

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5103615号
(P5103615)

(45) 発行日 平成24年12月19日(2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月12日(2012.10.12)

(51) Int.Cl.	F I		
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 4 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-545101 (P2006-545101)	(73) 特許権者	504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島1-5-45
(86) (22) 出願日	平成17年11月16日(2005.11.16)	(74) 代理人	100107515 弁理士 廣田 浩一
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/021041	(74) 代理人	100107733 弁理士 流 良広
(87) 国際公開番号	W02006/054600	(74) 代理人	100115347 弁理士 松田 奈緒子
(87) 国際公開日	平成18年5月26日(2006.5.26)	(72) 発明者	岡澤 均 日本国 235-0023 神奈川県横浜市磯子区森3丁目4番46号
審査請求日	平成20年10月17日(2008.10.17)	審査官	高山 敏充
(31) 優先権主張番号	特願2004-335065 (P2004-335065)		
(32) 優先日	平成16年11月18日(2004.11.18)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規タンパク質及びそれを利用したポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項2】

請求項1記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項3】

請求項2記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項4】

請求項2記載の遺伝子を含有する組換えベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規タンパク質、及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに詳しくは、ポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬の技術分野に属する。

【背景技術】

【0002】

転写機能障害は、ポリグルタミン病等の神経変性疾患における重要な病理学的要素である。本発明者は既にポリグルタミン病では少数遺伝子の発現低下ではなく、遺伝子発現全体が傷害されることを示してきた(非特許文献1参照)。すなわち、多数の転写因子は、ポリグルタミン病の変異タンパク質に共局在する、あるいは相互作用することが分かって

いる。転写因子の機能の総体である一般的な転写レベルは、変異ポリグルタミンタンパクによってダウンレギュレートされる。ポリグルタミン病における主要な課題の1つは、転写機能障害と神経細胞死との関係を明らかにすることである。しかし、転写機能の阻害が神経細胞死を引き起こすか否かは定かでない。また、転写が著しく阻害された場合に、どのようにして神経細胞が死に至るかについても全く分かっていない。

【0003】

【非特許文献1】BBRC, vol. 313, p110-116(2004).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上述のように、神経変性疾患、特にポリグルタミン病においては細胞における転写障害が主要な分子病態の一つと考えられている。しかし、転写障害が実際に神経細胞死を引き起こすのか否か、また、どのような形態の細胞死が引き起こされるのかについては未だ知られていない。

そこで本発明は、上記従来状況に鑑み、転写機能障害と神経細胞死との関係を明らかにするとともに、得られる知見からポリグルタミン病等の神経変性疾患における予防・治療薬となり得る新規タンパク質を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決するため、本発明者は、まずRNAポリメラーゼIIを特異的に阻害する-アマニチン(AMA)を作用させた神経細胞の分析を行った。その結果、アマニチンが極めて緩徐な神経細胞死を引き起こすことを発見した。神経細胞の半分が死に至るまでの期間は5日以上であった。この死にゆく細胞の形態学的特徴は、電子顕微鏡で分析した結果、アポトーシス、またはネクローシスとは区別されるものであった。また、電気泳動によるDNAラダーは観察されなかった。さらに、死にゆく神経細胞は、pEGFP-LC-3で標識されるオートファゴソームとは別の細胞質の液胞を有していた。

【0006】

そして、アポトーシスと、アマニチンにより誘発される神経細胞死との遺伝子発現の比較により、転写活性化因子(コアクチベーター)として知られるYAPの新規アイソフォームの存在を見出した。新規アイソフォームは、非典型的な神経細胞死の過程において発現するものである。これらのアイソフォームは、転写活性化ドメインが欠如しており、P73及びYAPが仲介するMCF-7細胞のアポトーシスを抑制するものであった。このことは、新規アイソフォームが細胞死に対する優性ネガティブ効果を有していることを示している。YAPアイソフォームを発現するアデノウイルスベクターもまた、-アマニチンによって誘発される神経細胞死を抑制した。つまり、転写抑制は、非典型的かつ緩徐な神経細胞死を引き起こすが、その細胞死は、YAPの新規アイソフォームによって抑制できることが明らかになった。

【0007】

この緩徐な神経細胞死の過程は、アポトーシス、ネクローシス、またはオートファジーとはまったく別のものである。本発明者は、この新しい神経細胞死の形態を、ポリグルタミン病における神経変性のプロトタイプとして提案するとともに、これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の(1)~(6)の構成からなる。

(1)以下の(a)又は(b)のタンパク質。

(a)配列番号1~配列番号3のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b)アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ転写活性化因子YAPに対する優性ネガティブ効果を有するタンパク質。

(2)上記(1)記載のタンパク質をコードする遺伝子。

10

20

30

40

50

(3) 上記(2)記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

(4) 上記(2)記載の遺伝子を含有する組換えベクターを含む形質転換体。

(5) 上記(1)記載のタンパク質を含むポリグルタミン病、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患の予防・治療薬。

(6) 上記(1)記載のタンパク質を介する細胞内シグナル伝達を利用したポリグルタミン病、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患の予防・治療薬。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、極めて緩徐に進行する神経細胞死の新しい形態(オメガプロセス、OP)の存在が明らかにされるとともに、転写活性化ドメインが欠如したYAPの新規アイソフォームを見出し、このアイソフォームがOPを抑制するのに重要な役割を果たすことが証明された。

このYAPの新規アイソフォームは、神経細胞死を抑制するため、ポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬として利用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明者は、転写機能と神経細胞死との関係を明らかにすべく、初めにRNAポリメラーゼII(PolII)に対する多数のsiRNAを作製した。しかし、類似のアプローチによって基本的な転写機構を解明しようとする最近の研究と同様に、PolIIの抑制は不十分に終わった。そこで我々は、PolIIの有効な阻害剤であるアマニチンを利用した。このAMA分子はPolIIを補足できる。

【0010】

まず、3つの異なる濃度のAMAを、ヒーラ(Hela)細胞、ラット胚(E15)の皮質ニューロンの初代培養、及びラットの小脳ニューロンの初代培養の培地に加えた。そして、BrU摂取量の測定によりAMAが皮質ニューロン及び小脳ニューロンにおいて転写を抑制することを確認した。次に、AMAで処理したニューロンおよびヒーラ(Hela)細胞の生存率を算出し、AMAが進行性の細胞死を誘発することを発見した。その傾向は特に初代培養ニューロンにおいて顕著であり、細胞の半減期は5日以上であったが、AMA処理を行わないニューロンよりは明らかに早い細胞死であった。また、AMAの濃度依存性も示していた。この神経細胞死の進行は、小脳ニューロンの低カリウム誘発性アポトーシスよりもはるかに遅いものである。

【0011】

ヒーラ(Hela)細胞の最初の形態変化は、AMAを加えた後6~12時間で始まり、核近傍に細胞質の液胞が見られるようになった。類似の液胞は、ごく低い割合だがAMA処理後2日間経過した皮質ニューロンにおいても観察された。これらの液胞は、細胞小器官に特異的な抗体を用いた免疫組織化学的な分析から、ミトコンドリア、ゴルジ体、リソソーム、エンドソームに由来するものではない。また、ファゴソームのマーカータンパク質であるEGFP-LC3がその液胞に局在しなかったことから、オートファゴソームでもない。液胞は、強化シアン蛍光タンパク質の5'末端と3'末端にER(細胞小器官)を標的とするシークエンスとERを検索するKDELシークエンスをそれぞれ有するECFP-ERによって、膨張した小胞体であることが明らかになった。これはAMAがERにストレスを与えることを示唆している。

【0012】

また、皮質ニューロンとヒーラ(Hela)細胞の電子顕微鏡による観察によれば、染色質凝集、ミトコンドリアの拡大、細胞質の膨張等のアポトーシスやネクローシスの特徴は見られなかった。細胞系と1次ニューロンのゲノムDNA分析でも、AMA処理によってDNAラダーの形成は見られなかった。これらの実験結果から、AMAがアポトーシス、ネクローシス、またはオートファジーとは全く別の形態の、緩徐な神経細胞死を引き起こすことが明

10

20

30

40

50

らかになった。本発明者はこの新しいタイプの神経細胞死を「オメガプロセス(OP)」と名づけた。

【0013】

次に、OP(オメガプロセス)の分子機構を理解するため、我々はマイクロアレイ分析を行った。AMAにより誘発された皮質ニューロン及び小脳ニューロンの細胞死と、小脳ニューロンの低カリウム誘発性アポトーシスとの遺伝子発現を比較した。実験は2回ずつ行い、その結果、アポトーシス及びOPの両方において発現が変化する8個の遺伝子と、OPにおいて特異的に発現が変化する11個の遺伝子を見出した。後者は、p73が仲介するアポトーシスにおける中心的存在として知られる転写活性化因子(コアクチベーター)のYAPを含んでいた。ノーザンブロット法により、AMAが転写段階においてYAPの発現をダウンレギュレートすることを確認した。

10

【0014】

さらに、皮質ニューロン及び小脳ニューロンからのRNAのPCRクローニングによって、YAPの新規アイソフォームを発見した。この新規アイソフォームは13nt、25nt、及び61ntの塩基が挿入されている。RT-PCRによって皮質ニューロンからのcDNAを増幅し、サブクローニングしてpBluescriptベクターに導入し、形質転換したE.coli細胞を細菌皿上に広げた。細菌皿から抽出された14コロニーの中で、13nt、25nt、61nt挿入物はそれぞれ10、1、3個であった。挿入物のシーケンスはゲノムシーケンスと一致し、イントロンの連結部位のシーケンスも厳密にその規則に従っている。それら3種類のアイソフォームは、塩基の挿入によりリーディングフレームシフトが起こっており、結果的にYAPが本来有している転写活性化ドメインが欠損している。

20

【0015】

次に、RT-PCRによりどの組織がYAPの新規アイソフォームを発現するのか調べた。興味深いことに、13及び61塩基が挿入されたアイソフォーム(ins13及びins61)は、比較的ニューロンにおいて特異的に発現した。多数のグリア細胞と神経細胞以外の他の細胞を含む脳組織では、ins13のかすかなバンドが見られるのみであった。ins61は皮質ニューロンに対して非常に特異的であった。腎臓はins61より大きいバンドを示した。ins25は、RT-PCRにより検出されなかった。

【0016】

本発明者は、転写活性化ドメインの欠如したYAPアイソフォームが神経細胞死において逆の効果を与えるのではないかと推測した。予想通り、欠如した分子は、MCF-7細胞のシスプラチン誘発性アポトーシスにおいて優性ネガティブ効果を示した。また同時に、細胞内でcDNAからの欠如したアイソフォームの発現を確認した。さらに、新規アイソフォームがOPを抑制するか否かを調べた。AMAを加えてから4日目以降では、皮質ニューロン及び小脳ニューロンの両方において、新規アイソフォームの発現により細胞死の速度は低下していた。

30

【0017】

p73とYAPが、MCF-7細胞のシスプラチン誘発性アポトーシスのように、OPも仲介するか否かを調べるため、p73及びYAPのsiRNAを加えた。その結果、ヒーラ(HeLa)細胞においてこれらのsiRNAによってOPが抑制された。これは、OPもまたYAPからp73へのカスケードによって仲介されるという仮説を裏付けている。

40

【0018】

最後に、OPの過程におけるYAPアイソフォームの経時変化をウェスタンブロット法で観察した。興味深いことに、rYAP(=hYAP2)は実験後3日で減少し始めたにもかかわらず、塩基が挿入された新規アイソフォームの量は皮質ニューロン内において比較的長期間安定していた。YAPの新規アイソフォームの量はヒーラ(HeLa)細胞内よりも皮質ニューロン内において多かった。同様の変化は小脳ニューロン内においても観察された。これらのデータをまとめると、ニューロンに特異的なYAPの新規アイソフォームは、YAPに対する優性ネガティブ効果によって、神経細胞死を抑制することを示している。神経変性における主要な疑問の1つは、神経細胞死が遅い速度で進行することであったが、優性ネガティブな新

50

規アイソフォームがニューロンに特異的に発現するという発見は、この疑問を見事に説明している。

【0019】

以上説明のように、神経変性が極めて遅く進行することを説明する、OPという細胞死の新規なプロトタイプを見出した。また、転写活性化ドメインが欠如したYAPの新規アイソフォームが、OPを抑制するのに重要な役割を果たすことが証明された。さらに、マイクロアレイ分析により、類似の分子がアポトーシスとOPの両方で変化していることが分かった。従って、OPがいくつかの分子メカニズムをアポトーシスと一部共有している可能性がある。この2つのタイプの細胞死は、各細胞死プロセスに特異的な異なる分子によって引き起こされるが、元を正せば同じものである可能性がある。

10

したがって、上記のYAPの新規アイソフォームは、ポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬として利用可能であり、これにより神経変性疾患に対する新しい治療方法が導かれることとなる。

【0020】

上記のような、YAPの転写活性化ドメインが欠如した新規アイソフォームは、配列番号1～配列番号3のいずれかに示すアミノ酸配列から構成される。このようなタンパク質としては、配列番号1～配列番号3と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するヒト及び動物由来のタンパク質や、合成タンパク質から得ることができる。

実質的に同一とは、配列番号1～配列番号3のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ転写活性化因子YAPに対する優性ネガティブ効果を有するタンパク質をいう。また、配列番号1～配列番号3で表されるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有していることが好ましい。

20

【0021】

また、本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基、カルボキシレート、アミド又はエステルのものであっても良く、N末端のアミノ酸残基のアミノ基がホルミル基、アセチル基等の保護基で保護されていても良い。さらに、糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質等の複合タンパク質や、生理学的に許容される酸もしくは塩基との塩であっても良い。

【0022】

本発明のタンパク質は、ヒトや動物の細胞又は組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することができる。また、タンパク質をコードする遺伝子を含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、公知のペプチド合成法に準じて製造しても良い。合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法を挙げることができる。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸を縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のタンパク質を合成することができる。

30

【0023】

形質転換体から製造する場合、その方法は一般的な方法を用いて行うことができる。すなわち、目的のタンパク質をコードする遺伝子をベクターにライゲーションし、得られた発現ベクターで宿主生物を形質転換し、形質転換体を得る。その形質転換体を所定の条件下で培養し、目的のタンパク質を回収することによって行うことができる。

40

【0024】

本発明のタンパク質(YAPの新規アイソフォーム)をコードする遺伝子としては、所定の塩基配列を含有するものであれば適用可能である。具体的には、ゲノムDNA、細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれも用いることができる。

【0025】

ベクターへの遺伝子の挿入は、例えば、精製された遺伝子の塩基配列を適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法を用いることができる。また、発現ベクターには本発明に係る遺

50

伝子のほか、プロモーター、ターミネーター、リボソーム結合配列等を組み込んで良い。

【0026】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージ等のバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどを用いることができる。

【0027】

上記の発現ベクターで宿主生物を形質転換すれば、目的の形質転換体を得られる。宿主生物としては、本発明の遺伝子を発現できるものであれば、特に制限されるものではなく、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞等を用いることができる。形質転換法としては、既に公知である塩化カルシウム法、エレクトロポレーション等の手段を採用することができるが、これらの方法に限定されない。

10

【0028】

そして、この形質転換体を培養することにより、本発明のタンパク質を生成することができる。タンパク質を回収するに際しては、必要に応じて細胞を破碎し、遠心分離などにより細胞を除去した後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独または適宜組み合わせることで目的のタンパク質を単離精製することができる。

20

【0029】

本発明のタンパク質 (YAPの新規アイソフォーム) をポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬として用いる場合、その投与経路は、主に、静脈内投与などの非経口投与により行なわれる。注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物等の、薬理的に許容され得る担体を適宜用いて薬剤を調製することができる。なお、生体 (*in vivo*) への投与方法 (*drug delivery*) については、血液脳関門を通過できるか否かが問題となる可能性がある。もしその通過性に問題があるときは、HIVのTATアミノ酸配列を付加することにより血液脳関門を通過する方法等を適宜採用することができる。

30

【0030】

新規アイソフォームをコードする遺伝子を予防・治療薬に用いる場合は、投与後、目的細胞において新規アイソフォームが発現されるように、当該遺伝子を発現ベクターに組み込むとよい。発現したタンパク質が神経細胞に導入できるようにTAT配列を付加しても良い。また、遺伝子を組み込んだベクターを、適当な外被タンパク質やリボソーム、ウイルス粒子などに内包させても良い。これにより、目的細胞または目的組織に特異的に遺伝子を送り込み、YAPの新規アイソフォームを発現させることが可能である。

【0031】

さらに、YAPの新規アイソフォームを介する細胞内シグナル伝達を利用した神経変性疾患の予防・治療薬も考えられる。例えば、Aktは、プロテインキナーゼB (PKB) と呼ばれるセリン・スレオニンキナーゼであるが、細胞内シグナル伝達の過程でYAPをリン酸化して修飾する。したがって、YAPをリン酸化して14-3-3タンパク質との結合部位を作り、脱リン酸化酵素を阻害してYAPの分解を抑制することによって、神経細胞死の抑制効果をより高めることができる。あるいはYAPを活性化するc-AbiやATMを阻害する薬剤、または、YAPと結合して作用するp73やp53を阻害する薬剤を神経変性疾患の予防・治療薬として用いることも考えられる。

40

【実施例】

【0032】

以下、本発明における実験方法について詳述する。
(神経細胞の一次培養)

50

E17 Wistarラット胎児胚より分離した大脳皮質組織と、P7 Wistarラット新生児から分離した小脳組織を剃刀で細かくし、5分毎にやさしく振り混ぜながら37℃で20分間、0.25%トリプシン (Gibco) を含むリン酸緩衝液 (以下PBS; pH7.5) で処理した。続いて、50%仔ウシ血清 (以下FBS) を含むDMEMで反応を止めた後、終濃度100 µg/mlとなるようにDNase I (Boehringer Mannheim) を加え、ブルーチップを用いたピペティングにより、やさしく組織を分離した。ナイロンメッシュ (FALCON、孔径70µm) を通して細胞を遠心分離し、20mMグルコース、16mM炭酸水素ナトリウム、4mMグルタミン、25 µg/mlゲンタマイシン、10%FBSを加えたDMEMで再懸濁した後、ポリリジン (Sigma) をコートした24ウェルプレート (Corning) に各ウェル 3×10^5 個となるように培養した。12時間後、グリア細胞の増殖を防ぐため終濃度4Mとなるように培養液中にシトシンアラビノシドを加えた。そして、OPを誘導するため、 α -アマニチン (Sigma) を濃度依存性の実験以外では終濃度10又は25 µg/mlとなるように培養液に加え、濃度依存性の実験では終濃度が10から250 µg/mlとなるように加えた。

【0033】

(細胞死アッセイ)

細胞を0.4%トリパンブルー溶液 (Invitrogen) で5分間処理した。そして、各実験において、各3ディッシュから100倍の拡大率で10~20箇所の視野をランダムに選択し、その中で少なくとも2000個、青く染まった細胞 (死んでいる細胞) と染まっていない細胞 (生きている細胞) を数えた。

【0034】

(電子顕微鏡)

細胞をPBSで3回洗った後、2.5%グルタルアルデヒド/0.1M PBで固定し、さらに1% OsO₄/0.1M PBで2時間固定した。固定された細胞をエタノール勾配を用いて脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。そして、その超薄切片をウラニル酢酸とクエン酸鉛で染色し、日立H-7000電子顕微鏡で観察した。

【0035】

(アマニチンにより誘発された液胞の同定)

HeLa細胞を α -アマニチン (Sigma) で6時間処理した後、PBSで洗い、室温において4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した。続いて、細胞を、室温において次に示す一次抗体で1時間反応させた: マウス抗CC01モノクローナル抗体 (1:1000希釈; Molecular Probes)、マウス抗EEA1モノクローナル抗体 (1:100希釈; Transduction Lab.)、ウサギ抗カルネキシンポリクローナル抗体 (1:100希釈; Stressgen)、マウス抗ゴルジ58kモノクローナル抗体 (1:100希釈; Sigma)、抗CD63 (1:100希釈; Cymbus Biotechnology Ltd.)。そして、Alexa fluor 488 (1:1000希釈; Molecular Probes) を二次抗体として室温で30分間反応させることにより免疫染色で検出できるように視覚化した。HeLa細胞には、Superfect (Qiagen) を製品マニュアルに従って使い、pEGFP-LC3又はpEGFP-ER (BD Biosciences) を遺伝子導入した。

【0036】

(マイクロアレイ分析のためのRNAプローブ)

細胞をPBSで2回洗った後、培養皿の中でTRIZOL試薬 (INVITROGEN) 処理を行い、製品マニュアルに従って全RNAを抽出した。

Agilent Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent technologies: G2554A) を製品マニュアルに従って使い、RNAの標識、増幅を行った。初めに、T7プロモーター配列を含むオリゴdTプライマーとランダムヘキサマー (40、4時間) を用いてMMLV逆転写酵素により2 µgの全RNAからT7プロモーターを含んだ2本鎖cDNAを合成した。これらのcDNAを鋳型として、Cy3またはCy5標識したCTPを用い、T7 RNAポリメラーゼによりcRNAを合成した。AMA処理した皮質ニューロン、AMA処理した小脳ニューロン、また低カリウムで処理をした小脳ニューロンのそれぞれから抽出し、合成したcRNAをCy3またはCy5標識した。合成されたcRNAをリチウムクロライドで沈殿させ、エタノールで洗い、ヌクレアーゼのない水で溶解した。cRNAの質を調べるためにOD₂₆₀、OD₂₈₀、A₅₅₂ (Cy3に対し)、A₆₅₀ (Cy5に対

10

20

30

40

50

し)を測定した。そして、cRNAの OD_{260}/OD_{280} と増幅率、色素含有率[pmol/ μ g RNA]を算出した。我々のサンプルはこれらの基準において高い質を示した(OD_{260}/OD_{280} :2.0<、増幅率:400<、Cy3含有:15< [pmol/ μ g RNA]、Cy5含有:12< [pmol/ μ g RNA])。

【0037】

(マイクロアレイ分析)

ハイブリダイゼーション方法は、in situハイブリダイゼーションキットプラス (Agilent technologies: 5184-3568) を製品マニュアルに従って用いた。初めに、Cy3とCy5標識されたcRNA (各1 μ g) を混ぜ合わせ、60 $^{\circ}$ で30分間、フラグメンターションバッファーで処理した。そして、60塩基のマウスcDNAのオリゴヌクレオチドを20,371含むMouse Development Oligo Microarray (Agilent technologies: G4120A) と断片化したcRNAを60 $^{\circ}$ で17時間反応させた。反応後のマイクロアレイを2回洗浄し、窒素ガス(99.999%)をフィルター付きの空気銃(Nihon mycrolis KK)を用いて吹きかけて乾燥した。

蛍光シグナルはマイクロアレイスキャナーであるCRBIO 11e (Hitachi software engineering Co., Ltd.) で検出した。データは解析ソフトであるDNASIS array (Hitachi software engineering Co., Ltd.) を用いて解析した。コントロールスポットや不自然なシグナルによる強い蛍光を持つスポットはデータから除いた。その後、それぞれのスポットのシグナル強度は全てのシグナル強度を標準化した。標準化したシグナル強度を散布図上でCy3の蛍光をY軸、Cy5の蛍光をX軸にプロットした。Cy5に対するCy3の蛍光の割合を計算し、Cy3/Cy5が2.0以上、0.5以下と突出した遺伝子を表にした。

【0038】

(PCRクローニング)

YAPのRT-PCRクローニングは、RNA LA PCR Kit (AMV) (Takara) により、F:5'-GGAATTCTATGGAGCCCGCGCAA-3'、R:5'-ACGCGTCGACCTATAACCACGTGAG-3'の二つのプライマーを用いて、ラット皮質ニューロンの全RNA1 μ gから逆転写によって得たcDNAより行った。PCRによる増幅は35サイクル(94 $^{\circ}$ で30秒、52 $^{\circ}$ で30秒、72 $^{\circ}$ で90秒)を行った。PCR産物のcDNAをEcoRIとSalIを用いてpBluescriptII SK+に挿入した。塩基配列はM13と合成されたcDNAに含まれる配列を用いたプライマーにより、ABI PRISMTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit ver.3.1 (Applied Biosystems) とABI PRISMTM 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いて決定した。YAPの13nt、25nt、61ntの挿入部位を含むpBluescriptをpBSins13、pBSins25、pBSins61と名付けた。上記のYAPの挿入部位をpCl-neo (Promega) に挿入し、それらをpClins13、pClins25、pClins61と名付けた。

【0039】

(ウェスタンブロット解析)

全ての細胞を培養皿の上で62.5mM トリス-HCL (pH6.8)、2% (w/v) SDS、2.5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、5% (w/v) グリセリン、0.0025% (w/v) プロモフェノールブルーで溶解した。細胞溶解液を、1レーンあたり 3.3×10^4 個のHela細胞、 1.0×10^5 個の初代培養のニューロンとなるように調整し、SDS-PAGEゲルで電気泳動した後、ポリビニリデン・ジフルオライド膜(PVDF: Fine Trap, Nihon Eido) に転写し、それぞれの一次抗体で1時間処理してから30分間ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼの標識された二次抗体で処理し、ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) で視覚化した。一次抗体、二次抗体の希釈については、ウサギ抗YAPポリクローナル抗体(H-125, Santa Cruz) は1:1000、マウス抗GAPDHモノクローナル抗体(Chemicon) は1:100000、HRP標識した抗マウスIgG (Amersham) は1:5000、HRP標識した抗ウサギIgG (Amersham) は1:3000で使用した。

【0040】

(アデノウイルスベクター)

複製能力の欠如したアデノウイルスベクターはAdenovirus Expression Vector Kit (TAKARA SHUZO CO., LTD.) を製品マニュアルに従って用いた。YAPのcDNAをpBSins13、pBSins25、pBSins61からEcoRI、SalIで切り出した。cDNAの断片の両端をBlunting high kit (Toyobo CO., LTD.) で平滑化した後、それらをpAxCawtコスミド (Takara) にSwalを用い

て挿入した。精製されたコスミドを、293個の細胞に対しリン酸カルシウム法によりアデノウイルスのDNAと共に導入し、死細胞の培養液をウイルス液として回収した。2、3回増幅を繰り返した後、このベクターのクロナリティ ($5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ PFU/ml) をエンドヌクレアーゼとPCRを用いて調べた。我々はAxCAins13、AxCAins25、AxCAins61としてアデノウイルスベクターを作製した。これらのベクターをHeLa細胞と初代培養のニューロンに感染多重度 (MOI) 100で感染に使用した。また、予備的にタンパク質の発現効率とアデノウイルスの毒性を、EGFPを組み込んだベクターと様々なMOIのモックベクターを初代培養のニューロンに感染させることにより調べた。MOI100で90%以上のニューロンがEGFPを発現していた。非感染ニューロンとモック感染ニューロンでの死細胞の割合の違いはトリパンブルーを用いて調べ、MOIが500以上でも3%程度だった。

10

【0041】

(ノザンプロットイング)

初代培養のニューロンより抽出した全RNA10 μ gをMOPS/ホルムアルデヒドゲルを用いて電気泳動した。分離されたRNAをHybond-N (Pharmacia) に転写し、UV架橋 ($120,000 \mu$ J/cm²) により固定した。61塩基挿入物の全長cDNAをpBSins61から切り出し、ゲルを用いて精製し、[³²P]dCTP (Amersham) とランダムプライマーDNA標識キット (Takara) で標識した。32Pで標識したプローブを60 でナイロン膜と反応させ、一晚浸透した。反応させた膜は50 で20分間、1 x SSC、0.1% SDSで2回洗浄し、60 で20分間、0.1x SSC、0.1% SDSで2回洗浄した。そして、膜をX線フィルムに -80 で適度な時間、感光した。

【0042】

20

(RNA干渉)

細胞に、RNAiFect (QIAGEN) を製品マニュアルに従って使い、siRNAオリゴヌクレオチドを導入した。6ウェル中で 2.5×10^4 の細胞に24時間後各ウェル0.5 μ gのsiRNAを感染させた。感染24時間後、終濃度10 μ g/mlとなるようにAMAを加えた。さらに24時間後に細胞死アッセイを行った。YAPとp73のsiRNAの配列は以前に公開されたものと同じものを用いた。

【産業上の利用可能性】

【0043】

本発明の新規タンパク質及びそれを利用したポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬は、ポリグルタミン病、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患の予防・治療等のために用いることができる。

30

【配列表】

[0005103615000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 25/16 (2006.01) A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28

(56)参考文献 特表2 0 0 2 - 5 4 1 0 6 5 (J P , A)
Oncogene , 2 0 0 2 年 , Vol. 21 , pp.4879-4884
J. Biol. Chem. , 2 0 0 3 年 , Vol. 278, No. 35 , pp.33334-33341
J. Biol. Chem. , 1 9 9 5 年 , Vol. 270, No. 24 , pp.14733-14741

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/00-15/90
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
UniProt/GeneSeq