

平成20年度 第3回特許ビジネス市 in 大阪

平成20年11月26日

## 汎用性の高いタンパク質蛍光ラベル化法の開発

〔「ペプチド又は蛋白質標識用の蛍光色素、及び該蛍光色素を利用した標識方法」特願2006-053956〕

名古屋市立大学大学院 薬学研究科

梅澤直樹

## 発表の概略

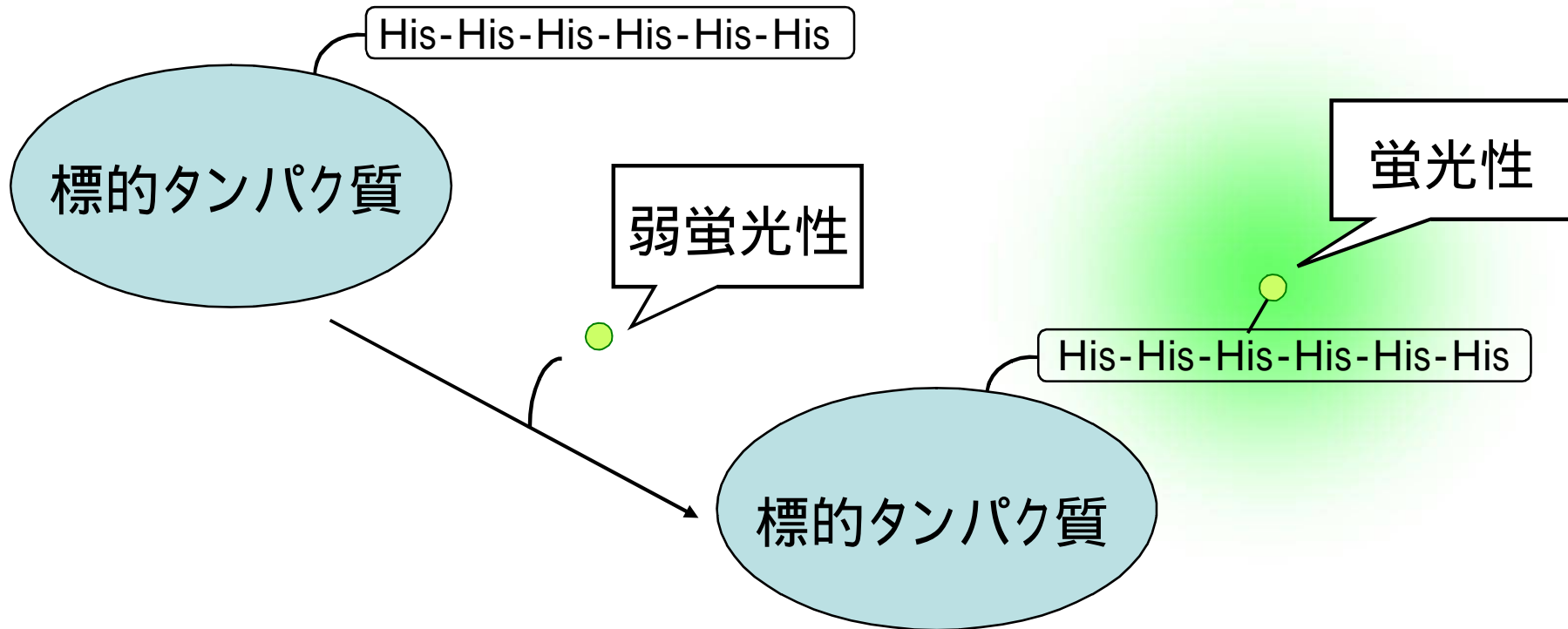
- 技術内容
  - － 従来技術とその問題点
  - － 技術の主要部説明
  - － 効果
  - － 利用分野・適用分野
- 特許の説明
  - － 請求の範囲
  - － 周辺特許
- ビジネスプラン

## 発表の概略

- 技術内容
  - － 従来技術とその問題点
  - － 技術の主要部説明
  - － 効果
  - － 利用分野・適用分野
- 特許の説明
  - － 請求の範囲
  - － 周辺特許
- ビジネスプラン

# 技術内容

## 「ヒスタグと結合し発蛍光する分子」の開発



【課題】標識操作が簡便であり、迅速かつ可逆的標識が可能であり、しかも一般性の高い標識法を可能とする蛍光色素、及びそれを利用した標識方法などを提供することを課題とする。

# 蛍光イメージング

蛍光イメージング: タンパク質の細胞内局在や機能を研究する強力な手法

標的タンパク質の特異的な蛍光標識が必要

## よく用いられるタンパク質の蛍光標識法

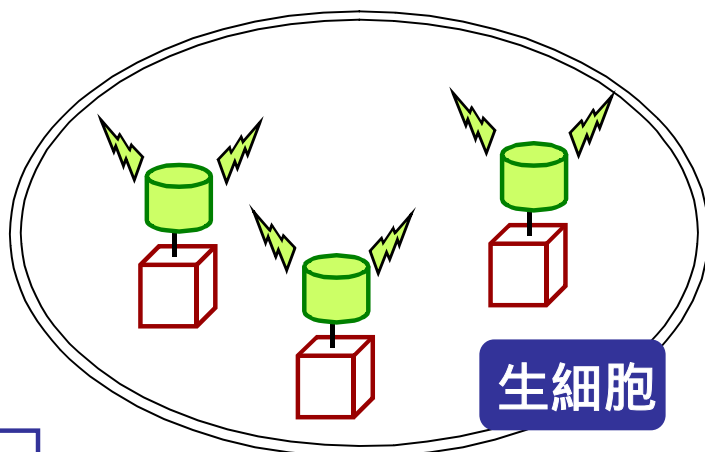
- 蛍光タンパク質の利用
- “タンパク質タグ” / “ペプチドタグ”と蛍光性分子の利用
- 〔 非天然型蛍光性アミノ酸の導入 〕

# 蛍光タンパク質

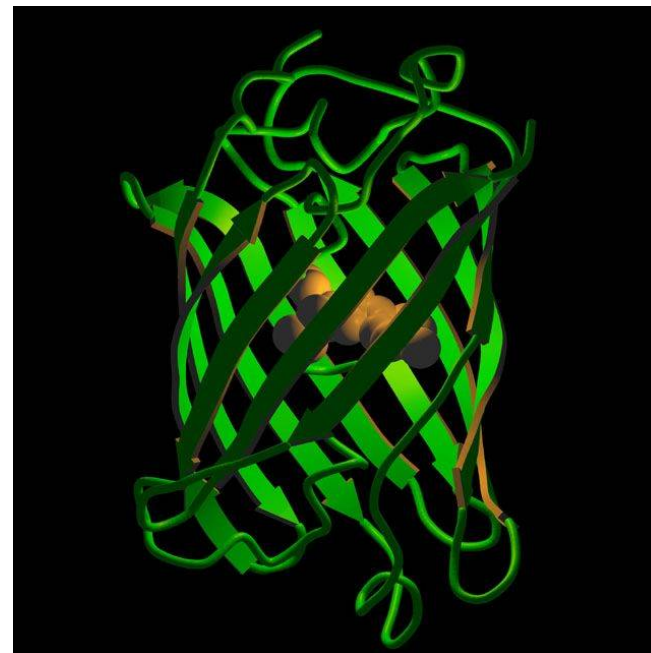
蛍光タンパク質

標的タンパク質

遺伝子導入



Green Fluorescent Protein: GFP



<http://www.tsienlab.ucsd.edu/>

長所

- 自発的に蛍光団を形成するため、ラベル化が簡便
- 特異性が高い

短所

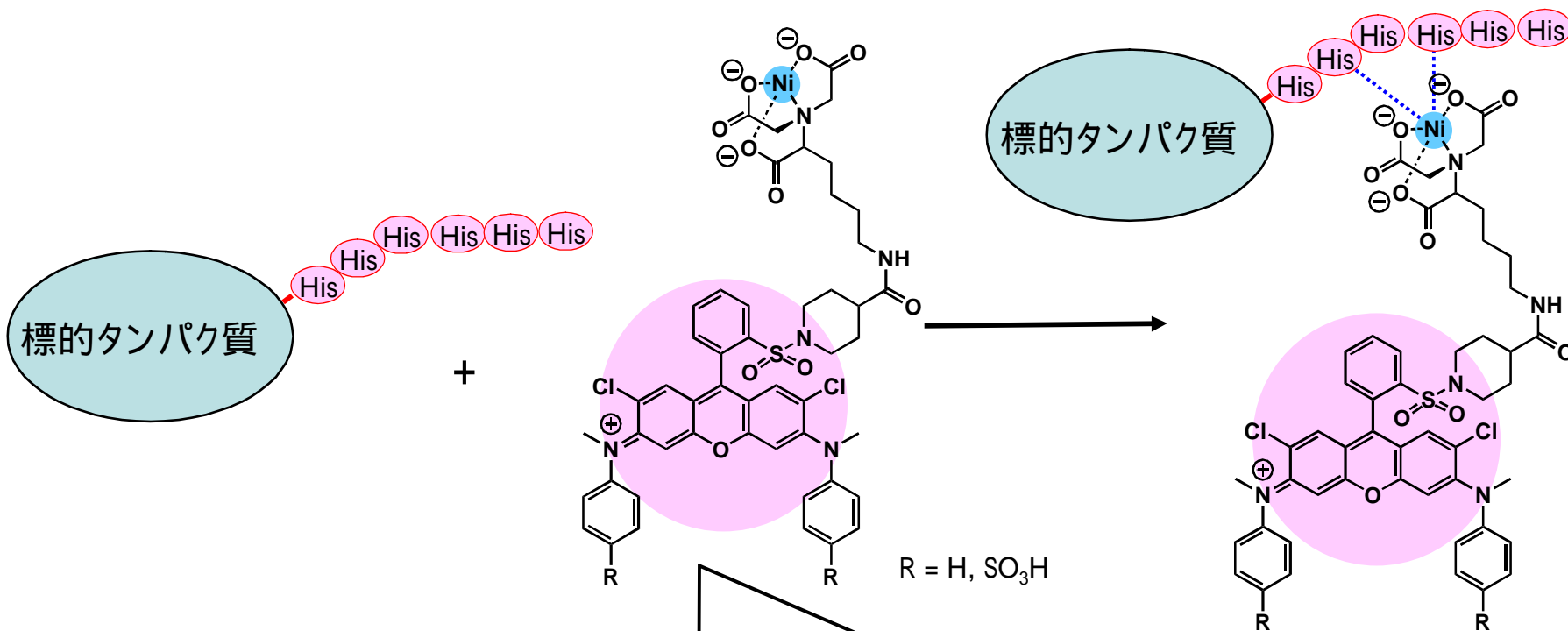
- 標的タンパク質への影響 (構造、機能、局在の変化)
- 蛍光団に制限がある



小分子を用いた選択的蛍光標識法が注目を集めている

# ペプチドタグを用いたタンパク質標識：報告例

ヒスタグ + ニッケル錯体



ペプチドタグとの結合前も蛍光を有する

Kapanidis, A. N.; Ebright, Y. W.; Ebright, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 12123-12125.  
Guignet, E. G.; Hovius, R.; Vogel, H. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 440-444.

# ペプチドタグを用いたタンパク質標識：従来法

ペプチドタグ + 蛍光性有機小分子

タグ

標的タンパク質

遺伝子導入

ペプチドタグと特異的に結合する  
蛍光性小分子

生細胞

長所

- 標的タンパク質への影響が少ない
- 多様な蛍光団を選択できる

短所

- タグとの結合前も蛍光を有する
- 細胞内のラベル化が困難

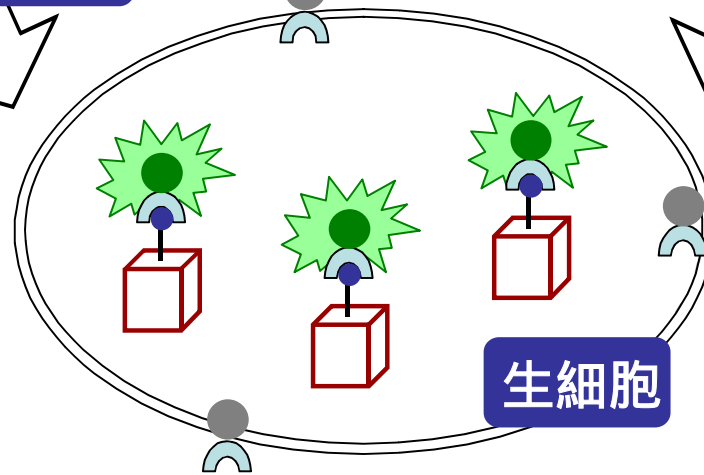


# ペプチドタグを用いたタンパク質標識: 我々の方法

ペプチドタグ + 蛍光性有機小分子

タグ 標的タンパク質

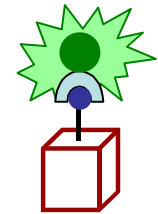
遺伝子導入



無蛍光

タグ

発蛍光



タグ配列認識後に蛍光強度が増大する蛍光プローブの開発

標識後の洗浄や精製が不要

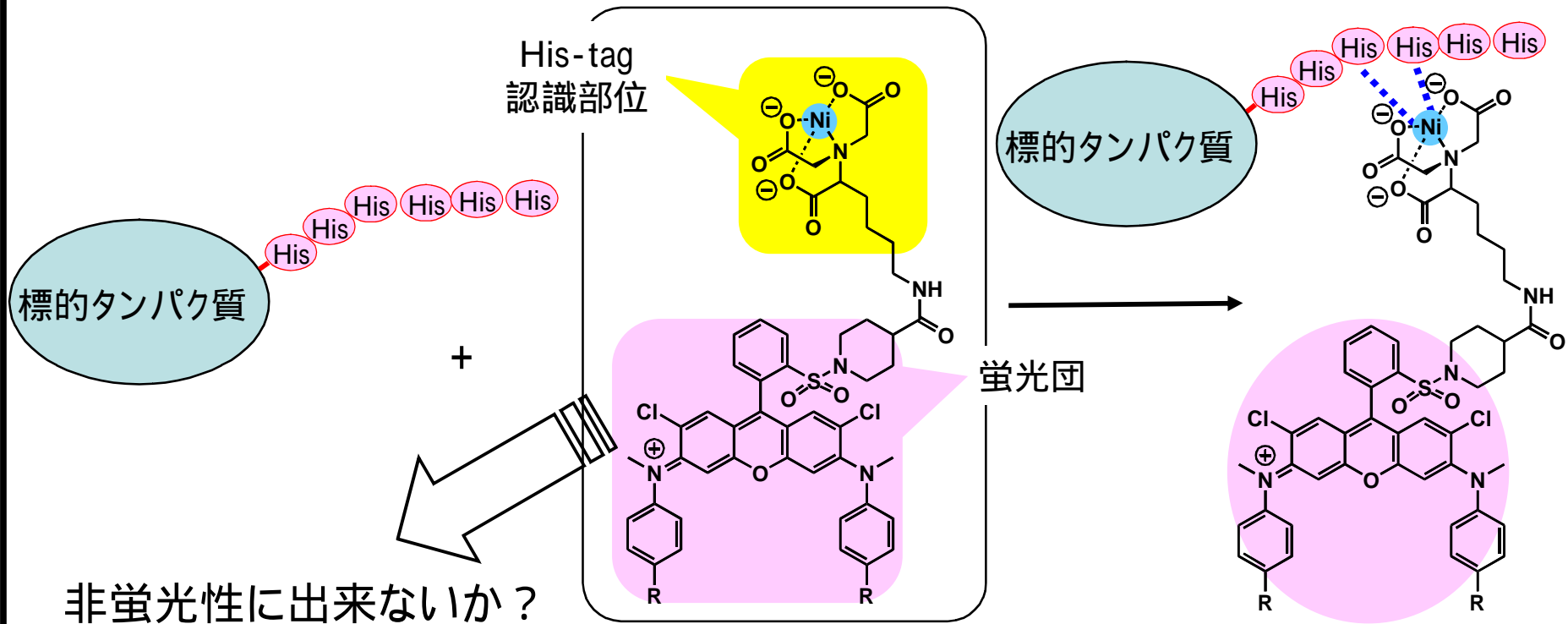


細胞内イメージングに適する

# 技術内容1

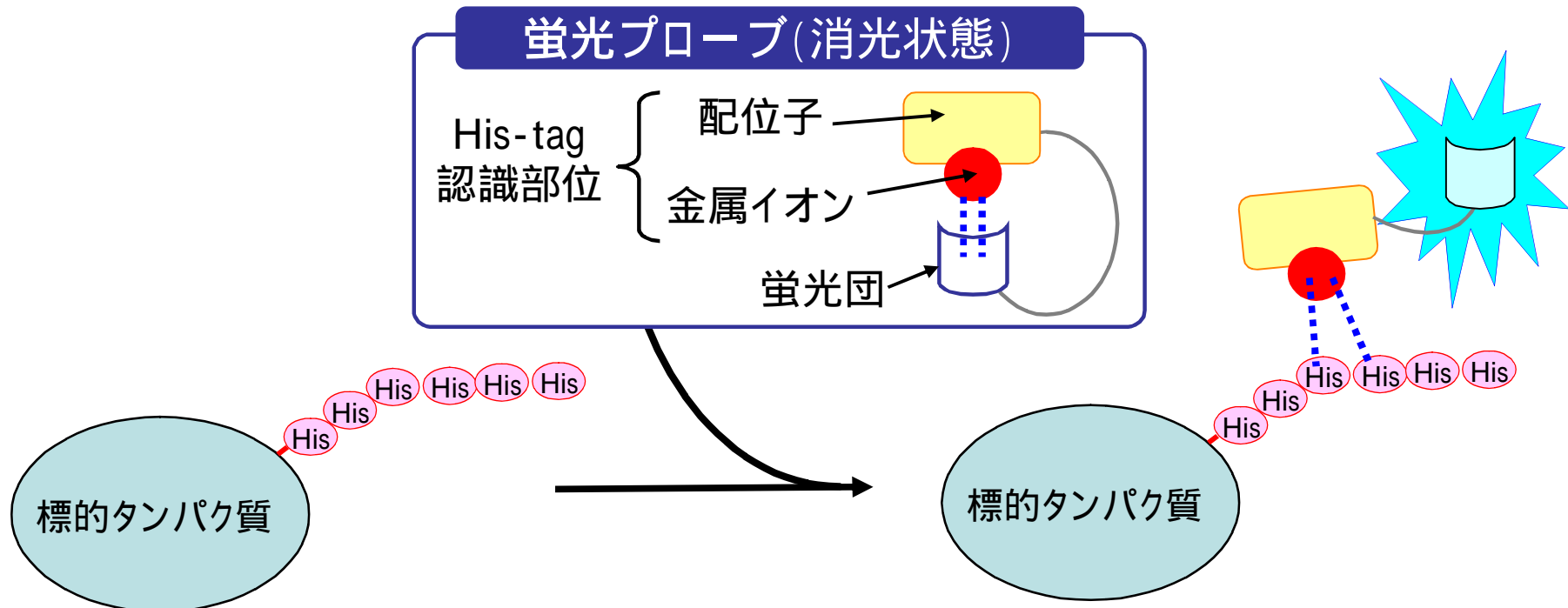
“His-tag/nickel complex system”に着目

- ・タンパク質精製のアフィニティクロマトグラフィーで多くの実績を持つ
  - ・タグが短い
  - ・相互作用が選択的
  - ・様々なHis-tag導入タンパク質が知られている
- 等

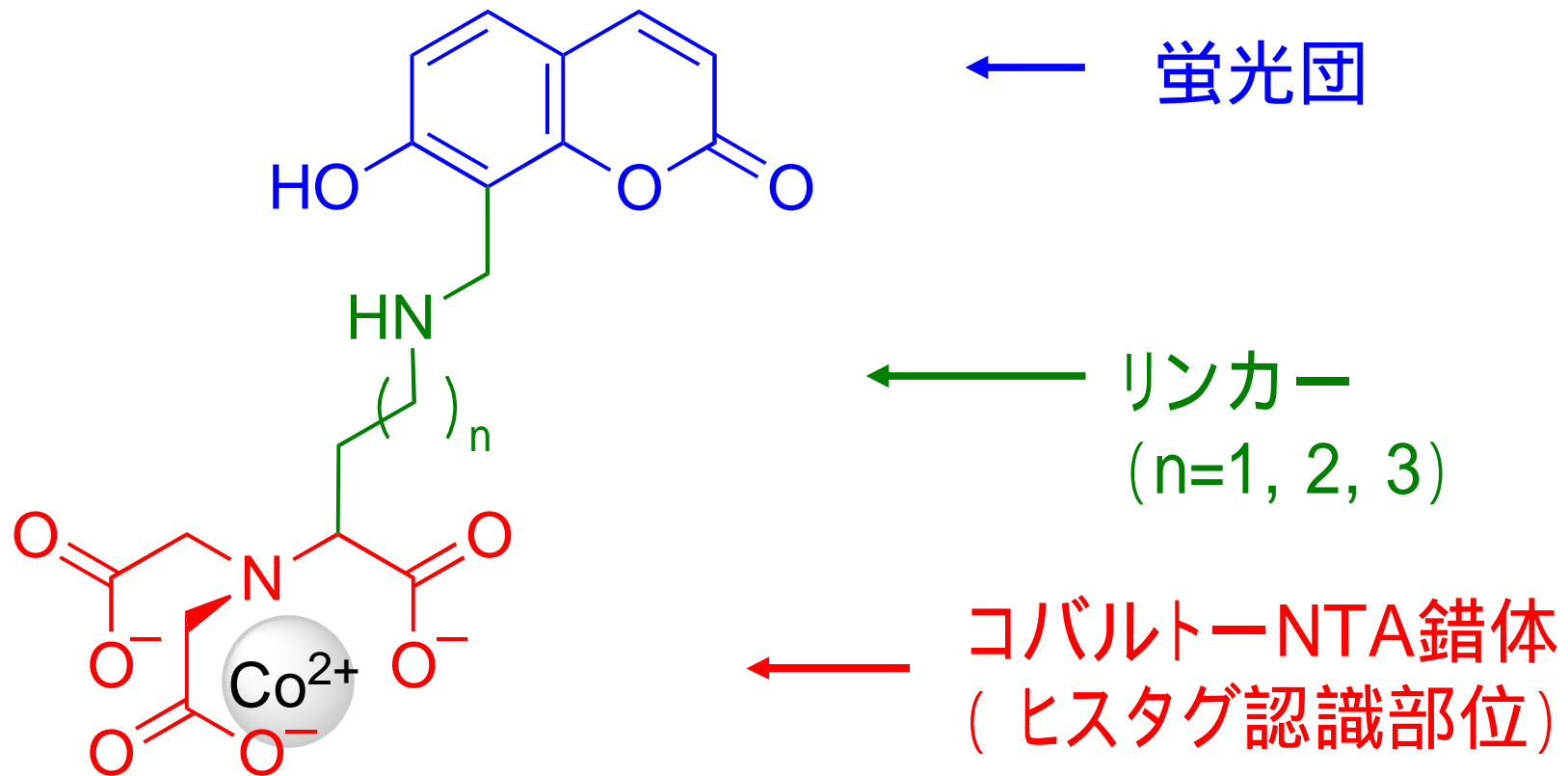


## 技術内容2

【解決手段】金属錯体を形成し、金属配位性ペプチドに対する特異的結合能を発揮する配位子と、蛍光団とがリンカーを介して結合された発光色素が提供される。発色団は、配位子が形成する金属錯体における中心金属に対して配位能を有する。発色団が金属に配位することで蛍光が消光する。金属配位性ペプチドの添加により、発色団は金属に配位しなくなり、蛍光が増大(回復)する。

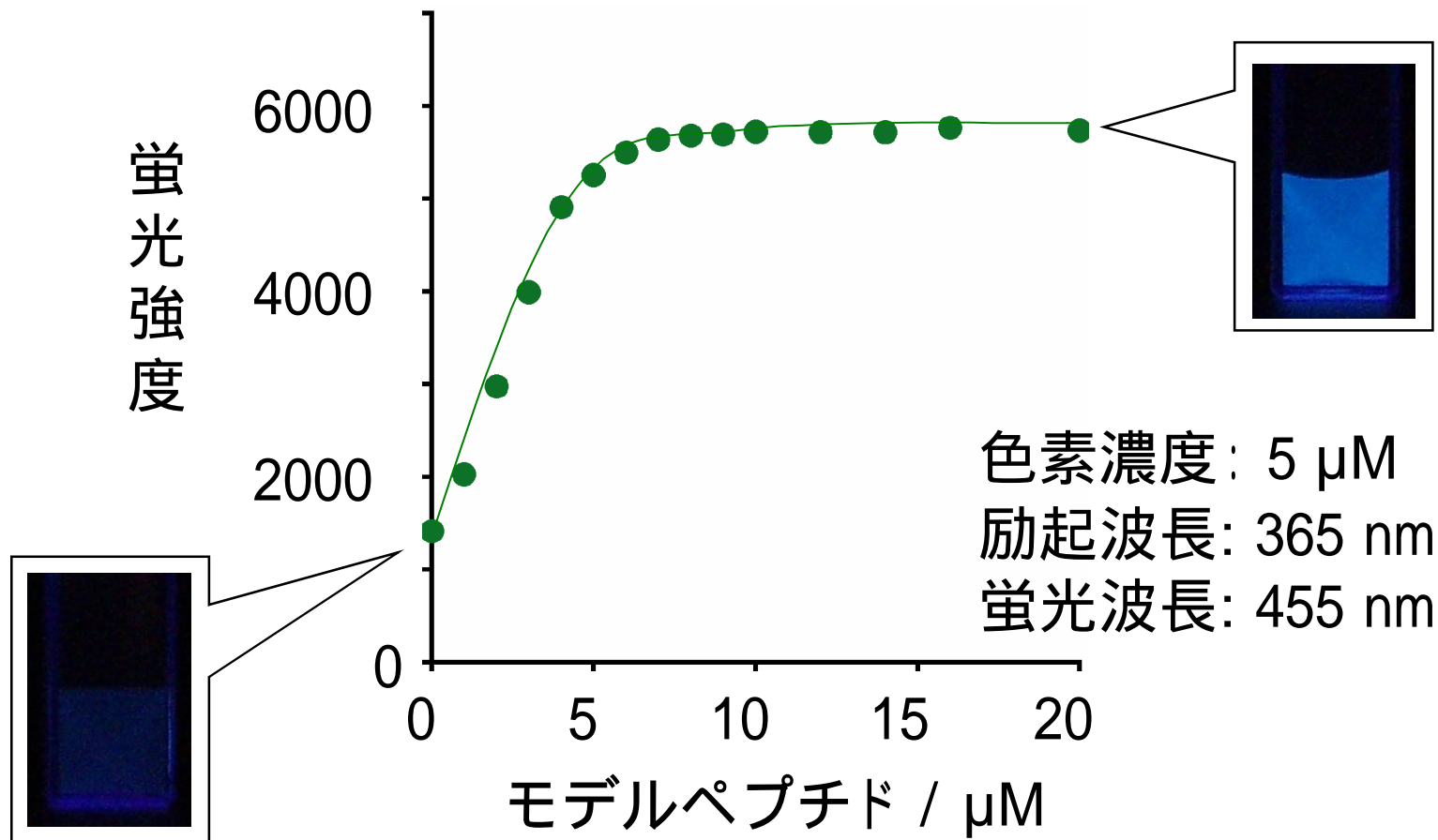


## 技術内容3：開発した分子



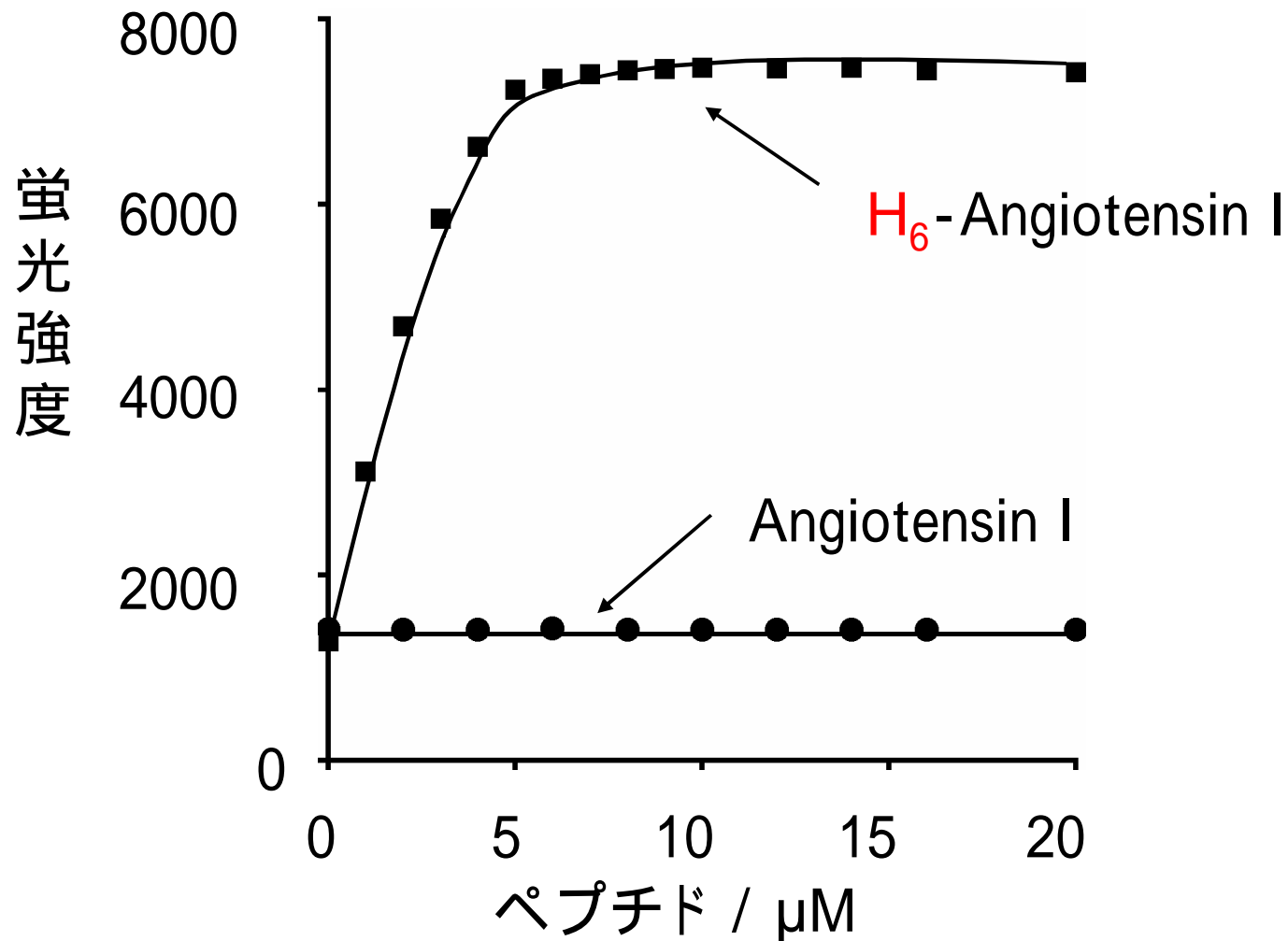
1段階蛍光標識が可能。細胞内イメージングへの応用も期待できる。

# 技術内容4：開発した分子の物性



モデルペプチド: His-His-His-His-His-His-Tyr-NH<sub>2</sub>

## 技術内容4：開発した分子の選択性



Angiotensin I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

# 発表の概略

- 技術内容
  - － 従来技術とその問題点
  - － 技術の主要部説明
  - － 効果
  - － 利用分野・適用分野
- 特許の説明
  - － 請求の範囲
  - － 周辺特許
- ビジネスプラン

# 特許の説明:特許情報

1、発明の名称	ペプチド又はタンパク質標識用蛍光色素、及び該蛍光色素を利用した標識方法			
2、出願	出願番号	特願2006-053956	出願日	平成18年2月28日 (2006)
	出願人	名古屋市立大学	審査請求有無	無 審査請求期限平成21年2月28日
3、公開・登録情報	公開番号	特開2007-231124	登録番号	なし
4、権利者	公立大学法人名古屋市立大学			
5、関連特許	特になし			



## 特許の説明：請求の範囲

【請求項1】 金属錯体を形成し、金属配位性ペプチドに対する特異的結合能を発揮する配位子と、リンカーを介して前記配位子に結合した蛍光団であって、前記配位子が形成する金属錯体における中心金属に対して配位能を有する蛍光団と、を含む蛍光色素。

…以下、省略…

## 特許の説明: 周辺特許

タンパク質やペプチドの蛍光標識は生化学の進展に重要な役割を果たしている。だが、従来の方法には、

- ・GFP法ではタンパク質の分子サイズに問題がある
  - ・FIA<sub>s</sub>H法では光に対する安定性、Asの毒性の問題がある
  - ・Bertozziの方法は、難易度が高く、官能基の酸化による標識不能化がある
- 等々 改良の余地がある。

本特許は、これらの欠点をカバーするため特定ペプチド配列と相互作用することで始めて発蛍光させる発明である。

## 特許の説明：特徴

安定性のある標識・蛍光ラベル方法

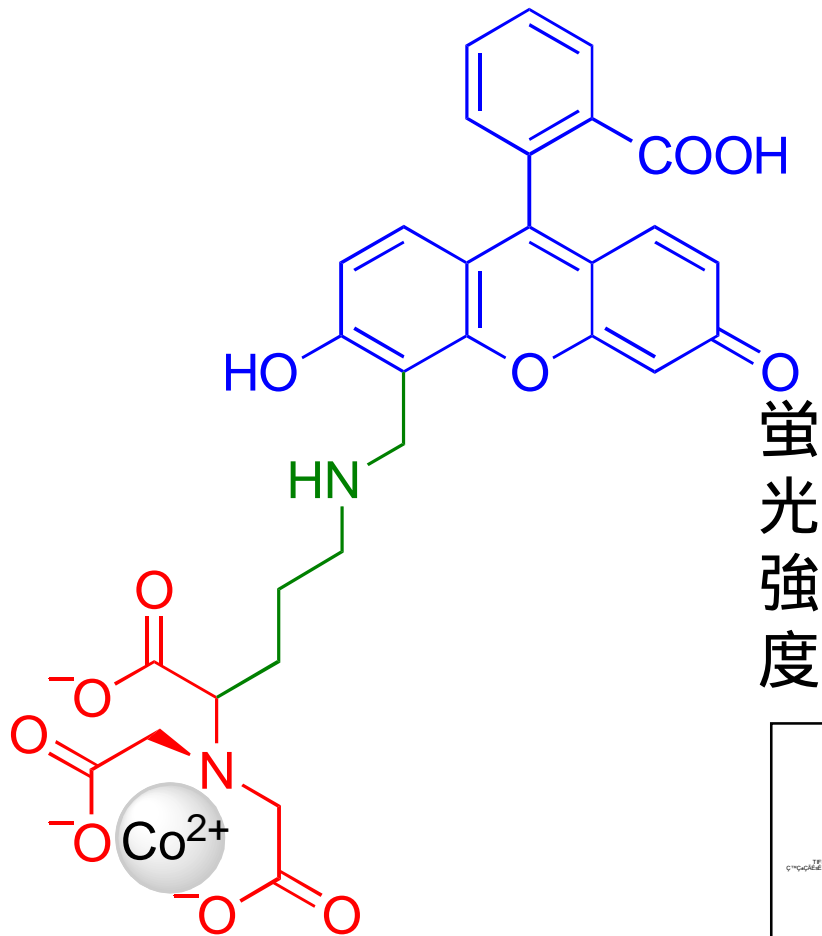
従来の標識法より安全な方法

・Asなど毒性物質を使いません。

従来法の問題点 ・利便性を改良

・特許によるラベル化法：点灯・消灯が自由です。

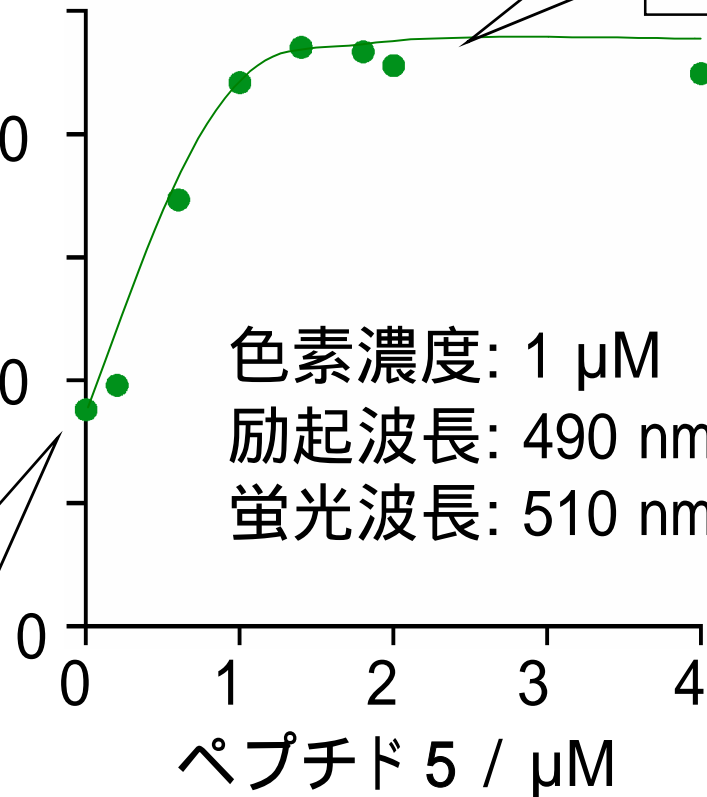
# 追加: 特願2008-208933



蛍光強度



4000  
2000  
0



モデルペプチド: His-His-His-His-His-His-Tyr-NH<sub>2</sub>

## 発表の概略

- 技術内容
  - － 従来技術とその問題点
  - － 技術の主要部説明
  - － 効果
  - － 利用分野・適用分野
- 特許の説明
  - － 請求の範囲
  - － 周辺特許
- ビジネスプラン

# 本特許発明の応用

バイオプロセスを持つ産業及び・開発

→ 酵素工業・醗酵工業

→ 研究・開発・人体・家畜

医療

診断・治療

癌・腫瘍の転移診断

# 本特許発明の理想的実施形態

試薬製造方法のマニュアル化

試薬の適用範囲の拡大化

試薬の販売ルート of 確保・拡充

技術の国際的認知を得る工夫

海外市場の模索

## 特許内容：製造・販売コスト

項 目	本特許の実施目標	備考
原価(製造費、販売経費・償却・特許料など) (千円)	50,000	原価: 売上の 50% 50,000
原料費・加工費 原価に含む	—	原料費・製造費
販売経費 原価に含む	—	営業費・販促費
総 計(千円)消費 税5%含まず	50,000	売上 100,000



# ビジネスプラン:計画

実施項目	初年度	2年度	3年度
1. 蛍光試薬市場の 想定全国シェア (億円)	300 1倍	336 1.12倍	376.3 1.25倍
2. 本試薬・技術の 販売・普及シェア(%)	1 1倍	1.5 前年x1.5	2.25 前年x1.5
3. 特許権の実施許諾 (特許権者実施)	1社	2社	3社
4. 技術指導・普及活動 (特許権者実施)	1社	2社	3社

# ビジネスプラン：予想売り上げ計画

	初年度	2年度	3年度
1. 総売上(千円)	300,000	500,000	850,000
2. 経費(千円)	150,000	250,000	425,000
3. 粗利益 (千円)	150,000	250,000	425,000
4. ライセンス・指導料は経費に含むものとする(5%程度)	(7,500 千円)	(12,500 千円)	(21,250 千円)

# ビジネスプラン：今後の課題

1. バイオプロセス 工業の発展・挙動のウォッチング。  
企画・調査会社との連携。常に戦略軌道修正を。
2. バイオ工業にシフトした特許の取得・拡大。
3. 医療分野への発展を思考。
4. 基礎・応用研究機関との連携。