

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5146944号
(P5146944)

(45) 発行日 平成25年2月20日 (2013. 2. 20)

(24) 登録日 平成24年12月7日 (2012.12.7)

(51) Int. Cl.	F 1		
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	Z N A	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	

請求項の数 5 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2007-73396 (P2007-73396)	(73) 特許権者	503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22) 出願日	平成19年3月20日 (2007. 3. 20)		
(65) 公開番号	特開2007-284433 (P2007-284433A)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(43) 公開日	平成19年11月1日 (2007. 11. 1)		
審査請求日	平成22年3月23日 (2010. 3. 23)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願2006-77607 (P2006-77607)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成18年3月20日 (2006. 3. 20)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	御子柴 克彦 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人 理化学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I P 3 受容体結合タンパク質による細胞内標的分子の制御

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I P₃ 受容体結合タンパク質 (I R B I T)、または I R B I T をコードする D N A を発現可能に含むベクター、を含む、哺乳動物細胞内でのタンパク質合成を抑制するための組成物であって、前記タンパク質合成が、切断ノポリアデニレーション特異性因子 (C P S F) による細胞質の m R N A ポリアデニレーションが関与するものである、組成物。

【請求項 2】

前記 I R B I T が、ヒトまたはマウス由来のものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 I R B I T が、配列番号 1 または配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、あるいは該アミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつ I R B I T と同等の生物学的活性を有するタンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記組成物が、i n v i t r o で使用される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 I R B I T が C P S F に結合して C P S F の機能を阻害し、それによって前記タンパク質合成が抑制される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

10

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物細胞における生物学的機能を制御するための組成物および方法に関する。さらに具体的には、本発明は、 IP_3 受容体結合タンパク質 (IRBIT) およびその細胞内標的分子が関与する該生物学的機能を制御するための組成物および方法に関する。

【0002】

本発明はまた、前記生物学的機能の制御を利用する物質のスクリーニング方法を提供する。

【背景技術】

10

【0003】

細胞膜上の受容体の活性化に伴いホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) が加水分解されると、細胞内セカンドメッセンジャーであるイノシトール1,4,5-三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)) が生成する。 IP_3 は IP_3 受容体 (IP_3R) に結合することにより、細胞内カルシウム貯蔵オルガネラ (主に小胞体) からの Ca^{2+} 放出を誘導する。この IP_3/Ca^{2+} シグナル経路において、 IP_3 受容体は、 IP_3 のシグナルを Ca^{2+} のシグナルへ変換する役割を担っている。

【0004】

20

IP_3 受容体は、4量体の細胞内 IP_3 誘導性 Ca^{2+} 放出チャネル (IP_3 -gated Ca^{2+} release channel) である。哺乳動物では、3種の異なる IP_3 受容体が存在する。 IP_3 受容体タイプ1 (IP_3R1) は、中枢神経系、特に小脳において高発現している。マウス IP_3R1 は、2749アミノ酸からなり、3つの機能的に異なる領域に分かれている。すなわち、N末端近傍に IP_3 結合ドメイン、C末端近傍に6回膜貫通領域を有するチャネル形成ドメイン、およびこれら2つの領域の間に制御領域が存在する。 IP_3 結合ドメインの欠失突然変異体解析より、 IP_3 受容体のアミノ酸226~578残基が特異的かつ高親和性のリガンド結合に必要な最小領域であることが示され、 IP_3 結合コアと呼ばれている。

【0005】

30

IP_3 受容体の活性化による細胞質 Ca^{2+} 濃度の増加によって、多種多様な下流標的分子の活性が制御される。これら下流標的分子は、受精、発生、増殖、分泌、シナプス可塑性など多岐に渡る細胞応答において重要な役割を担っている。

【0006】

本発明者らは、先に、新規の IP_3 受容体結合タンパク質を見出し、IRBIT (IP_3R -binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) と命名した (特許文献1)。 IP_3 受容体は、ヒト、マウスなどの哺乳動物の例えば脳、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、胸腺などの種々の組織や細胞に広く分布することから、IRBITもそのような組織や細胞に存在すると推定される。ヒトおよびマウスIRBITのアミノ酸および塩基配列は、本発明者らによって決定された (非特許文献1、特許文献1)。これらのIRBITは530アミノ酸からなり、ヒトおよびマウス間の同一性は100%である。 IP_3 受容体との結合領域は、IRBITのN末端領域 (ヒトおよびマウスにおいて、アミノ酸1~104) に存在する。

40

【0007】

IRBITは、(1) 中性タンパク質である (推定pI値: 6.48) が、N末端領域は比較的酸性である (推定pI値: 4.98)、(2) N末端領域に複数のリン酸化部位が集中的に局在しており、リン酸化が IP_3R1 との相互作用に必要であると推測される、(3) IP_3R1 の IP_3 との結合に必須である508番目のリジン残基がIRBITとの相互作用においても必須である、(4) IP_3 により IP_3R1 との相互作用から解

50

離する、および(5)高塩濃度により、 IP_3R1 との相互作用から解離し、かつ粗マイクロソーム画分から抽出されることから、 IP_3R1 との相互作用は静電氣的結合によると推測される、などの特徴を有する(特許文献1)。

【0008】

IRBITは、 IP_3 受容体の IP_3 結合領域に結合し、*in vitro*で IP_3 により IP_3 受容体から解離するという性質をもつ。このため、IRBITは、 IP_3 受容体の IP_3 結合を抑制することにより、 IP_3 受容体の活性を抑制する機能をもつことも明らかになっている(特許文献1)。

【0009】

本発明者らは、今回、以下に説明するように、IRBITの標的分子を明らかにし、さらにIRBITが三次メッセンジャーとして重要な生物学的機能をもつことを明らかにした。

10

【0010】

【特許文献1】特開2004-129612

【非特許文献1】H. Andoら, *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 10602-10612

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、IRBITとその分子標的との相互作用を利用して細胞内の生物学的機能の制御を可能にする組成物および方法を提供することである。

20

【0012】

本発明の別の目的は、細胞内においてIRBITとその分子標的との間の結合を抑制または亢進することによって、前記生物学的機能の制御を可能にする物質のスクリーニング方法を提供することである。

【0013】

本発明者らは、今回、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、IRBITの標的が、タンパク質合成を制御する分子、イノシトールリン脂質を制御する分子、および細胞内のpHを制御する分子であることを見出した。また、IRBITが、細胞内代謝を制御する重要な分子の1つとして、今回見出された3種類の標的分子と結合して該標的分子の働きを制御する三次メッセンジャーとしての役割を有することを証明している。

30

【0014】

発明の概要

したがって、本発明は、要約すると、以下の特徴を有する。

本発明は、第1の態様において、 IP_3 受容体結合タンパク質(IRBIT)、IRBITの発現/翻訳を制御する核酸、またはIRBITに対する抗体を含む組成物であって、

- (1)タンパク質合成、
- (2)イノシトールリン脂質代謝、および
- (3)細胞内pH、

40

からなる群から選択される少なくとも1つの細胞内生物学的機能の制御のための上記組成物を提供する。

【0015】

一の実施形態において、前記タンパク質合成が、切断/ポリアデニレーション特異性因子(CPSF)による細胞質のmRNAポリアデニレーションが関与するものである。

【0016】

別の実施形態において、前記イノシトールリン脂質代謝が、細胞内でのPIP₂合成酵素(PIPKII)が関与するものである。

【0017】

別の実施形態において、前記細胞内pHが、細胞内でのp型Na/HCO₃共トランス

50

ポーター 1 (p N B C 1) が関与するものである。

【 0 0 1 8 】

別の実施形態において、前記制御が、抑制または亢進である。

別の実施形態において、前記 I R B I T が、ヒトまたはマウス由来のものである。

【 0 0 1 9 】

別の実施形態において、前記 I R B I T が、配列番号 1 または配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、あるいは該アミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつ I R B I T と同等の生物学的活性を有するタンパク質である。

【 0 0 2 0 】

別の実施形態において、前記組成物が、*in vivo*、*in vitro* または *ex vivo* のいずれかで使用されるものである。 10

別の実施形態において、前記組成物が、疾患の治療用である。

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、第 2 の態様において、*in vitro* または *ex vivo* での細胞内のタンパク質合成の制御における I R B I T の使用方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

その実施形態において、前記 I R B I T が C P S F に結合し C P S F の機能を制御する。

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、第 3 の態様において、*in vitro* または *ex vivo* での細胞内のイノシトールリン脂質代謝の制御における I R B I T の使用方法を提供する。 20

その実施形態において、前記 I R B I T が P I P K I I 活性を抑制する。

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、第 4 の態様において、*in vitro* または *ex vivo* での細胞内 pH の制御における I R B I T の使用方法を提供する。

【 0 0 2 5 】

その一の実施形態において、前記 I R B I T が p N B C 1 を活性化する。

別の実施形態において、前記 p N B C 1 の活性化が前記 I R B I T のリン酸化を必要とする。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、第 5 の態様において、候補物質の存在下で、I R B I T と C P S F、P I P K I I または p N B C 1 との結合を測定し、該結合を抑制または亢進する物質を同定することを含む、物質のスクリーニング方法を提供する。 30

【 0 0 2 7 】

その実施形態において、前記物質が治療用または診断用である。

別の実施形態において、前記結合が哺乳動物細胞内で行われる。

【 0 0 2 8 】

さらに別の実施形態において、前記物質が、細胞内のタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝および細胞内 pH からなる群から選択される少なくとも 1 つの細胞内生物学的機能を制御するものである。 40

【 0 0 2 9 】

定義

本明細書中で使用する「I R B I T」なる用語は、哺乳動物由来の I P ₃ 受容体結合タンパク質であり、該受容体の I P ₃ 結合部位に結合しており、I P ₃ の該受容体への結合とともに細胞質に放出されるタンパク質である。本発明では、I R B I T は、C P S F (c l e a v a g e / p o l y a d e n y l a t i o n s p e c i f i c i t y f a c t o r)、P I P K I I (p h o s p h a t i d y l i n o s i t o l - 5 - p h o s p h a t e 4 - k i n a s e)、または p N B C 1 (p a n c r e a s t y p e N a / H C O ₃ c o t r a n s p o r t e r 1) と結合するが、これらの I R B I T 標的タンパク質は I R B I T との結合を介してそれぞれタンパク質合成、イノシトールリン脂 50

質代謝、細胞内 pH の維持に關与する重要な生物学的機能を細胞内で果たしている。したがって、IRBIT は、これらの生物学的機能の制御を担っている。

【0030】

本明細書で使用する「タンパク質合成」なる用語は、細胞内での遺伝子の転写と翻訳の一連の過程をいい、本発明では、細胞質での mRNA ポリアデニレーションの制御が關与する。また、イノシトールリン脂質代謝は、IP₃ を含むリン脂質の代謝を指す。

【0031】

本明細書で使用する「抑制」なる用語は、上記生物学的機能の減少、低下または阻害をいう。

【0032】

本明細書で使用する「亢進」なる用語は、上記生物学的機能の増加、上昇または増進をいう。

【0033】

本明細書で使用する「ex vivo」なる用語は、一旦生体外に取り出された細胞や組織を本発明の組成物で処理した後、生体内に戻すことをいう。

【0034】

本明細書で使用する「患者」なる用語は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、家畜動物（例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）などの哺乳動物、好ましくはヒトを指す。

【発明の効果】

【0035】

本発明の組成物および方法は、IRBIT が、哺乳動物細胞内で CPSF、PIPKI I または pNBC1 との結合を介してそれぞれ、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝、または細胞内 pH の維持に關与しているため、このような生物学的機能を制御する IRBIT、IRBIT の発現 / 翻訳を制御する核酸、または IRBIT に対する抗体は、該機能の異常に伴う疾患の治療に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

1. 組成物

本発明は、第1の態様により、IRBIT、IRBIT の発現 / 翻訳を制御する核酸、または IRBIT に対する抗体を含む組成物を提供する。本発明の組成物は、(1) タンパク質合成、(2) イノシトールリン脂質代謝、および (3) 細胞内 pH からなる群から選択される少なくとも1つの細胞内生物学的機能の制御のために使用される。

以下に、上記3つの生物学的機能の制御について説明する。

【0037】

タンパク質合成の制御

本発明において、前記タンパク質合成の制御は、細胞内での IRBIT と CPSF との結合を介する mRNA ポリアデニレーションの制御である。

【0038】

CPSF は、CPSF160、CPSF100、CPSF73 および CPSF30 の4つのサブユニットからなる複合タンパク質である。本発明者らは、今回、COS 細胞での共発現と免疫沈降による共沈試験から、IRBIT が CPSF、特に CPSF160 に結合することを見出した (図1)。

【0039】

CPSF は、核内での mRNA のポリアデニレーション反応に必須の分子であるが、細胞質でポリ(A)の長さを伸長することによるタンパク質合成を調節する働きを有すること、また、CPSF160 の mRNA 結合部位は、CPSF がポリ(A)を付加する mRNA を認識する際に必須の領域であること、などが知られている (C. Barnard Daron ら, Cell 2004, 119: 641-651、および E. Klan

10

20

30

40

50

nら, “Synaptic Plasticity and Translation Initiation”, Learning & Memory 2004, 11:365-372, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。具体的には、E. Klannら(上記)の「細胞質ポリアデニレーションとCPEB」(367~368頁)の項には、ポリアデニレーションは、mRNAの3'非翻訳領域中の2つの配列、すなわち細胞質ポリアデニル化要素(CPE)およびAAUAAA、によって調節されており、ポリアデニレーションの重要な調節タンパク質であるCPE結合タンパク質(CPEB)が、特定のプロテインキナーゼ(Aurora)によってリン酸化されるが、該キナーゼが、CPEBを誘導して該AAUAAA配列上のCPSFとCPEBが相互作用することによって、ポリ(A)ポリメラーゼ(PAP)を救済しmRNAのポリ(A)尾部を伸長させることが記載されている。

10

【0040】

上記の知見を考慮すると、IRBITがCPSF160のmRNA結合部位に結合することによって、CPSFの機能が制御されると考えられる(図2)。

【0041】

さらにまた、本発明者らは今回、IRBITが、PAP及びFip1(CPSFのサブユニット)の存在下でのポリアデニレーション活性(I. Kaufmannら, EMBO J. (2004) 23:616-626)を抑制させる働きがあるという知見を得た。この知見から、IRBITを抑制することによってタンパク質合成を亢進することが可能になる。

20

【0042】

このように、IRBITは、CPSFとの結合を介して、mRNAポリアデニレーションの制御、したがってタンパク質合成の制御に関わっている。

【0043】

したがって、IRBIT、あるいはその生成および機能を抑制または亢進する物質は、CPSFが関連するタンパク質合成の制御を可能にする。

【0044】

イノシトールリン脂質代謝の制御

IRBITはまた、PIPKIIと結合して、該酵素の活性を抑制する(実施例2)。

PIPKIIは、ホスファチジルイノシトール5リン酸(PI(5)P)からホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸(PI(4,5)P₂)を合成する酵素であり、さらにPIP₂の加水分解によりIP₃が産生される。IP₃は、IP₃受容体のリガンドであり、該受容体に結合することによって、カルシウムイオン(Ca²⁺)とIRBITがともに細胞質内に放出されるという事実を考慮すると、IRBITは、イノシトールリン脂質代謝の制御に関わっているといえることができる(Katja A. Lamiaら, Mol. Cell Biol. 2004, 24:5080-5087)。

30

【0045】

したがって、IRBIT、あるいはその生成および機能を抑制または亢進する物質は、PIPKIIが関係するイノシトールリン脂質代謝の制御を可能にする(図3)。

【0046】

例えば、PIPKIIは、哺乳動物において、PIPKII、およびの3種類のイソフォームを含むが、IRBITはそのいずれの酵素にも結合する。特にPIPKIIについては、その酵素をノックアウトしたトランスジェニックマウスが高いインスリン感受性をもつことから、該酵素の阻害が2型糖尿病の治療に有用であることが示されている(Katja A. Lamiaら, 上記)。IRBITがPIPKII活性を抑制するという、本発明者らによる知見は、IRBITが2型糖尿病の治療に使用しうることを示している。

40

【0047】

細胞内pHの制御

IRBITはさらに、pNBC1に結合し、それを活性化する。

50

具体的には、アフリカツメガエル卵母細胞にIRBITのcRNAとNBC1のcRNAを注入することにより細胞内pH変化で検出するpNBC1の応答が、約6~7倍高い応答が得られた(図14)。この結果は、IRBITがpNBC1活性を顕著に増強することを示した。

【0048】

NBC1は、細胞膜上に存在する10回膜貫通型タンパク質であり、ナトリウムイオンと重炭酸イオンとを一定の割合で細胞膜を横切って同じ方向に運ぶ働きをする。生体内のpHは重炭酸イオンと炭酸ガスとの濃度バランスによって巧妙に調節されているので、NBC1は生体内のpHの調節に関与していると考えられる(E. GrossとI. Kurtz, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2002, 283:F876-F887)。特に、血液のpHが酸性に傾く酸血症の一種である近位尿細管型アシドーシスの原因遺伝子としてNBC1が同定されたことは、NBC1による重炭酸イオンの輸送が生体内のpHの維持に欠くことのできない役割を果たしていることを示している。

【0049】

NBC1には、これまでに腎臓型(kidney type: kNBC1)と膵臓型(pancreas type: pNBC1)の2つのスプライシング変異体が報告されており、kNBC1は主に腎臓に、pNBC1は膵臓を中心として脳神経系を含めた比較的多くの組織に、それぞれ発現している。本発明者らはIRBITがどちらのNBC1のどの部分と結合するのか明らかにするために、NBC1の細胞質領域を大腸菌に組換え型タンパク質として発現させて精製し、培養細胞に強制発現したIRBITとの結合をプルダウン(pull-down)アッセイで検討した。その結果、IRBITはpNBC1に特異的なN末側85アミノ酸と特異的かつ強力に結合することがわかった(図10)。更に特定の塩の濃度変化によってIRBITとpNBC1の結合が制御されていることもわかった。

【0050】

これらの結果は、種々の臓器におけるpNBC1によるpH調節をIRBITが細胞内の状況依存的に制御している可能性を強く示唆している。また、近位尿細管型アシドーシス患者は緑内障や白内障といった眼の疾患、低身長、精神遅滞、膵臓炎といった様々な症状を呈することから、NBC1によるpHの調節が腎臓以外の臓器でも重要な役割を果たしていると考えられる。それゆえ、IRBITは、pNBC1を介して緑内障や白内障などの眼の疾患、低身長、精神遅滞、膵臓炎などの疾患の治療法としても有用である(Seth L. Alper, *Annu. Rev. Physiol.* 2002, 64:899-923)。

【0051】

したがって、IRBIT、あるいはその生成および機能を抑制または亢進する物質は、pNBC1が関係する細胞内pHの制御を可能にする。

【0052】

IP₃受容体結合タンパク質(IRBIT)

本発明で使用するIRBITは、哺乳動物由来のものである。IRBITは、哺乳動物の脳、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、胸腺などの組織の細胞内小胞体に存在していることが知られている(特開2004-129612号公報)。好ましいIRBITの例は、ヒトIRBITおよびマウスIRBITである(特開2004-129612号公報、H. Andoら, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:10602-10612)。特にヒトIRBITが好ましい。ヒトおよびマウスIRBITのアミノ酸および塩基配列は、GenBankにそれぞれNM_006621(配列番号1、2参照)およびNM_145542(配列番号3、4参照)として登録されている。

【0053】

また、好ましいIRBITの別の例は、配列番号1または配列番号3に示されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、もっとも好ま

10

20

30

40

50

しくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつIRBITと同等の生物学的活性を有するタンパク質である。ここで、生物学的活性は、S-アデノシルホモシステインのアデノシンとホモシステインへの可逆的加水分解を触媒するS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ様活性に加えて、タンパク質合成におけるCPSFとの結合を介するmRNAポリアデニレーションの制御、PIPKIIとの結合を介するイノシトールリン脂質代謝の制御、およびpNBC1との結合を介する細胞内pHの制御を含む生物学的機能の制御に関わる活性をいう。

【0054】

同様に、好ましいIRBITをコードするDNAの例は、配列番号2または配列番号4に示される塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、もっとも好ましくは99%以上の同一性を有するDNA、あるいは、ストリンジেন্টな条件下で該配列番号2または配列番号4の塩基配列とハイブリダイズ可能なDNAである。ここで、ストリンジেন্টな条件とは、以下のものに限定されないが、約45~50で2~6xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中でのハイブリダイゼーションと、それに続く、約50~65での0.2~2xSSC/0.1~1%SDSによる洗浄からなるか、あるいは60~65で6xSSC、Denhardt溶液、0.2%SDS中でのハイブリダイゼーションののち、60~65での0.2xSSC、0.1%SDSによる洗浄からなる(例えば、F. M. Ausbelら, Short Protocols in Molecular Biology (3版) A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 1995年, John Wiley & Sons, Inc.)。

【0055】

他の哺乳動物由来のIRBITもまた、本発明において使用可能である。そのようなIRBITは、例えばラット、ハムスター、ウサギなどの実験動物のIRBIT、イヌ、ネコなどのペット動物のIRBIT、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなどの家畜動物のIRBITなどを含む。これらのIRBITの作製については、文献、データバンク等に記載のアミノ酸または塩基配列に基づいて、あるいはヒトまたはマウスIRBITの公知の配列に基づいて、プローブおよび/またはプライマーを作製し、DNAクローニング法、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの慣用の手法によって、例えば市販のまたは調製された動物組織からのライブラリーを用いて、IRBIT cDNAをクローン化および/または増幅し、さらに、得られたIRBITをコードするDNAを、適当な制御配列を有する例えば市販の発現ベクター(例えばプラスミド)に組み込み、適当な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクションし、得られた細胞を、適当な培地にて培養してIRBIT DNAを発現させ、生成したIRBITタンパク質を回収することができる。これらの一連の手法については、例えばJ. Sambrookら, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 1989年, Cold Spring Harbor Laboratory Press、F. M. Ausbelら, Short Protocols in Molecular Biology (3版) A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 1995年, John Wiley & Sons, Inc.、実験医学別冊4版松村正實ら編「新遺伝子工学ハンドブック」(2003年)羊土社、東京、日本などに記載されており、ここに記載されるような手法に従って、種々の哺乳動物由来のIRBITホモログを得ることが可能である。

【0056】

IRBIT遺伝子を含む哺乳動物組織をホモゲナイザーを用いて均質化し、約10,000rpmで遠心分離して上清を得た後、例えばグアニジン・酸性フェノール法で全RNAを回収し、定法に従いcDNAを合成し、このcDNAからIRBITをコードするDNAを得ることができる。RNAの抽出のためのキット、例えば日本ジーン社のISOG

10

20

30

40

50

EN (商標)、が市販されているので、それを利用してよい。

【0057】

IRBITをコードするDNAを検出するためのプローブのサイズは、通常30塩基以上、好ましくは50~100塩基またはそれ以上である。プローブには、通常、蛍光標識(例えばフルオレサミン、ローダミンまたはそれらの誘導体)、放射性同位元素標識(例えば³²P)などの標識を結合し、これによって目的のIRBITをコードするDNAとプローブとの結合を検出することができる。

【0058】

IRBITをコードするDNAを増幅するためのプライマーのサイズは、通常15~30塩基、好ましくは20~25塩基である。プライマーは、IRBITをコードするDNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖の3'末端側に相補的な配列を有しているべきである。しかし、増幅すべきIRBITをコードするDNAの配列が不明の場合には、公知のIRBIT配列に基づいて複数のプライマーを準備し、PCRによって鋳型DNAを増幅し、さらに、増幅された鋳型DNAに基づいて正式のプライマーを作製し、PCRによって目的の鋳型DNAを増幅することができる。

【0059】

PCRは、一般に、DNAの変性、プライマーのアニーリングおよび伸長反応を1サイクルとして約20~40サイクル行うことからなる。DNAの変性は、二本鎖DNAを一本鎖のDNAに解離するための工程であり、通常94で約15秒~1分の処理を行う。プライマーのアニーリングは、プライマーと、相補的な一本鎖鋳型DNAとを対合させる工程である。アニーリングに至適な温度や時間はプライマーの塩基配列や長さに依存するが、通常約55~60で約30秒~1分の処理を行う。伸長反応は、4種類のdNTPと耐熱性DNAポリメラーゼの存在下で鋳型DNAを伸長する工程であり、通常72で約30秒~10分の処理を行う。サイクルを開始する前に、94で約1~5分加熱し完全にDNAを変性することもできる。また、全サイクルの終了後に、72で約1~5分の加熱処理を行うこともできる。耐熱性DNAポリメラーゼは、市販されており、例えばThermusaquatics(Taq)ポリメラーゼ(TAKARA、パーキンエルマー、ファルマシアなどから販売)を使用することができる。PCRの手法については、例えば蛋白質核酸酵素「PCR法最前線 基礎技術から応用まで」第41巻第5号1996年4月増刊号、共立出版、東京、日本を参照することができる。

【0060】

発現ベクターは、原核生物または真核生物由来の細胞で使用可能な任意のベクターである。ベクターは、プロモーター、複製開始点、リボソーム結合部位、マルチクロニング部位、ターミネーターなどの制御配列を含むことができる。発現ベクターとしては、プラスミド、ウイルスなどのベクター、特に市販のベクター、例えばpGEX-4T-1(アマシャム・ファルマシア・バイオテック社)、pBluescript IISK、pHS19、pHS15、pG-1およびpXT1(ストラタジーン社)、pMALおよびpTYBシリーズ(第一化学薬品)、pQEシリーズ(キアゲン社)、pETシリーズ(ノバジェン社)、pSVK3およびpSVL SV40(ファルマシア社)、pcDNA1およびpcDM8(フナコシ)、pHB6、pVB6、pHM6、pVM6およびpXM(ロシュダイアグノスティック社)などを適宜選択して使用することができる。

【0061】

宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属、枯草菌などのバチルス属、シュードモナス属、コリネバクテリウム属などの細菌類、サッカロマイセス属、ピチア属、シゾサッカロマイセス属などの酵母類、昆虫細胞、植物細胞、CHO、COS、HEK293などの哺乳動物細胞などを挙げることができる。

【0062】

IRBITをコードするDNAを宿主細胞に導入する方法には、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルス感染による方法などが含まれる(実験医学別冊4版松村正實ら編「新遺伝子工

10

20

30

40

50

学ハンドブック」(2003年)羊土社、東京、日本)。

【0063】

より具体的には、マウスIRBITについて、成熟マウス小脳からのIRBITの精製、cDNAクローニングおよび発現が開発2004-129612号公報に記載されており、それらの開示を参照可能である。

【0064】

IRBITの生物学的活性は、IRBITが、S-アデノシルホモシステインのアデノシンとホモシステインへの可逆的加水分解を触媒するS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼと同源性を有するため、類似のアッセイ法に基づいて測定することができる。このアッセイ法は、例えばC.-S. Yuanら(J. Biol. Chem. 1996, 271:28009-28016)の方法に準ずることができる。簡単に説明すると、IRBIT(約3 μ g)およびウサギS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(シグマ社)(約2.5 μ g)を用いて上記の加水分解反応を行ない、その生成産物(ホモシステイン)を5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(シグマ社)と反応させて得られる発色を、412nmで分光光度計にて測定し吸光度を求めることを含む。

【0065】

IRBITの発現/翻訳を制御する核酸

本発明において、IRBITの発現/翻訳を制御する核酸には、IRBITをコードするDNA、IRBITをコードするmRNAのアンチセンスRNAもしくはその断片、IRBITをコードするmRNAの切断を可能にするリボザイム、siRNA(small interfering RNA)などの機能的RNA、あるいは、それらのDNAもしくはRNA(実際的には、RNAをコードするDNA)を含むベクターDNAが包含される。

【0066】

IRBITをコードするDNAは、ヒト、マウスなどの哺乳動物由来のIRBITをコードするDNAであり、上記の「IP₃受容体結合タンパク質(IRBIT)」の項で説明したような手法で作製することができる。好ましいIRBITをコードするDNAは、配列番号1または配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAであり、さらに好ましいDNAは、配列番号2または配列番号4に示される塩基配列からなるヒトまたはマウスIRBITをコードするDNAである。

【0067】

IRBITをコードするDNAは、発現ベクター(例えばプラスミドまたはウイルスベクター)に挿入されて、細胞内でのIRBITの発現のために使用可能である。

【0068】

IRBITをコードするDNAを発現するためのプラスミドベクターは、IRBITをコードするDNA配列及びプロモーターの他に、薬剤耐性遺伝子(例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子など)、ターミネーター、マルチプルクローニングサイト、複製開始点、リボソーム結合部位などの制御配列を含むことができる。

【0069】

また、IRBITをコードするDNAを発現するためのウイルスベクターは、たとえばアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター(白血病ウイルスベクターなど)、ヘルペスウイルスベクターなどを使用することができる。ウイルスベクターは、ヒトに使用する際に疾病を引き起こさないように例えば自己複製能を欠損したタイプのものが好ましい。たとえばアデノウイルスベクターの場合には、E1遺伝子及びE3遺伝子を欠失した自己複製能欠損型アデノウイルスベクター(例えばInvitrogen社のpAdeno-X)を使用することができる。ウイルスベクターの構築は、文献記載の方法を利用することができる(米国特許第5252479号、国際公開WO94/13788など)。

【0070】

10

20

30

40

50

プロモーターは、哺乳動物細胞内で外来DNAの発現が可能なプロモーターを使用することができる。プロモーターの例は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SV40プロモーター、EFプロモーターなどを含む。

【0071】

プラスミドベクターは、例えばリポフェクタミン、リポフェクチン、セルフェクチン、正電荷コレステロールなどの正電荷リポソームと複合体を形成しカプセル化された状態で患者の体内に導入することができる(例えば、中西守ら、蛋白質核酸酵素, 44巻11号, 48~54頁, 1999年, 共立出版、東京、日本; *Clinical Cancer research* 59:4325-4333, 1999; Wuら, *J. Biol. Chem.* 1987, 262:4429)。また、ウイルスベクターは患部に導入し細胞感染させることによって細胞内に遺伝子導入することができる(L. Zenderら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003), 100:77797-7802; H. Xiaら, *Nature Biotech.* (2002), 20:1006-1010; X. F. Qinら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003), 100:183-188; G. M. Bartonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002), 99:14943-14945; J. D. Hommelら, *Nature Med.* (2003), 9:1539-1544)。特にアデノウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルスベクターは種々の細胞種に非常に高い効率で遺伝子導入可能であることが確認されている。このベクターはまた、ゲノム中に組み込まれることがないため、その効果は一過性であり安全性も他のウイルスベクターと比べて高いと考えられる。

10

20

【0072】

さらに、IRBITをコードするmRNAのアンチセンスRNAもしくはその断片は、IRBIT遺伝子のIRBITタンパク質への翻訳を阻害することが可能である。

【0073】

前記断片は、IRBIT遺伝子又はmRNAの配列において連続する約30塩基以上、50塩基以上、70塩基以上、100塩基以上、150塩基以上、20塩基以上又は250塩基以上から全長以下の塩基数からなる配列を含むことができる。

【0074】

アンチセンスRNAもしくはその断片は、ハロゲン(フッ素、塩素、臭素又はヨウ素)、メチル、カルボキシメチル又はチオ基などの修飾基を含むことができる。

30

【0075】

上記アンチセンス核酸は、周知のDNA/RNA合成技術又はDNA組換え技術を用いて合成することができる。DNA組換え技術によって合成する場合、IRBITの塩基配列を含むベクターDNAを鋳型にして、増幅しようとする配列を挟み込むプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行って標的配列を増幅し、必要に応じてベクター中にクローニングして、アンチセンスDNAを生成することができる。あるいは、このようにして得られた増幅標的配列を有するDNAをベクターに挿入し、該ベクターを真核又は原核細胞に導入し、その転写系を利用してアンチセンスRNAを得ることができる。

【0076】

同様の阻害はまた、IRBITをコードするmRNAの切断を可能にするリボザイム、siRNAなどの機能的RNAによっても可能である。

40

【0077】

siRNAは、例えば配列番号2(ヒトIRBIT)または配列番号4(マウスIRBIT)の塩基配列によってコードされるmRNA配列からの連続する約18~30、好ましくは約19~25、さらに好ましくは約20~23ヌクレオチドのセンス鎖配列と、その相補的配列であるアンチセンス鎖配列とを含むことができる。ここで、センス鎖配列とは、前記mRNAの標的サイトと同一の塩基配列をいい、また、アンチセンス鎖配列とは、このセンス鎖配列に相補的な塩基配列をいう。センス鎖とアンチセンス鎖は互いに対合して二本鎖のsiRNAを形成することができる。siRNAはさらに、センス鎖および

50

アンチセンス鎖の各3'末端に1~5個の塩基からなるオーバーハング、例えばUUを含むことができる。

【0078】

siRNAのセンス鎖配列を選択するためには、例えば標的IRBIT mRNAの標的サイトの選択のための公知の知識、例えば、(a)GC含量が約30~70%、好ましくは約50%である、(b)すべてのヌクレオチドが均等であり、またGが連続していない、(c)アンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドがA、Uである、などの基準を使用することができる(D.M. Dykxhoornら, Nature Rev. Mol. Cell Biol. (2003), 77:7174-7181; A. Khvorovovaら, Cell (2003), 115:209-216)。また、RNA二次構造予測プログラムであるmfoldを用いて上記siRNAの標的サイトであるIRBIT mRNA上の候補遺伝子部位を推定することもできる(J.A. Jaegerら, Methods in Enzymology 1989, 183:281-306; D.H. Mathewsら, J. Mol. Biol. 1999, 288:911-940)。例えば、siRNAが標的とすることができる配列は、上記の知見に基づいて推定し、実際にその効果を確認することによって決定することができる。本発明で使用可能なsiRNAは、非限定的な例として以下の配列を挙げることができる。

IRBIT siRNA-1: AAUCCAGUUUGCUGAUGACA(配列番号5)

IRBIT siRNA-2: AACUCAGAAUGAAGUAGCUGC(配列番号6)

【0079】

siRNAは、周知の化学合成技術を用いて合成することができる。例えば、慣用のDNA/RNA自動合成装置を使用して化学的に合成するか、あるいは、siRNA関連の受託合成会社(例えばフナコシ株式会社(東京、日本)、Dharmacon社、Ambion社など)に合成を委託することによって入手可能である。

【0080】

siRNAを細胞または組織内に導入するときには、siRNAを直接細胞または組織内に注入するか、又はsiRNAの発現が可能なベクターを使用することが好ましい。あるいは、siRNA又はベクターを、リポソーム、例えばリポフェクタミン、リポフェクチン、セルフェクチン及びその他の正電荷リポソーム(例えば、正電荷コレステロール)、又はマイクロカプセル、と複合体形成し、これを使用することもできる(例えば、中西守ら, 蛋白質核酸酵素, 44巻11号, 48~54頁, 1999年, 共立出版、東京、日本; Clinical Cancer research 59:4325-4333, 1999; Wuら, J. Biol. Chem. 1987, 262:4429)。

【0081】

siRNAを発現するためのベクターでは、siRNAまたはその前駆体をコードするDNA配列をプロモーターの調節下に含む。

【0082】

発現ベクターの1つの例は、ヘアピン型ベクターである。このベクターは、前記センス鎖RNA配列と前記アンチセンス鎖RNA配列とが一本鎖ループ配列を介して共有結合されているヘアピン型RNAをコードするDNAを含み、ここで該DNAは、細胞内で転写により該ヘアピン型RNAを形成し、ダイサーによりプロセッシングされて前記siRNAを形成するベクターである。siRNAをコードするヘアピン型DNAの3'末端には、転写停止シグナル配列として、あるいはオーバーハングのために、1~6個、好ましくは1~5個のTからなるポリT配列が連結される。ベクターDNAから転写されたsiRNA前駆体としてのショートヘアピンRNA(shRNA)は、そのアンチセンス鎖の3'末端に2~4個のUからなるオーバーハングを有することが望ましく、オーバーハングの存在によって、センス鎖RNA及びアンチセンス鎖RNAはヌクレアーゼによる分解に対して安定性を増すことができる。ヒトには内在性のダイサーが1つ存在し、これが長鎖dsRNAや前駆体マイクロRNA(miRNA)をそれぞれsiRNAと成熟miRNAに変換する役割をもつ。プロモーターの例は、pol IIIプロモーター、例えばヒト

10

20

30

40

50

もしくはマウス由来のU6プロモーター又はH1プロモーター、pol IIプロモーター、或いはサイトメガロウイルスプロモーターである。

【0083】

発現ベクターの別の例は、タンDEM型ベクターである。このベクターは、前記 siRNA を構成するセンス鎖RNA配列をコードするDNA配列とアンチセンス鎖RNA配列をコードするDNA配列とを連続して含み、かつ各鎖の5'末端にプロモーターが、また各鎖の3'末端にポリT配列がそれぞれ連結されたDNAを含み、ここで該DNAは、細胞内で転写後に該センス鎖RNAと該アンチセンス鎖RNAとがハイブリダイズして前記 siRNA を形成するベクターである。

【0084】

タンDEM型ベクターにおけるプロモーターの例は、pol IIIプロモーター、例えばヒトもしくはマウス由来のU6プロモーター又はH1プロモーター、或いはサイトメガロウイルスプロモーターである。また、ポリT配列は、1~6個、好ましくは1~5個のTからなるポリT配列である。タンDEM型ベクターは、細胞内に導入されたのち、センス鎖とアンチセンス鎖に相当するRNAに転写され、互いにハイブリダイズして目的の siRNA を生成することができる。

【0085】

上記ヘアピン型及びタンDEM型ベクターは、プラスミドベクター又はウイルスベクターである。プラスミドベクターは、後述の実施例に記載の手法又は文献記載の方法を用いて調製してもよいし、或いは市販のベクター系、たとえば piGENETMU6系ベクター及び piGENETMH1系ベクター（タカラバイオ株式会社、京都、日本）を利用することもできる（T. R. Brummelkampら, Science (2002), 296: 550-553; N. S. Leeら, Nature Biotech. (2002), 20: 500-505; M. Miyagishiら, Nat. Biotechnol. (2002), 20: 497-500; P. J. Paddisonら, Genes & Dev. (2002), 16: 948-958; T. Tusch, Nature Biotech (2002), 20: 446-448; C. P. Paulら, Nature Biotech. (2002), 20: 505-508; 多比良和誠ら編、RNAi実験プロトコル、羊土社（東京、日本）、2003年）。

【0086】

本発明の組成物の有効成分である別の核酸は、リボザイムである。リボザイムは、触媒活性をもつRNAであり、本発明の標的IRBIT遺伝子に対応するmRNAを切断する活性を有している。この切断によって該遺伝子の発現が阻害又は抑制される。

【0087】

リボザイムの切断可能な標的配列は、一般にはNUX（N=A, G, C, U; X=A, C, U）、例えばGUCトリプレットを含む配列であることが知られている。このようなりボザイムには、ハンマーヘッド型リボザイムが含まれる。ハンマーヘッド型リボザイムは、センサー部位を構成するヌクレオチド配列、センサー部位にRNAが結合したときのみ安定にMg²⁺イオンを捕捉する空洞を形成しうる領域を含むヌクレオチド配列、及び標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的である領域を含むヌクレオチド配列を含むことができる。

【0088】

本発明のリボザイムを細胞内または患者体内に送達するために、リボザイムをリボソーム（好ましくは、正電荷リボソーム）に封入する（特開平9-216825号公報（1997年））、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込む（特表2002-542805号公報）などの方法によってドラッグデリバリー系を構築することができる。

【0089】

リボザイムは、それが発現可能なようにベクターに組み込むことができる。リボザイムを発現するためのプロモーターには、pol II又はpol IIIプロモーターが含まれる。好ましいプロモーターは、pol IIIプロモーター、例えば哺乳動物由来の

10

20

30

40

50

tRNAプロモーター、より好ましくはtRNAValプロモーターである(S. Kos ekiら, J. Virol., 73: 1868 - 1877, 1999)。

【0090】

抗体

IRBITに対する抗体又はその断片もまた、上記生物学的機能の制御のために使用できる。

【0091】

このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え型抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv、scFv、二重特異抗体、合成抗体などが含まれる。

10

【0092】

抗体のクラス、サブクラスは任意のタイプでよく、例えばIgG, IgM, IgE, IgD, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2などが含まれる。

【0093】

抗体はまた、ペグ化、アセチル化、グリコシル化、アミド化などによって誘導体化されていてもよい。

【0094】

ポリクローナル抗体の作製は、IRBITを免疫原(約1µg~100µg)として、必要に応じて Freundの完全もしくは不完全アジュバント、水酸化アルミニウム(alum)、ムラミルジペプチド、リポドAなどのアジュバントを含む油中水型乳濁液を、ウサギ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどの非ヒト動物に皮内もしくは静脈内に免疫注射し、約2~4週間後に、アジュバント非含有のIRBITを1~2回注射し、ブーストを行う。試験的に採血し、抗体価が十分に上がったことを確認したあとで、動物から採血し、遠心分離により抗血清を回収する。必要に応じて、硫酸分画、DEAEイオン交換クロマトグラフィーなどにより精製しIgGを得ることができる。

20

【0095】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの作製は、ケラーとミルシュタインの方法(Nature 1975, 256: 495 - 497)に準じて行うことができる。すなわち、ハイブリドーマは、免疫感作された動物から脾臓またはリンパ節を取り出し、それに含まれる抗体産生細胞と、マウス、ラット、モルモットなどの哺乳動物に由来のミエローマ細胞との細胞融合、HAT選択によって得ることができる。細胞融合は、例えばポリエチレングリコール(例えば分子量1500~6000)を用いて行うことができる。目的の抗体の産生は、ハイブリドーマの培養上清の免疫抗原に対する反応性を酵素免疫測定法、放射性免疫測定法、蛍光抗体法などの慣用の方法を用いて測定することができる。

30

【0096】

また、ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の作製は、ハイブリドーマを*in vitro*で培養してその培養上清から単離してもよいし、あるいはマウス、ラット、モルモットなどの腹水等で*in vivo*で培養し、腹水から単離してもよい。

40

【0097】

あるいは、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングしたのち、これをベクターに組み込み、哺乳動物細胞(例えばCHO)などに導入し、組換え型抗体を作製することもできる(P. J. Delvesら, ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997, John Wiley & Sons)。

【0098】

ヒト抗体は、例えばファージディスプレイライブラリー(phage display library)法(T. C. Thomasら, Mol. Immunol. 33: 1389 - 1401, 1996)又はヒト抗体産生動物(例えばマウス、ウシなど)を用いる

50

方法 (I. Ishidaら, Cloning Stem Cell 4:91-102, 2002) によって製造できる。

【0099】

例えば、ヒト抗体産生マウスは、ヒト人工染色体にヒト抗体産生遺伝子を含むヒト染色体断片を導入したのち、マイクロセル法を用いて例えばマウス胚性幹細胞ゲノムに人工染色体を組み込み、組換え胚性幹細胞を胚盤胞に注入し、仮親マウスの子宮に移植し、キメラマウスを出産し、雌雄のキメラマウス、またはキメラマウスと野生型マウス、の交配を通して、ヒト抗体遺伝子を含み、したがってヒト抗体の産生が可能である、ホモ接合型の子孫マウスを作出するなどの方法によって作製することができる (例えば、再表02/092812号公報、国際公開WO 98/24893、WO 96/34096など)。このヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、本発明のIRBITタンパク質を抗原として免疫したのち、脾臓を摘出し、この脾臓細胞とマウスミエローマ細胞とを融合してハイブリドーマを形成し、目的のモノクローナル抗体を選抜することができる。

10

【0100】

ファージディスプレイライブラリー法は、未処置のヒトリンパ細胞から直接手に入れた免疫グロブリン遺伝子のライブラリーから、目的の抗体をコードするDNAをスクリーニングし、このDNAと、抗体鎖との間に、ファージ粒子を用いて物理的会合を確立し、これによって、標的に親和性をもつ抗体を提示するファージを親和性スクリーニングによって富化することを含む。この方法を用いて、標的に対する結合親和性をもつ抗体を、通常の手法によって大量に合成することができる (例えば、特表2003-527832号公報)。

20

本発明の組成物は、疾患または障害の治療のために用いることができる。

【0101】

治療用組成物

本発明において、該疾患または障害とは、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝、および細胞内pHの異常によって引起されるものである。

【0102】

タンパク質合成の場合、CPSFに対するIRBITの結合に伴うタンパク質合成の制御が挙げられる。この場合、IRBITはタンパク質合成を抑制し、IRBITの働きを抑制する物質 (上記の核酸または抗体) はタンパク質合成を亢進することができる。CPSFが関与するタンパク質合成の異常には、例えば腫瘍がある。

30

【0103】

イノシトールリン脂質代謝の場合、PIPKIIの異常な活性化に伴う疾患、例えば2型糖尿病が挙げられる。IRBITはPIPKII活性を抑制する作用があるため、2型糖尿病の治療のために使用できる。

【0104】

細胞内pHの場合、細胞内のpHの維持にpNBC1が重要な働きをしているが、特にpHが酸性に傾くことによる疾患に、緑内障や白内障などの眼の疾患、低身長症、精神遅滞、膵臓炎などの疾患が含まれる。IRBITは、pNBC1と結合し、細胞内pHの正常な状態への調節を可能にする。

40

【0105】

本発明の組成物中の有効成分の含有量は、制限されないが、約1 μ g~100mgである。その含有量は、有効成分の種類に応じて変化する。

【0106】

本発明の組成物中のIRBITの用量は、1投与単位あたり約1 μ g~1mg、好ましくは約50 μ g~500 μ gであるが、この範囲に限定されない。

【0107】

本発明の組成物中の核酸の用量は、siRNA、アンチセンス核酸、又はリボザイムに換算すると、以下のものに限定されないが、1投与単位あたり、約1nM~100 μ M、好ましくは約10nM~50 μ Mである。

50

【0108】

本発明の組成物中の抗体又はその断片の用量は、以下のものに限定されないが、1投与単位あたり、約1～100mg/ml、好ましくは約5～70mg/mlである。

【0109】

しかし、上記の用量又は投与量は、患者の状態、年齢、性別、重篤度などに応じて変化するものであり、専門医の判断により用量又は投与量が決定されるべきである。

【0110】

本発明の組成物は、通常、製薬上許容可能な担体（すなわち、賦形剤又は希釈剤）、例えば滅菌された水、生理食塩水、緩衝液、非水性液体（例えば、アーモンド油、植物油、エタノールなど）などを含むことができる。該組成物にはさらに、製薬上許容可能な安定剤（例えばメチオニンなどのアミノ酸類）、保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチル、ソルビン酸）、等張化剤（例えば塩化ナトリウム）、乳化剤（例えばレシチン、アラビアガム）、懸濁化剤（例えばセルロース誘導體）などを含有させることができる。

好ましい医薬製剤は、溶液剤、懸濁液剤、乳剤などである。

【0111】

本発明の組成物の投与方法は、経口投与、非経口投与、例えば静脈内投与、局所投与などを含む。局所投与には、外科手術又は内視鏡下で患部に直接注射する方法などが含まれる。また、専門医が決定した治療計画に基づいて、一定の時間間隔、例えば1週間、2週間、3週間、1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、1年などの間隔で、患者に対して、本発明の組成物を1～数回に分けて投与することができる。

【0112】

また、患者への抗体又はその断片の送達は、単独か又は例えばリポソーム（好ましくは、正電荷リポソーム）、マイクロカプセル又はナノ粒子中に抗体又はその断片を封入した形態で、通常は適当な担体（賦形剤又は希釈剤）と組み合わせて、経口経路、非経口経路（例えば、静脈内投与又は局所投与）にて行うことができる。

【0113】

本発明の組成物は、*in vitro*、*in vivo*または*ex vivo*で使用可能である。

【0114】

*in vitro*では、治療用物質のスクリーニングのために、本発明の組成物を利用することができる（下記参照）。

【0115】

*ex vivo*では、一旦患者から生体外に取り出された細胞や組織を、本発明の有効成分で処理した後、体内に戻すことができる。これによって、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝または細胞内pHの異常が生じた細胞や組織を正常に復することが可能となる。

【0116】

2. IRBITの使用例

本発明はまた、IRBITを*in vitro*または*ex vivo*で使用する下記の方法を提供する。

【0117】

第1に、本発明は、*in vitro*または*ex vivo*での細胞内のタンパク質合成の制御におけるIRBITの使用法を提供する。

この方法は、IRBITがCPSFに結合してCPSFの機能を制御するという作用をもつことに基づく。

【0118】

第2に、本発明は、*in vitro*または*ex vivo*での細胞内のイノシトールリン脂質代謝の制御におけるIRBITの使用法を提供する。

この方法は、IRBITがPIPKII活性を抑制するという作用をもつことに基づく。

。

10

20

30

40

50

【0119】

第3に、本発明は、*in vitro*または*ex vivo*での細胞内pHの制御におけるIRBITの使用方法を提供する。

この方法は、IRBITがpNBC1を活性化するという作用をもつことに基づく。また、pNBC1の活性化には、IRBITのリン酸化が必要である。

【0120】

上記のとおりIRBITは、*in vitro*では、細胞内でのタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝または細胞内pHの制御を可能にする物質のスクリーニングのために使用できるし、また、*ex vivo*では、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝または細胞内pHの異常が生じた細胞や組織を正常な状態に戻すために使用することができる。

10

【0121】

3. スクリーニング

本発明はさらに、候補物質の存在下で、IRBITとCPSF、PIPKIIまたはpNBC1との結合を測定し、該結合を抑制または亢進する物質を同定することを含む、物質のスクリーニング方法を提供する。

【0122】

上記結合は、試験管内で、あるいは細胞（特に哺乳動物細胞）内で、候補物質の存在下でIRBITとCPSF、PIPKIIまたはpNBC1との結合を測定することができる。哺乳動物細胞には、例えばCHO、COS、HEK293、HeLa、NIH3T3などが含まれる。

20

【0123】

同定された物質は、例えば治療用または診断用として使用できる。特に、該物質は、細胞内のタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝および細胞内pHからなる群から選択される少なくとも1つの細胞内生物学的機能を制御するものである。

【0124】

上記結合を試験管内で実施するときには、例えば、適当なバッファ中に、IRBITとCPSF、PIPKIIまたはpNBC1とを存在させ、これに候補物質を加え、IRBITとCPSF、PIPKIIまたはpNBC1との結合のレベルを、SDS-PAGEおよびイムノブロット法で検出することができる。この系は、上記結合を抑制または阻害する物質の検出に有効である。IRBIT、CPSF、PIPKIIまたはpNBC1の組換えタンパク質の作製は、上記のIRBITの項で記載したと同様の手法で行うことができる。

30

【0125】

上記結合を細胞内で実施するときには、IRBITとCPSF、PIPKIIまたはpNBC1とを同時にまたは別個に発現させようように、それぞれのタンパク質をコードするDNAを同一のまたは異なるベクターに組み込み、該ベクターで哺乳動物細胞を形質転換またはトランスフェクションする。翻訳されたタンパク質は細胞内、特に細胞質に存在するように、好ましくは、ベクターDNAは分泌シグナル配列を含まないようにするのがよい。

40

【0126】

CPSF、PIPKIIまたはpNBC1のアミノ酸および塩基配列は、GenBankや文献などから入手可能であり、それぞれ例えば(AB092504)、(AF030558、AF033355)、(NM_003759、NM_018760)の登録番号が付与されている。IRBITのアミノ酸および塩基配列については、上記のとおりである。

【0127】

発現ベクターは、好ましくは哺乳動物細胞で使用可能な任意のベクターである。ベクターは、プロモーター、エンハンサー、複製開始点、リボソーム結合部位、マルチクロニング部位、ターミネーター、ポリAシグナルなどの制御配列を含むことができる。発現ベ

50

クターとしては、pSG5、pXT1（ストラタジーン社）、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL SV40（ファルマシア社）、pHM6、pVM6およびpXM（ロシュダイアグノスティック社）などの市販のベクターを適宜選択して使用することができる。

【0128】

プロモーターには、例えばCMVプロモーター、SV40プロモーター、EFプロモーターなどが含まれる。

【0129】

IRBIT、CPSF、PIPKIIまたはpNBC1をコードするDNAを宿主細胞に導入する方法には、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルス感染による方法などが含まれる（実験医学別冊4版松村正實ら編「新遺伝子工学ハンドブック」（2003年）羊土社、東京、日本）。

10

【0130】

或いは、公知の手法により非ヒト動物の卵母細胞または胚性幹細胞を使用してIRBIT遺伝子を外来的にゲノムに組み込み、強制的に発現可能にしたトランスジェニック非ヒト動物（例えばマウス）、ならびに、CPSF、PIPKIIまたはpNBC1遺伝子を外来的にゲノムに組み込み、強制的に発現可能にしたトランスジェニック非ヒト動物（例えばマウス）をそれぞれ作製し、両動物を交配して、IRBIT遺伝子と、CPSF、PIPKIIまたはpNBC1遺伝子とを発現可能にしたキメラ非ヒト動物およびその子孫を作製することができる。

20

【0131】

細胞内またはトランスジェニック非ヒト動物内で強制的に発現されたIRBITと、CPSF、PIPKIIまたはpNBC1との結合が、細胞内または動物内に取り込んだ候補物質の存在下でどのように影響を受けるかを、該結合をプルダウン法、免疫沈降法などによって測定することによって調べる。同時に、ある特定のタンパク質の細胞内合成に及ぼす影響、イノシトールリン脂質代謝に及ぼす影響、細胞内のpHに及ぼす影響を調べる。

【0132】

タンパク質の細胞内合成に及ぼす影響は、例えば、特定のタンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法などによって測定することができる。

30

【0133】

イノシトールリン脂質代謝に及ぼす影響は、例えば $[^3\text{H}]$ ラベル、あるいはPIP₂結合タンパク質を用いたPIP₂量定量などによって測定することができる。

【0134】

細胞内のpHに及ぼす影響は、例えば蛍光pH指示薬を用いた細胞内pH測定などによって測定することができる。

【0135】

候補物質は、有機小分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸（DNA又はRNA）などを含むが、これらに限定されない。

40

【0136】

上で説明したように、IRBITは、細胞内での代謝、pH変化、イオンバランス、リン脂質代謝の調節、タンパク質合成の制御、Ca²⁺放出の制御などを調節する上で大変重要な意義を全ての細胞で有している。IRBITの濃度や発現パターンを制御することにより、上記の様々な生物学的機能を制御しうることが今回判明した。本発明のスクリーニング法で同定される物質は、このような制御のために有用である。

【実施例】

【0137】

本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの

50

実施例によって限定されないものとする。

【0138】

<実施例1>

細胞質内 poly (A) 付加反応への IRBIT の関与

CPSFは、CPSF160、CPSF100、CPSF73およびCPSF30の4つのサブユニットからなる複合タンパク質群であるため、まず、この4つのサブユニットの内、どのサブユニットに結合するのかを明らかにするために、各サブユニットにmycタグを付けたcDNAを様々なコンビネーションで、IRBITと共にCOS細胞等に発現し、IRBITまたはCPSFを免疫沈降した時の共沈のされ方を調べた。

【0139】

CPSFは、マウス由来のCPSFであり、GenBank登録番号AB092504の全長および4つの各サブユニットの塩基配列に基づき、RT-PCRによってクローニングした(H. Andoら, 2003, 上記)。また、IRBITは、マウス由来のIRBITであり、GenBank登録番号NM_145542の塩基配列に基づき、RT-PCRによってクローニングした(H. Andoら, 2003, 上記)。

【0140】

CPSFの全長または各サブユニットをコードするcDNAに、mycタグをコードするDNAを融合したDNAを作製し、哺乳動物用ベクターに挿入した。一方、IRBITをコードするcDNAもまた、同じベクターに挿入した。作製されたベクターを、COS細胞に形質転換し、上記DNAを共発現した。

【0141】

細胞を遠心分離によって分離し、細胞を溶解し、細胞質画分を回収し、IRBITとCPSFとの結合を、抗IRBIT抗体(特開2004-129612号公報)および抗myc抗体を用いて検出した。

【0142】

その結果、IRBITは、CPSF160サブユニットを介して、CPSFと結合することが判明した(図1)。

【0143】

さらにまた、CPSF160の欠失変異体を使った同様の実験から、IRBITはCPSF160のmRNA結合部位に結合することが判明した(図2)。

【0144】

CPSF160のmRNA結合部位は、CPSFがpoly(A)を付加するmRNAを認識する際に必須の領域であることから、IRBITがこの領域に結合することは、IRBITがCPSF機能を阻害する可能性があり、これを確かめるために、精製蛋白質を用いた*in vitro*再構成系で、IRBITとCPSFとの結合、及びそれによるポリアダニレーション反応への影響を調べた。

【0145】

CPSFは、mRNAのポリアダニレーション反応に必須の分子であるが、それが働く場所は主に核の中であり、DNAから転写されたばかりのRNAに対して、それがmRNAとなって核外へ出て行くまでの成熟反応の一つとして、働く。しかし例外的に、卵母細胞の成熟過程、あるいは、神経細胞の局所での新たなタンパク質合成といった局面では、細胞質でmRNAのポリアダニレーションに関与し、poly(A)の長さを調節することで、目的分子のタンパク質合成を調節する(Daron C. Barnardら, Cell 2004, 119:641-651)。この細胞質内ポリアダニレーション反応は、例外的現象であるが、卵母細胞の成熟、神経可塑性を成立させる上では、必須の現象となっている。IRBITの細胞内分布を調べてみると、核内には殆ど存在しないことから、本発明者らは、IRBITの細胞質内ポリアダニレーション反応への関与に焦点を絞って検討した。

【0146】

細胞質内ポリアダニレーション反応を調べる上で、Xenopus卵母細胞の系が優れ

10

20

30

40

50

ていることから、本発明者らは、先ず、*Xenopus* 卵母細胞からの *IRBIT* cDNA のクローニングおよび単離を、定法に従って行った。*Xenopus* 卵母細胞には、哺乳動物細胞とは異なり、3種類の *IRBIT* mRNA が発現しており、この3種類とも、*CPSF160* と結合することが判明した。

【0147】

IP₃ 受容体 mRNA の3'末端は、細胞質内ポリアデニレーション反応を受ける可能性のある配列を有しており、実際、小脳 *Purkinje* 細胞では、樹状突起内にこの mRNA が存在している。このことは、*IP₃* 受容体から放出された *IRBIT* が *CPSF* との結合を介して、*IP₃* 受容体自身のタンパク質合成を制御している可能性を示している。

10

【0148】

さらに、本発明者らは、*IRBIT* が、*PAP* 及び *Fip1* (*CPSF* のサブユニット) の存在下でのポリアデニレーション活性 (*I. Kaufmann* ら, *EMBO J.* (2004) 23: 616-626) を抑制させる働きがあることを見出した。

【0149】

上記の結果から、*IRBIT* が、細胞内で *CPSF* との結合を介して、タンパク質合成を制御していることが示された。

【0150】

<実施例2>

20

IRBIT と *PIP* キナーゼ *II* 型 (*PIPKII*) との相互作用

本発明者らはさらに、*IRBIT* と相互作用する分子を探索した。

実施例1と同様の手順で、*HEK293* 細胞に *FLAG-IRBIT* を過剰発現し、抗 *FLAG* 抗体で免疫沈降して *IRBIT* と共沈してくるタンパク質を、質量分析器で解析した。その結果、リン脂質リン酸化酵素である *phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase* (*PIPKII*) が同定された。*PIPKII* ファミリー (*PIPKII*, *PIPKII*, *PIPKII*) は *PIP₂* を合成する酵素であり、*PIP₂* の加水分解により *IP₃* が産生されることを考えると、*IP₃* 受容体、*IRBIT*、*PIPKII* からなる情報伝達機構が存在する可能性が考えられる (図3)。

30

【0151】

さらに、次の実験を行い、同時にその結果も以下に示す。

(1) マウス *IRBIT* と *Myc-PIPKII*, , を *COS-7* に過剰発現し、免疫沈降を行った。具体的には、*Lysis* バッファー (10 mM *Hepes*, 100 mM *NaCl*, 2 mM *EDTA*, 1% *P-40*, pH 7.4) で細胞を可溶化し、遠心 (20000 × g, 30分) して上清を回収後、抗 *Myc* 抗体あるいは抗 *IRBIT* 抗体を添加し、1時間反応させた。さらにプロテイン *G* セファロースを添加して1時間反応後、免疫複合体を *Lysis* バッファーで洗浄し、*SDS-PAGE* サンプルバッファーで溶出した。その後、抗 *Myc* 抗体あるいは抗 *IRBIT* 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、*IRBIT* は *Myc-PIPKII*, , のいずれとも共沈した (図4)。

40

【0152】

(2) マウス小脳から抗 *IRBIT* 抗体で免疫沈降を行ったところ、*PIPKII* が共沈した (図5)。その結果から、*in vivo* での *IRBIT* と *PIPKII* との結合が確認された。

【0153】

(3) マウス *IRBIT* と *Myc-PIPKII* を *COS-7* に過剰発現し、免疫染色を行った。具体的には、4% パラフォルムアルデヒドで固定、0.1% *Triton X-100* で膜透過処理、2% ヤギ血清でブロッキング処理を行った後、マウス抗 *Myc* 抗体およびウサギ抗 *IRBIT* 抗体を添加し、室温で1時間反応させた。 *Alexa48*

50

8 結合抗マウス I g G 抗体および A l e x a 5 9 4 結合抗ウサギ I g G 抗体を二次抗体として添加し、37 で45分反応させた。その結果、I R B I T と M y c - P I P K I I のいずれも細胞質に局在することが判かった(図6)。

【0154】

(4) マウス I R B I T の欠失変異体(配列番号3のアミノ酸配列における60-530, 78-530, 105-530, 1-277, 1-104, 1-90および1-77)は対応する配列をPCRで増幅し、GFP融合タンパク発現ベクター p E G F P - C 1 (C l o n t e c h) にクローニングして作製し、これらの変異体の各々と P I P K I I との結合を調べたところ、I R B I T のN末端領域にあるセリンに富む領域が上記結合に重要であることが明らかになった(図7)。

10

【0155】

(5) マウス I R B I T のセリンに富む領域の点突然変異体(配列番号3のアミノ酸配列におけるT52A, T58A, S62A, S64A, S66A, S68A, S70A, S71A, T72A, S74A, S76G, S77A, S80A, D83A, S90AおよびT97A)は、部位特異的変異体作成キット(Stratagene)を用いて作製し、これらの変異体の各々と P I P K I I との結合を調べた。その結果、I R B I T の S e r 6 8 及び S e r 7 1 が上記結合に重要であった(図8)。

【0156】

以上の結果より、I R B I T が P I P K I I ファミリーに結合することが確認された。さらに予備的データから、I R B I T は P I P K I I 活性を抑制することを見いだしているため、I R B I T はイノシトールリン脂質代謝の活性制御をおこなっていると結論づけられた。

20

【0157】

<実施例3>

I R B I T による N B C 1 (N a / H C O ₃ c o t r a n s p o r t e r 1) の活性化

本発明者らはさらに、I R B I T に結合する蛋白質として、細胞膜上でナトリウムイオンと重炭酸イオンの輸送を行う N B C 1 (s o d i u m b i c a r b o n a t e c o - t r a n s p o r t e r 1) 蛋白質を同定した。

【0158】

N B C 1 には、p型とk型の2つのスプライシング変異体が存在することが知られているが(Seth L. Alper, Annu. Rev. Physiol. 2002, 64: 899-923)、I R B I T は、そのうちp型の N B C 1 (p N B C 1 という)と結合すること、また、I R B I T におけるいくつかのセリン残基のリン酸化が p N B C 1 との結合に必要であることが明らかになった。以下に、具体的に実験および結果を示す。

30

【0159】

(1) p N B C 1 における I R B I T 結合領域の同定

p N B C 1 の p 型特異的なN末端配列(1-85アミノ酸)が I R B I T との結合に必要不可欠であった。この85アミノ酸内に更なる欠失変異体を作製し、それら変異体と I R B I T との結合をプルダウンアッセイ(pull down assay)を用いて検討した。具体的には、以下の実験を行った。

40

【0160】

C O S - 7 細胞に H A - I R B I T を過剰発現し、細胞抽出液を調製した。M B P - p N B C 1 の欠失変異体のリコンビナントタンパク質を添加し、反応後、結合したタンパク質を amylose レジンでプルダウンした。H A - I R B I T を抗 H A 抗体を用いたウェスタンブロットングで検出した。

【0161】

その結果、p型特異的な配列のうちN末端62アミノ酸があれば I R B I T と結合しうることが示された(図9、図10)。しかしこの62アミノ酸から更にN末側やC末側を削ると、I R B I T との結合が見られなくなり、これ以上 I R B I T 結合領域を狭めるの

50

は難しいと考えられた。この結果から I R B I T との結合には p N B C 1 の特定の数アミノ酸の配列が関与しているのではなく、数十アミノ酸からなる三次元的な構造が必要である可能性が示唆された。

【 0 1 6 2 】

(2) I R B I T における p N B C 1 結合領域の同定

次に、マウス I R B I T (全長 5 3 0 アミノ酸 ; 配列番号 3) の各種欠失変異体を C O S 7 細胞に発現させ、それぞれの変異体の p N B C 1 結合能をプルダウンアッセイで調べた。具体的には、以下の実験を行った。

【 0 1 6 3 】

C O S - 7 細胞に G F P - I R B I T の欠失変異体を過剰発現し、細胞抽出液を調整した。M B P - p N B C 1 (1 - 8 5) のリコンビナントタンパク質を添加し、反応後、結合したタンパク質を a m y l o s e レジンでプルダウンした。G F P - I R B I T の欠失変異体を抗 G F P 抗体を用いたウェスタンブロットティングで検出した。

【 0 1 6 4 】

その結果を図 1 1 に示す。図から、I P ₃ 受容体との結合が確認されている I R B I T の N 末側を発現する欠失変異体 (1 - 1 0 4 、 1 - 2 7 7) ですら p N B C 1 とは結合できないことがわかった。また I P ₃ 受容体と結合できないことが既に確認されている I R B I T の C 末側を発現する欠失変異体 (1 0 5 - 5 3 0) もまた p N B C 1 とは結合できなかった。p N B C 1 との結合に必要であることが示されているセリンリン酸化部位は 1 - 1 0 4 に全て含まれることから、1 - 1 0 4 の中に短い p N B C 1 結合配列が存在するにも関わらず何らかの立体構造によって p N B C 1 との結合が阻害されている可能性も考えられた。そこで、1 - 1 0 4 を更に細かく欠失させた欠失変異体を作製し p N B C 1 との結合を解析したが、いずれも p N B C 1 との結合は見られなかった。

【 0 1 6 5 】

以上の結果から、I R B I T の N 末側と C 末側を含む全体の構造が p N B C 1 との結合に必要であることが明らかとなり、I R B I T の N 末側だけで十分であるとされる I R B I T と I P ₃ 受容体との結合様式との違いが明らかとなった。

【 0 1 6 6 】

(3) 内在性 I R B I T と N B C 1 との結合

次に、内在性の I R B I T と N B C 1 との結合を、免疫沈降法を用いて確認する実験を行った。

【 0 1 6 7 】

そもそも N B C 1 は小脳の膜画分における I R B I T 結合蛋白質として同定されたので、まず小脳膜画分抽出液を用いて免疫沈降を行った。また小脳膜画分において I R B I T は I P ₃ 受容体とも結合していることがわかっているので、N B C 1 、 I R B I T 、 I P ₃ 受容体からなる三者複合体を形成しうるか否かを検討した。具体的には、以下の実験を行った。

【 0 1 6 8 】

小脳膜画分を界面活性剤で可溶化後、抗 I R B I T 抗体、抗 N B C 抗体、あるいはコントロール抗体を添加して反応させた。さらにプロテイン G セファロースを添加して免疫複合体を抽出した。その後、抗 I R B I T 抗体、抗 N B C 抗体あるいは抗 I P ₃ R 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。

【 0 1 6 9 】

その結果、抗 N B C 1 抗体免疫沈降物中に内在性の I R B I T が、また抗 I R B I T 抗体免疫沈降物中に内在性の N B C 1 が、それぞれ含まれることがわかり、内在性の I R B I T と N B C 1 が小脳膜画分で複合体を形成することが確認された (図 1 2) 。一方で、既に A n d o ら (2 0 0 3 , 上記) によって報告されているように、抗 I R B I T 免疫沈降物中には I P ₃ 受容体が検出されたが、抗 N B C 1 沈降物中には I P ₃ 受容体が検出できなかった。この結果から、内在性 N B C 1 の多くが I R B I T と I P ₃ 受容体を含む三者複合体を形成していないことが示された。

10

20

30

40

50

【0170】

さらにIRBITとNBC1との結合が普遍的であることを確認するために、COS7細胞の抽出液を用いて内在性のIRBITとNBC1との結合を、先ほどと同様の免疫沈降法を用いて検討した。具体的には、以下の実験を行った。

【0171】

COS-7細胞の細胞抽出液に抗IRBIT抗体、抗NBC抗体、あるいはコントロール抗体を添加して反応させた。さらにプロテインGセファロースを添加して免疫複合体を抽出した。その後、抗IRBIT抗体あるいは抗NBC抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

【0172】

その結果を図13に示す。図から、小脳膜画分の抽出液を調製する時に用いたものと同じバッファーでCOS7細胞を抽出した場合、内在性のIRBITとNBC1の結合が検出されないことがわかった。しかし、このバッファーに2mM CaCl_2 を加えて同様の実験を行ったところ、内在性のIRBITとNBC1の結合が検出された。このバッファーは既に2mMのEDTAを含んでいることから、2mM CaCl_2 を加えた時のカルシウムイオン濃度は数 μM であると考えられる。これらの結果から、内在性のNBC1とIRBITとの結合が小脳膜画分とCOS7細胞とは異なった様式で制御されている可能性が示唆された。

【0173】

(4) IRBITによるNBC1の活性化

アフリカツメガエル卵母細胞(Xenopus Oocyte)の培養細胞にマウスIRBITのcRNAとヒトpNBC1またはkNBC1のcRNAを同時注入し、膜電位を-25mVにし、ND96溶液(96mM NaCl , 2mM KCl , 1mM MgCl_2 , 5mM HEPES , pH7.4)からND96 + HCO_3^- 溶液に変えた時の電流変化を測定した。コントロールには、IRBIT、pNBC1、kNBC1を使用した。

【0174】

その結果、pNBC1活性のみが、IRBITの同時注入によって約6~7倍増強された(図14A)。同様に、ND96 + HCO_3^- 溶液中で膜電位を-160mVから+60mVの範囲で変化させたときにも、pNBC1活性のみが、IRBITの同時注入によって顕著に増強された(図14B)。

【0175】

さらにまた、IRBITのリン酸化部位をアラニン(A)に置換したIRBIT変異体(S68A, S71A, S74AまたはS77A)を作製し、上記と同様に、アフリカツメガエル卵母細胞にIRBIT変異体のcRNAとヒトpNBC1のcRNAを同時注入し、膜電位を-25mVにし、ND96溶液からND96 + HCO_3^- 溶液に変えた時の電流変化を測定した。

【0176】

その結果、リン酸化部位をアラニンに置換したすべてのIRBIT変異体において、IRBITのpNBC1活性への増強作用は消失した(図15)。このことは、IRBITのリン酸化がpNBC1の活性化に必要であることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0177】

本発明により、IRBITは、細胞内での代謝、pH変化、イオンバランス、リン脂質代謝の調節、タンパク質合成の制御、 Ca^{2+} 放出の制御などを調節する上で大変重要な意義を全ての細胞で有していることが判明した。IRBITの濃度や発現パターンを制御することにより、このような様々な生物学的機能を制御する。IRBITは、例えば脳神経系では脈絡叢(choroid plexus)や神経細胞、グリア細胞で強く発現しており、脳神経系の機能制御にも貢献している。また、IRBITは、細胞内のpHの維持に重要なpNBC1の働き活性化して、特にpHが酸性に傾くことによる疾患、例え

10

20

30

40

50

ば緑内障や白内障などの眼の疾患、低身長症、精神遅滞、膵臓炎などの疾患の治療に有用である。さらにまた、IRBITは、PIPKIIの活性を抑制または阻害する働きがあるため、2型糖尿病の治療に使用することができる。このように、本発明により、IRBITが標的とする3つのタンパク質が特定されたことによって、IRBITおよびその抑制剤、亢進剤が、標的タンパク質が生体内で果たす生物学的機能の制御のために役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0178】

【図1】図1は、IRBITとCPSF160との結合を示すウエスタンブロット図である。図中、I.B.はウエスタンブロッティングを表し、I.P.は免疫沈降を表し、HAはタグとしてのヘマグルチニンを表し、loadは細胞抽出液を表す。

10

【図2】図2は、IRBITがCPSFのCPSF160サブユニットのmRNA結合部位に結合することを示す模式図である。

【図3】図3は、IP₃受容体、IRBIT、PIPKII、IP₃が関与するイノシトールリン脂質代謝を示す模式図である。図中、PLCはホスホリパーゼCを表す。

【図4】図4は、マウスIRBITとMyc-PIPKIIとの結合を示す。(A)は抗Myc抗体による免疫沈降を示す。(B)は抗IRBIT抗体による免疫沈降を示す。図中、inputは細胞抽出液を表し、IPは免疫沈降を表し、対照IgG(陰性対照)はこれを用いて免疫沈降を行ったサンプルを表す。

【図5】図5は、マウス小脳のPIPKIIが抗マウスIRBIT抗体と免疫沈降で共沈したことを示す。inputは、図4と同じである。

20

【図6】図6は、IRBITとMyc-PIPKIIがともに細胞質に局在することを示す。MergeはPIPKIIの染色像とIRBITの染色像の重ね合わせを示し、重なっている部分が黄色となる。

【図7】図7は、IRBIT欠失変異体を用いて、PIPKIIと結合するIRBITの結合部位の特定を示す。(A)はIRBITの欠失変異体の模式図を示す。(B)はIRBITのN末端側からの欠失変異体とMyc-PIPKIIとの結合を示す。(C)はIRBITのC末端側からの欠失変異体とMyc-PIPKIIとの結合を示す。

【図8】図8は、IRBITのSer68及びSer71がPIPKIIと結合することを示す。図中、inputは細胞抽出液を表し、IPは免疫沈降を表し、IBはウエスタンブロッティングを表す。

30

【図9】図9Aは、IRBITとNBC1との結合を示すウエスタンブロット図(上図)である。pNBC1(膵臓型)に特異的な部分を含む組換え型タンパク質2と5にのみIRBIT(黒三角)が結合する。各組換え型タンパク質(1、2、3、4、5、6または7)は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図(図9Aの下図)中、黒丸で示し、かつ、図9Bに、pNBC1およびkNBC1(腎臓型)の構造とともに、それらの構造を模式的に示した。図中、MBPは精製のために用いたマルトース結合タンパク質タグを示す。また、CBBはクマシーブリリアントブルーを表す。

【図10】図10は、NBC1の欠失変異体とIRBITとの結合能を示す。図10Aは、pNBC1の欠失変異体をそれぞれ大腸菌で発現精製し、COS7細胞に強制発現したHA-IRBIT(ここで、HAはヘマグルチニンを表わす)との結合(または、相互作用)をプルダウンアッセイ(pull down assay)で検討した結果を示す。また、図10Bの上図は、プルダウンしたサンプルをSDS-PAGEしCBBで染色した結果を示す。図10Bの下図は、プルダウンしたサンプルを抗HA抗体でウエスタンブロッティングした結果を示す。黒三角はHA-IRBITの泳動位置を、黒点は各欠失変異体タンパク質の泳動位置をそれぞれ示している。

40

【図11】図11は、IRBITの欠失変異体とpNBC1との結合能を示す。IRBITの各種欠失変異体をGFP(緑色蛍光タンパク質)との融合タンパク質としてCOS7細胞に強制発現し、pNBC1との結合をプルダウンアッセイで検討した。図11A、図11Bともに、それぞれの欠失変異体を発現した細胞抽出液(lysate)もしくはプルダウンサンプル(pull-down)をSDS-PAGEし抗GFP抗体でウエスタ

50

ンブロッティングした結果を示す。黒三角は各欠失変異体の泳動位置を示している。全長 (FL) 以外のIRBITがいずれもpNBC1と結合しなくなっていることがわかる。

【図12】図12は、小脳膜画分における内在性IRBITとNBC1との結合を示す。小脳膜画分の抽出液から、コントロールとなる免疫前の抗体(対照)、抗NBC1抗体、抗IRBIT抗体でそれぞれ免疫沈降(IP)を行い、沈降物をSDS-PAGEして、抗IRBIT抗体、抗NBC1抗体、抗IP₃受容体抗体でウエスタンブロッティング(IB)を行った。黒三角はそれぞれのタンパク質の泳動位置を示している。

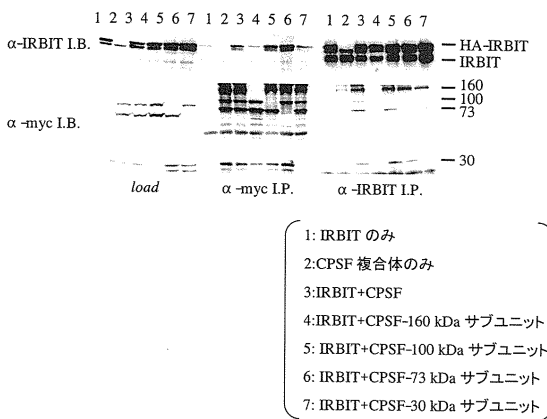
【図13】図13は、COS7細胞抽出液中の内在性IRBITとNBC1との結合を示す。COS7細胞の抽出液からコントロールとなる免疫前の抗体(対照)、抗IRBIT抗体、抗NBC1抗体でそれぞれ免疫沈降(IP)を行い、沈降物をSDS-PAGEして、抗NBC1抗体もしくは抗IRBIT抗体でウエスタンブロッティング(IB)を行った。黒三角はそれぞれのタンパク質の泳動位置を示している。左三列はCaCl₂非存在下で、右三列はCaCl₂存在下でそれぞれ免疫沈降を行った沈降物を用いている。

【図14】図14は、電圧クランプ法によって測定された、IRBITによるpNBC1の活性化を示す。図14Aは、膜電位を-25mVに固定したときの電流値(μA)である。また、図14Bは、膜電位を-160mV~+60mVの間で変化させたときの電流変化をI-V曲線で示した。

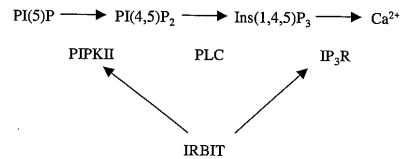
【図15】図15は、IRBITのリン酸化がpNBC1の活性化に必要であることを示す。

10

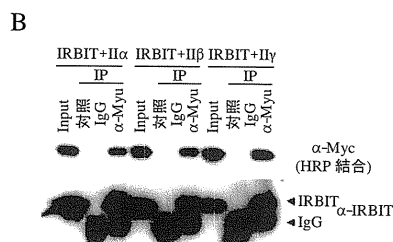
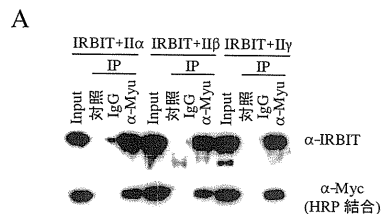
【図1】



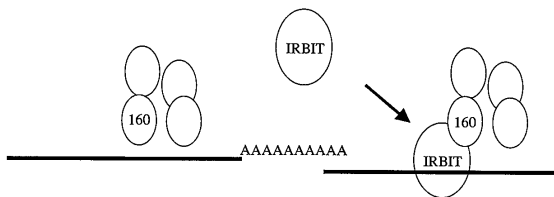
【図3】



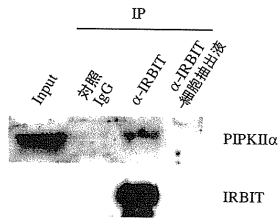
【図4】



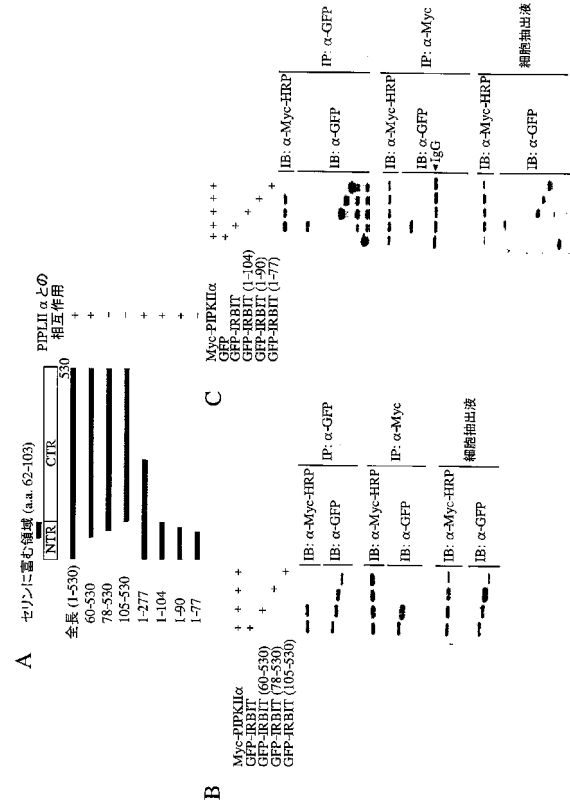
【図2】



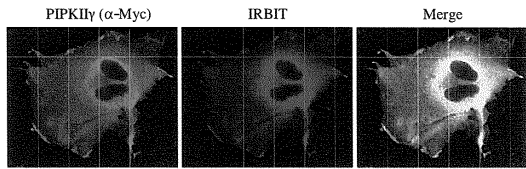
【 図 5 】



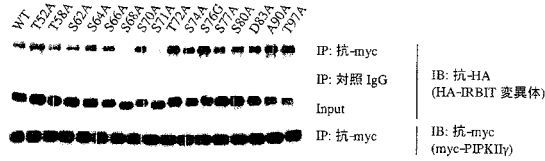
【 図 7 】



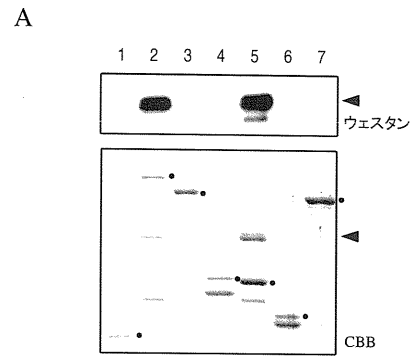
【 図 6 】



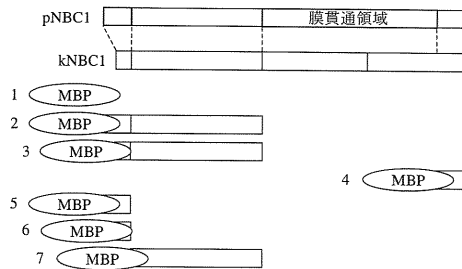
【 図 8 】



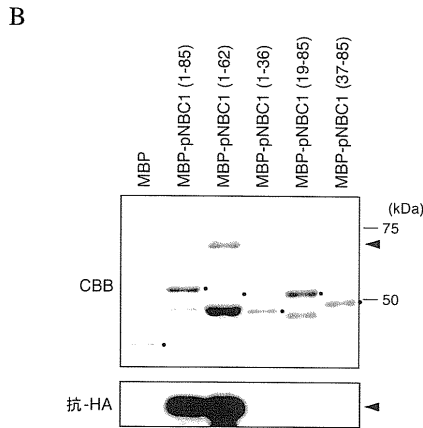
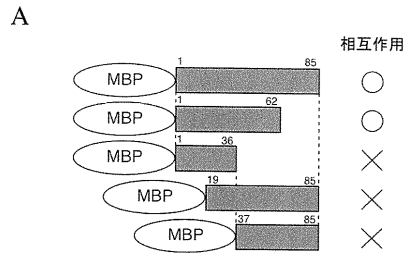
【 図 9 】



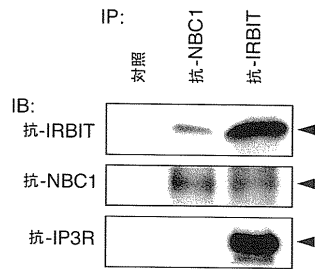
B



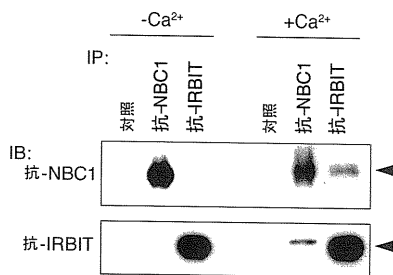
【 図 1 0 】



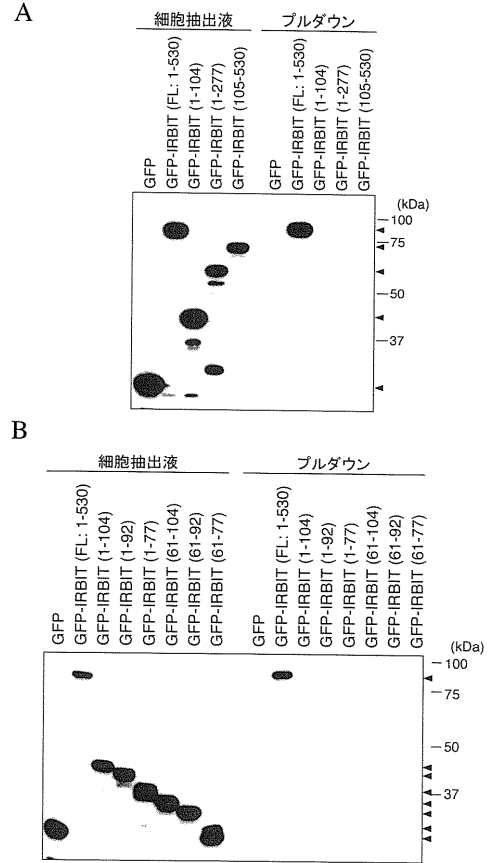
【 図 1 2 】



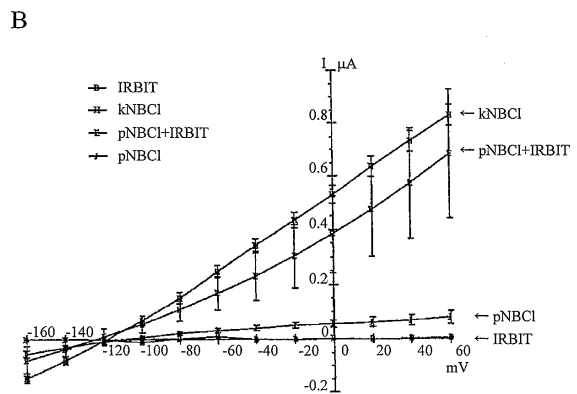
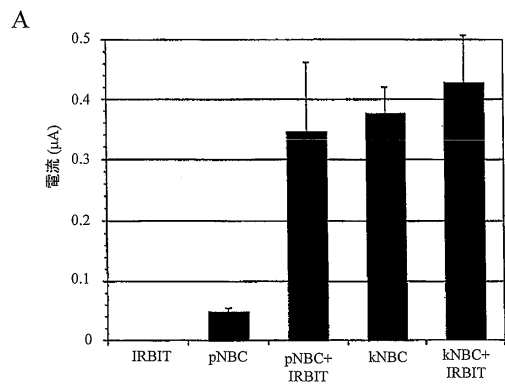
【 図 1 3 】



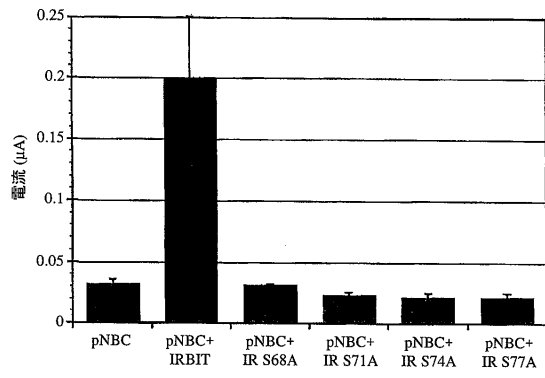
【 図 1 1 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 配列表 】

0005146944000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 安東 英明
埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内
- (72)発明者 水谷 顕洋
東京都品川区荏原7-9-6 コスモ旗の台602

審査官 安藤 公祐

- (56)参考文献 国際公開第2004/030615(WO, A1)
国際公開第2004/041170(WO, A1)
特開2004-129612(JP, A)
山田秀臣ら, IRBITはpNBC1の膜発現を促進する, 日本腎臓学会誌, 2005年, Vol.47, No.3, 288, P-300
GROSS, E. et al, Structural determinants and significance of regulation of electrogenic Na(+)-HCO₃(-) cotransporter stoichiometry, Am J Physiol Renal Physiol, 2002年, Vol.283, No.5, p.F876-87

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00
A61K 31/7088
A61K 39/395
A61K 48/00
A61P 1/18
A61P 27/02
A61P 43/00
C12Q 1/02
G01N 33/15
G01N 33/50
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 15/09
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed