013/100132に従って調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を1 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加し、37°Cで1時間静置することで翻訳を行った。

[0369] 実施例6-4 パニング

翻訳したdisplayライブラリを使用し、W02013/100132に倣ってパニングを5ラウンド実施した。

[0370] 実施例6-4-1 GSTおよびKRasを標的タンパク質として用いたパニング

ラウンド1では、Streptavidinコーティング磁気ビーズに、GST-HisTev-Bioが0.4 μ Mになるように固定し、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社)のバッファーに、displayライブラリを0.6 μ Mになるように加えて、4 μ M HAT-KRAS-nonbio、0.4 mM GDP存在下で、4°Cで2時間反応させた。

[0371] 反応後に、マグネットで集めて上清を除いたビーズを、2 mM DTTになるように加えたtTBS (ナカライテスク)で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し核酸の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、1xTEV buffer、10 mM DTT、0.1 U/ μ L AcTEVプロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#12575015)を、洗浄後のビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、ライブラリ認識プライマー(Fw-primer (配列番号: 112)、Rv-primer (配列番号: 113))でP

CRして、次のラウンドのインプットライブラリとした。

また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、各ラウンドのライブラリの回収率を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー(Fw-primer (配列番号:112)、Rv-primer (配列番号:113))を使用した。qPCRの反応液は、1 x Ex taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、200000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95°Cで2分加熱後、95°C 10秒、57°C 20秒、72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0372] ラウンド2では、Streptavidinコーティング磁気ビーズに、KRAS-FLAG-Sor-His-Tev-Bioが0.4 μ Mになるように固定し、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社)のバッファーに、displayライブラリを0.3 μ Mになるように加えて、4 μ M GST-HisTevAvi、0.4 mM GDP存在下で、4°Cで2時間反応させた。

その後は、TEV溶出液のDTT濃度を1 mMに変更し、それ以外はラウンド1と同様の作業を行った。

[0373] ラウンド3～ラウンド5では、1xTBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社)のバッファー中で、0.8 μ M KRAS-sp11、0.8 μ M GST-sp10、1 μ M ビオチン化GFP1-9に対して、displayライブラリを0.3 μ Mになるように加えて、4°Cで2時間反応させた。

[0374] Streptavidinコーティング磁気ビーズを用いたプルダウンによりビオチン化GFP1-9もしくはこれを含む複合体を回収し、tTBS (ナカライテスク)で数回洗浄後、GFP1-9とビオチンとの間に導入したTEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し核酸の溶出を行った。具体的なTEV溶出液として、1xTEV buffer、1 mM DTT、0.1 U/ μ L AcTEVプロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#12575015)を、洗浄後のビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、ライブラリ認識プライマー(Fw-primer (配列番号:112)、Rv-primer (配列番号:113))でPCRして、次のラウンドのインプットライブラリとした。

[0375] また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、ライブラリの回収率を評

価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー(Fw-primer (配列番号: 112)、Rv-primer (配列番号: 113))を使用した。qPCRの反応液は、1 x Exta q buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μ M Fw-primer、0.5 μ M Rv-primer、200000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.02 U/ μ L Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95°Cで2分加熱後、95°C 10秒、57°C 20秒、72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0376] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、インプットライブラリを、1E+8/ μ L、1E+6/ μ L、1E+4/ μ L、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0377] 2ラウンド目以降は、インプットライブラリを2つにわけ、片方は標的タンパク質存在下、もう片方は標的タンパク質非存在下でセクションを行い、双方の核酸回収率を、qPCRの結果から評価した。パニングの各ラウンドの回収率(%)を以下の式により算出した。結果を下表に示す。

[0378] ライブラリの回収率(%) = ライブラリのアウトプット核酸量(分子数) / (ライブラリのインプット核酸量(分子数)) $\times$ 100

[0379] [表21]

ラウンド	標的タンパク質		ライブラリのインプット核酸量(分子)	標的タンパク質存在下		標的タンパク質非存在下	
	ビーズ固定側	遊離側		アウトプット核酸量(分子)	回収率(%)	アウトプット核酸量(分子)	回収率(%)
1	GST	KRAS	1.80E+12	3.03E+05	1.68E-05	-	-
2	KRAS	GST	1.77E+12	2.94E+06	1.66E-04	3.13E+06	1.77E-04
3	splitGFP適用		3.45E+11	4.97E+07	1.44E-02	1.74E+06	5.03E-04
4	splitGFP適用		7.28E+11	3.06E+08	4.21E-02	9.76E+06	1.34E-03
5	splitGFP適用		8.25E+11	1.02E+09	1.24E-01	9.00E+06	1.09E-03

[0380] ラウンド1では、GST-HisTev-Bioの代わりにKRAS-FLAGSorHisTev-Bioを使用し、HAT-KRAS-nonbioの代わりにGST-HisTevAviを使用、ラウンド2ではKRAS-FLAGSorHisTev-Bioの代わりにGST-HisTev-Bioを使用し、GST-HisTevAviの代わりにHAT-KRAS-nonbioを使用した以外は実施例6-4-1の方法に準じてパニングを行った。ラウンド3～ラウンド5については実施例6-4-1の方法に従って行った。パニングの各ラウンドの回収率(%)を下表に示す。

[0381] [表22]

ラウンド	標的タンパク質		ライブラリのイン プット核酸量 (分子)	標的タンパク質存在下		標的タンパク質非存在下	
	ビーズ固定側	遊離側		アウトプット核酸 量 (分子)	回収率(%)	アウトプット核酸 量 (分子)	回収率(%)
1	KRAS	GST	2.49E+12	2.30E+04	9.24E-07	-	-
2	GST	KRAS	1.84E+12	5.71E+06	3.10E-04	8.32E+06	4.51E-04
3	splitGFP適用		3.67E+11	4.19E+07	1.14E-02	1.61E+06	4.39E-04
4	splitGFP適用		9.23E+11	3.96E+08	4.29E-02	9.31E+06	1.01E-03
5	splitGFP適用		8.13E+11	5.65E+08	6.94E-02	8.87E+06	1.09E-03

[0382] 結果、表21および22に示すように後半ラウンドにおいて、標的タンパク質存在下と標的タンパク質非存在下のセクション間で回収率に差がついていることから、標的タンパク質存在下においてのみ回収される分子が、各ラウンドのライブラリに存在し、それらがラウンドを重ねる毎に濃縮されている可能性が考えられる。

[0383] 実施例6-4-2 FKBPおよびKRASを標的タンパク質として用いたパニング

GST-HisTev-Bioの代わりにFKBP-HisTev-Bioを使用し、GST-HisTevAviの代わりにFKBP-HisTevAviを使用した以外は実施例6-4-1の方法に準じてラウンド1およびラウンド2を行った。

[0384] KRAS-sp11の代わりにHisx6-FKBP12-Link12-GFP11を使用し、GST-sp10の代わりにKRAS-sp10を使用した以外は実施例6-4-1の方法に準じてラウンド3～ラウンド5を行った。

パニングの各ラウンドの回収率(%)を下表に示す。

[0385] [表23]

ラウンド	標的タンパク質		ライブラリのイン プット核酸量 (分子)	標的タンパク質存在下		標的タンパク質非存在下	
	ビーズ固定側	遊離側		アウトプット核酸 量 (分子)	回収率(%)	アウトプット核酸 量 (分子)	回収率(%)
1	FKBP	KRAS	1.40E+12	7.24E+04	5.19E-06	-	-
2	KRAS	FKBP	1.34E+12	2.34E+06	1.75E-04	1.73E+06	1.29E-04
3	splitGFP適用		3.50E+11	3.71E+07	1.06E-02	3.94E+06	1.13E-03
4	splitGFP適用		7.89E+11	3.16E+08	4.01E-02	7.34E+06	9.31E-04
5	splitGFP適用		7.41E+11	1.60E+09	2.16E-01	5.57E+06	7.51E-04

[0386] ラウンド1では、FKBP-HisTev-Bioの代わりにKRAS-HisTev-Bioを使用し、KRAS-FLAG-Sor-His-Tev-Bioの代わりにFKBP-HisTevAviを使用、ラウンド2

ではKRAS-FLAGSorHisTev-Bioの代わりにFKBP-HisTev-Bioを使用し、FKBP-HisTevAviの代わりにHAT-KRAS-nonbioを使用した以外は、実施例6-4-1の方法に準じてパニングを行った。

[0387] FKBP-HisTev-Bioの代わりにKRAS-HisTev-Bioを使用し、KRAS-FLAG-Sor-His-Tev-Bioの代わりにFKBP-HisTevAviを使用した以外は実施例6-4-2の方法に準じてラウンド1およびラウンド2を行った。ラウンド3～ラウンド5については実施例6-4-2の方法に従って行った。パニングの各ラウンドの回収率(%)を下表に示す。

[0388] [表24]

ラウンド	標的タンパク質		ライブラリのイン プット核酸量 (分子)	標的タンパク質存在下		標的タンパク質非存在下	
	ビーズ固定側	遊離側		アウトプット核酸 量 (分子)	回収率(%)	アウトプット核酸 量 (分子)	回収率(%)
1	KRAS	FKBP	2.52E+12	2.48E+06	9.86E-05	-	-
2	FKBP	KRAS	5.29E+11	9.26E+05	1.75E-04	6.90E+05	1.31E-04
3	splitGFP適用		8.37E+11	2.73E+08	3.26E-02	8.27E+06	9.88E-04
4	splitGFP適用		9.60E+11	5.98E+08	6.23E-02	7.21E+06	7.51E-04
5	splitGFP適用		1.00E+12	1.08E+09	1.08E-01	3.26E+07	3.26E-03

[0389] 結果、表23および24に示すように後半ラウンドにおいて、標的タンパク質存在下と標的タンパク質非存在下のセレクション間で回収率に差がついていることから、標的タンパク質存在下においてのみ回収される分子が、各ラウンドのライブラリに存在し、それらがラウンドを重ねる毎に濃縮されている可能性が考えられる。

産業上の利用可能性

[0390] 本開示におけるスクリーニング方法により、多様な分子を含むライブラリの中から、複数の標的分子と共に複合体を形成し得る分子をハイスループットに選択することができる。本開示のスクリーニング方法によれば、一つの標的分子のみと複合体を形成する被験分子を排除しつつ、目的の候補分子を効率的に取得することが可能である。また本開示におけるスクリーニング方法を用いれば、複数の標的分子との多様な結合様式を生じうる候補分子を取得することが期待できる。本開示におけるスクリーニング方法は、医薬品の

新たな候補分子の探索において有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 以下（１）および（２）の工程を含む、第１の標的分子および第２の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子をスクリーニングする方法：
- （１）第１の部分に連結した前記第１の標的分子、第２の部分に連結した前記第２の標的分子、および複数の被験分子を含むライブラリを混合する工程であって、該第１の部分および該第２の部分がタンパク質の一部または全部を構成する工程；および
- （２）工程（１）の後に、前記第１の部分と前記第２の部分が近接または会合していることを検出し得る第３の分子を介したアフィニティを利用した方法を用いて、前記第１の部分に連結した第１の標的分子、前記第２の部分に連結した第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体を回収する工程。
- [請求項2] 工程（２）の後に、回収された複合体に含まれる候補分子を同定する工程（工程（３））をさらに含む、請求項１に記載の方法。
- [請求項3] 前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分が近接または会合した場合に、前記第１の部分および／または前記第２の部分と反応する分子である、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項4] 前記第３の分子は、前記第１の部分および前記第２の部分が近接も会合もしていない場合、前記第１の部分および／または前記第２の部分と実質的に反応しない分子である、請求項１～３のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 工程（２）と工程（３）の間に、前記第１の部分に連結した第１の標的分子、前記第２の部分に連結した第２の標的分子、および、前記候補分子を含む複合体から前記候補分子を溶出する工程（工程（２Ａ））をさらに含む、請求項２～４のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] 工程（３）が、工程（２Ａ）で溶出された候補分子をエンコードするポリヌクレオチドの配列を決定することを含む、請求項５に記載の

方法。

- [請求項7] 工程（１）および（２）を複数回繰り返す工程を含む、請求項１～６のいずれかに記載の方法。
- [請求項8] *in vitro*で行われる、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
- [請求項9] 前記ライブラリが、ディスプレイライブラリまたはDNAエンコードライブラリである、請求項１～８のいずれかに記載の方法。
- [請求項10] 前記ライブラリが、 1×10^4 以上の多様性を有するライブラリである、請求項１～９のいずれかに記載の方法。
- [請求項11] 前記タンパク質が、GFP、ルシフェラーゼ、ユビキチン、またはSNAPタグである、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。
- [請求項12] 前記アフィニティーを利用した方法が、プルダウン法である、請求項１～１１のいずれかに記載の方法。
- [請求項13] 工程（２Ａ）における溶出が、酵素、または熱により行われる、請求項５～１２のいずれかに記載の方法。
- [請求項14] 工程（２Ａ）における溶出が、前記タンパク質の第１の部分と前記第１の標的分子の間に位置する第１のリンカー、および、前記タンパク質の第２の部分と前記第２の標的分子の間に位置する第２のリンカーを切断することにより行われる、請求項５～１３のいずれかに記載の方法。
- [請求項15] 前記第１の部分および第２の部分を提供する前記タンパク質が、以下（ａ）～（ｃ）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１～１４のいずれかに記載の方法；
- （ａ）配列番号：７１、７５、７８、または８２で表されるアミノ酸配列、
- （ｂ）配列番号：７１、７５、７８、または８２で表されるアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加されたアミノ酸配列、および
- （ｃ）配列番号：７１、７５、７８、または８２で表されるアミノ酸

配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。