

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/068991

発行日 平成28年9月8日 (2016.9.8)

(43) 国際公開日 **平成26年5月8日 (2014.5.8)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705 Z N A	2 G O 4 5
C07K 17/00 (2006.01)	C O 7 K 17/00	4 B O 2 4
C12Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42	4 B O 6 3
GO1N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 H O 4 5
GO1N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 43 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2014-544325 (P2014-544325)	(71) 出願人	504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2013/006488	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(22) 国際出願日	平成25年11月1日 (2013.11.1)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	特願2012-243730 (P2012-243730)	(72) 発明者	森山 芳則 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内
(32) 優先日	平成24年11月5日 (2012.11.5)	(72) 発明者	表 弘志 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリアミンの化学伝達を司るトランスポーターの同定とその利用

(57) 【要約】

本発明は、新規のポリアミントランスポーターの分野に関する。本発明に従って、ポリアミン輸送を担うトランスポーターおよびそれをコードする遺伝子が同定された。さらに、本発明に従って、そのようなトランスポーターおよびそのようなトランスポーターを含む人工膜を用いる、ポリアミントランスポーター活性調節剤のスクリーニング法が提供される。また、本発明に従って、ポリアミン代謝が関与する疾患の予防剤・治療剤の候補物質を提供するスクリーニング法が提供される。本発明に従って、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするためのキットもまた提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

- (a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；
 - (b) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；
 - (c) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；
 - (d) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；
 - (e) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；
 - (f) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、
 - (g) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；
- からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む、人工膜。

10

20

【請求項 2】

請求項 1 に記載の人工膜であって、以下：

- (h) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列からなる核酸；ならびに、
 - (i) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、
- からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む、人工膜。

30

【請求項 3】

膜小胞である、請求項 1 に記載の人工膜。

【請求項 4】

リボソームである、請求項 1 に記載の人工膜。

【請求項 5】

さらに、プロトンポンプを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の人工膜。

【請求項 6】

さらに、F₀F₁-ATPase を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の人工膜。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

- (a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；
- (b) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；
- (c) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；
- (d) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

40

50

(e) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸を用いて、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドを発現する工程

を包含する方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；ならびに、

(i) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸を用いて、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドを発現する工程

を包含する方法。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

(j) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド；

(k) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(l) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(m) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(n) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(o) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；ならびに、

(p) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドを人工膜に組み込む工程、
を包含する方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

(q) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列からなる核酸によってコードされるポリペプチド；ならびに、

(r) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドを人工膜に組み込む工程、

10

20

30

40

50

を包含する方法。

【請求項 1 1】

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤のスクリーニング法であって、
 (1) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の人工膜を提供する工程；
 (2) 該人工膜に候補薬物を接触させる工程；
 (3) 該人工膜のポリアミン輸送活性を測定する工程；および、
 (4) 工程 (3) で測定されたポリアミン輸送活性から、該候補薬物がポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤であるか否かを決定する工程；
 を包含する、方法。

【請求項 1 2】

前記活性調節剤が阻害剤である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記活性調節剤が活性促進剤である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 1 に記載の方法によって得られた、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の人工膜を含む、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするための、組成物。

【請求項 1 6】

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするためのキットであって、
 以下：

(I) 核酸であって、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；
 (b) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(d) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(e) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸、ならびに、

(II) 脂質

を含む、キット。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のキットであって、前記 (I) 核酸が、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；ならびに、

(i) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される、キット。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするためのキットであって、以下：

(I I I) ポリペプチドであって、以下：

(j) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド；

(k) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(l) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90 % 同一である配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(m) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(n) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(o) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；ならびに、

(p) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチド、ならびに、

(I I) 脂質を含む、キット。

【請求項 19】

請求項 18 に記載のキットであって、前記 (I I I) ポリペプチドが、以下：

(q) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列からなる核酸によってコードされるポリペプチド、ならびに；

(r) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

からなる群から選択される、キット。

【請求項 20】

さらに、プロトンポンプを含む、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 21】

さらに、F₀F₁-ATPase を含む、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、新規のポリアミントランスポーターの分野に関する。さらに、本発明は、ポリアミントランスポーターの輸送活性を調節する薬剤のスクリーニング、ならびに、ポリアミンの代謝異常が関連する疾患を予防・治療するための薬剤のスクリーニング、ならびに、これらスクリーニングに使用するためのキットに関する。

【背景技術】**【0002】**

ポリアミンは第一級アミノ基を 2 つ以上持つ脂肪族で、スペルミジン、スペルミン、ブ

10

20

30

40

50

トレシンなど生物界に広く存在している。ポリアミンには多様な生理作用（細胞増殖促進、細胞分化促進、蛋白質合成促進、DNAの安定化、抗酸化作用、および、NMDA型グルタミン酸受容体やカリウムチャンネル等に作用することによる神経伝達の調節）がある事が報告されている。ポリアミンは神経細胞やアストロサイト等の小胞に蓄積されていて、刺激によって細胞外へ放出され、グルタミン酸化学伝達をコントロールし、その結果、神経伝達をコントロールしている。以下に、その代表例を記載する。

(1) 高酸素下での肺の損傷

高酸素下では肺が損傷を受け高酸素症になるが、ポリアミン合成が高酸素症下での生存率に重要である事が知られている（非特許文献1および5）。

(2) 統合失調症等の神経疾患との関連

統合失調症、錐体外路症候群(筋の緊張状態の異常と不随意運動で、手指振戦、筋硬直、頸・顔部のれん縮、眼球回転発作、焦燥感等)、気分障害、不安、自殺行動とポリアミンが関連している（非特許文献2）。これらの神経疾患の原因のひとつとしてNMDA受容体の過剰興奮が関連していると言われている。ポリアミンのひとつであるアグマチンは抗鬱、抗不安作用、気分障害を持つ(非特許文献2、6、7)。

(3) 抗鬱作用との関連

エリプロジルはNMDA受容体のポリアミン結合部位に結合し、抗鬱作用を示す(非特許文献2、6)。

(4) 神経変性

アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血、脳卒中等の神経変性をともなう疾患において、NMDA受容体の過剰興奮が重要な役割を果たしている。メマンチンはNMDA受容体を阻害する事で神経の過剰興奮を阻害し、神経細胞死を防ぐ。アルツハイマー病の治療薬として用いられている。また、ポリアミン類似体はNMDA受容体の阻害を通して神経を変性から守る事が報告されている（非特許文献4）。

【0003】

単離シナプス小胞でポリアミン輸送は観察されているが（非特許文献8）、ポリアミンがどのような仕組みで、どのようなトランスポーターを介して、小胞内に蓄積されるのかは不明であった。

【0004】

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては、次のものがある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Donald F. Tierney, Laurence J. Marton, Allen D. Hacker, Nicholas Lowe, (1985) Polyamines in Clinical Disorders. West J Med. 142, 63-73

【非特許文献2】Fiori LM, Turecki G. (2008) Implication of the polyamine system in mental disorders. J Psychiatry Neurosci. 33, 102-110.

【非特許文献3】Williams K. (2009) Extracellular Modulation of NMDA Receptors. In: Van Dongen AM, editor. Source Biology of the NMDA Receptor. Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 11.

【非特許文献4】Masuko T, Namiki R, Nemoto Y, Miyake M, Kizawa Y, Suzuki T, Kashiwagi K, Igarashi K, Kusama T. (2009) Neuroprotection by tosyl-polyamine derivatives through the

10

20

30

40

50

inhibition of ionotropic glutamate receptors. J Pharmacol Exp Ther. 331, 522 - 530.

【非特許文献5】Hoet PH, Nemery B. (2000) Polyamine s in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 278, L417 - 33.

【非特許文献6】Layer RT, Popik P, Olds T, Skolnick P. (1995) Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eli prodil (SL-82.0715). Pharmacol Biochem Behav. 52, 621 - 627.

【非特許文献7】Bernstein HG, Stich C, Jager K, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J, Veh R, Bogerts B, Laube G. (2012) Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. Neuropharmacology. 62, 237 - 246.

【非特許文献8】Masuko T, Kusama-Eguchi K, Sakata K, Kusama T, Chaki S, Okuyama S, Williams K, Kashiwagi K, Igarashi K. (2003) Polyamine transport, accumulation, and release in brain. J Neurochem. 84: 610 - 7.

【発明の概要】

【0006】

一つの局面において、ポリアミン輸送を担うトランスポーターおよびそれをコードする遺伝子を同定し、さらに、そのようなトランスポーターを含む人工膜を用いる、トランスポーターの活性調節剤のスクリーニング法を提供することを、本発明の課題とする。別の局面において、そのようなスクリーニング法によって、ポリアミン代謝（例えば、輸送、合成、および/または、分解などポリアミンの任意の作用を含む）が関与する疾患の予防剤・治療剤の候補物質を提供することが、本発明の課題である。

【0007】

本発明者らは、以下の実施例に記載される独創的方法により、ポリアミントランスポーターの同定およびその機能解析を行うことによって、本発明を完成した。

【0008】

例えば、本発明によって以下が提供される。

(項目1)

以下：

(a) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；、
(b) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列と少なくとも90%同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(d) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列において1または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(e) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む、人工膜。

(項目 2)

項目 1 に記載の人工膜であって、以下：

(h) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列からなる核酸；ならびに、

(i) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む、人工膜。

(項目 3)

膜小胞である、項目 1 に記載の人工膜。

(項目 4)

リポソームである、項目 1 に記載の人工膜。

(項目 5)

さらに、プロトンポンプを含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の人工膜。

(項目 6)

さらに、F₀F₁-ATPase を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の人工膜。

(項目 7)

項目 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；、

(b) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(d) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(e) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸を用いて、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドを発現する工程

を包含する方法。

(項目 8)

項目 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；なら

10

20

30

40

50

びに、

(i) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸を用いて、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドを発現する工程

を包含する方法。

(項目 9)

項目 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

(j) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド；

(k) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(l) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90 % 同一である配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(m) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(n) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(o) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；ならびに、

(p) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドを人工膜に組み込む工程、

を包含する方法。

(項目 10)

項目 1 に記載の人工膜の製造方法であって、以下：

(q) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列からなる核酸によってコードされるポリペプチド、ならびに；

(r) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドを人工膜に組み込む工程、

を包含する方法。

(項目 11)

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤のスクリーニング法であって、

(1) 項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の人工膜を提供する工程；

(2) 該人工膜に候補薬物を接触させる工程；

(3) 該人工膜のポリアミン輸送活性を測定する工程；および、

(4) 工程 (3) で測定されたポリアミン輸送活性から、該候補薬物がポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤であるか否かを決定する工程；

を包含する、方法。

(項目 12)

前記活性調節剤が阻害剤である、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記活性調節剤が活性促進剤である、項目 11 に記載の方法。

(項目 14)

10

20

30

40

50

項目 1 1 に記載の方法によって得られた、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤。

(項目 1 5)

項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の人工膜を含む、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするための、組成物。

(項目 1 6)

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするためのキットであって、以下：

(I) 核酸であって、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；、

(b) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(d) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(e) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸、ならびに、

(II) 脂質を含む、キット。

(項目 1 7)

項目 1 6 に記載のキットであって、前記 (I) 核酸が、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；ならびに、

(i) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される、キット。

(項目 1 8)

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするためのキットであって、以下：

(III) ポリペプチドであって、以下：

(j) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド；

(k) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(l) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(m) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列によってコードさ

10

20

30

40

50

れるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(n) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(o) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；ならびに、

(p) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列において1または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチド、ならびに、

(II) 脂質を含む、キット。

(項目19)

項目18に記載のキットであって、前記(III)ポリペプチドが、以下：

(q) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列からなる核酸によってコードされるポリペプチド、ならびに；

(r) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

からなる群から選択される、キット。

(項目20)

さらに、プロトンポンプを含む、項目16～19のいずれか1項に記載のキット。

(項目21)

さらに、F₀F₁-ATPaseを含む、項目16～19のいずれか1項に記載のキット。

【0009】

本発明に従って、ポリアミン輸送を担うトランスポーターおよびそれをコードする遺伝子が同定された。さらに、そのようなトランスポーターを含む人工膜を用いる、トランスポーターの活性調節剤のスクリーニング法が提供された。さらに、そのようなスクリーニング法によって、ポリアミン代謝が関与する疾患の予防剤・治療剤の候補物質をスクリーニングする方法およびそのような候補物質もまた、提供される。

【0010】

ポリアミンの蓄積そして放出という過程における最初のステップであるポリアミンの小胞内への蓄積に関与するトランスポーターの解明によって、ポリアミン放出を制御する薬剤を開発するためのスクリーニング法が提供される。

【0011】

神経疾患においてはセロトニントランスポーターやNa⁺チャンネルをターゲットとした薬が開発され、うつ病やてんかん治療などに用いられている。しかし、決定的な治療薬は無く、新しい薬の開発が望まれている。種々の疾患にポリアミンが関与することが知られていることから、本発明は、全く新しい作用点をターゲットとした新規神経疾患治療薬の開発のためのスクリーニング法を提供するものである。

【0012】

また、植物に存在するポリアミンのトランスポーターRMV1は、動物小胞に存在する小胞型ポリアミントランスポーターとは、構造的にも、能動輸送のメカニズムにおいても全く異なることから、たとえ、植物に存在するポリアミンのトランスポーターRMV1の情報に基づいても、本発明の小胞型ポリアミントランスポーターを取得できないことも明らかとなった。

【0013】

大腸菌トランスポーターCadB、YjdE、AdiC、PuupおよびPotEがポリアミンを輸送する事が報告されているが、これらはリジン、アルギニン、オルニチン等のアミノ酸とのアンチポーターであり、本発明のトランスポーター(VPAT)とは、性

10

20

30

40

50

質が異なる。これらのトランスポーターはSLC7ファミリーのホモログであり、VPATの属するSLC18ファミリーとはアミノ酸配列、立体構造が全く異なる。PotFGHIおよびPotABCDはATPの加水分解エネルギーを利用してポリアミンを取り込むABC型トランスポーターであり、VPATとアミノ酸配列、立体構造ともに全く異なるものである。

【0014】

MdtJIも大腸菌ポリアミントランスポーターとして報告されているが、これはSMRファミリーに属するトランスポーターで、121残基と非常に小さいものである。このファミリーのトランスポーターは動物では存在しない。

【0015】

酵母ではDur3、SAM3、GAP1、Dur31、Dur33、Dur34、AGP2、UGA4、TPO1、TPO2、TPO3、TPO4、TPO5がポリアミン輸送体として報告されている。しかし、これらのトランスポーターはいずれもSLC5, 6, 7, 22もしくはSLC2型のファミリーに属するトランスポーターで本発明のVPATとはアミノ酸配列が異なり、関連が無い。

【0016】

イネOsPUT1がポリアミン輸送することが報告されているがこのタンパク質はSLC7ファミリーに属するもので、VPATとアミノ酸配列、構造が全く異なる。

【0017】

ヒトではOCT2がAgmatineとPutrescineを、OCT1とMATE1が輸送する事が報告されている。OCT1, 2はSLC22ファミリーにMATE1はSLC47ファミリーに属するトランスポーターであり、VPATとはアミノ酸配列や特性が異なる。また、これらのトランスポーターは細胞膜に存在するものである。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT)(SLC18B1)タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを示す。「*」は、動物種に拘わらず保存されているアミノ酸残基を、アミノ酸残基の下線は、推定膜貫通領域を示す。

【図2】図2は、本発明の小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT)(SLC18B1)と、SLC18型トランスポーターファミリーの属する他のトランスポーターのアミノ酸配列のアラインメントを示す。「*」は、動物種に拘わらず保存されているアミノ酸残基を、アミノ酸残基の下線は、推定膜貫通領域を示す。

【図3】図3は、ヒトの種々の臓器におけるVPAT遺伝子の発現を示すノーザンハイブリダイゼーションの結果を示すグラフである。

【図4】図4は、マウスの種々の臓器におけるVPAT遺伝子の発現を示すノーザンハイブリダイゼーションの結果を示すグラフである。

【図5】図5は、肺および腎臓でのVPATタンパク質の局在を示す、抗VPAT抗体によるプロットングの結果である。図5のAは肺の気管支周辺についての結果を、図5のBは肺胞についての結果を、図5のCは腎臓の皮質についての結果を、図5のDは腎臓の髄質についての結果を示す。図5のA(肺の気管支周辺)において、CCはクララ細胞を示し、Cは繊毛細胞を示し、そして、BTは気管支を示す。図5のB(肺胞)において、T1は1型肺胞細胞を示し、そして、T2は2型肺胞細胞を示す。図5のC(腎臓の皮質)において、Gは糸球体を示し、PTは腎近位尿細管を示し、そして、DTは腎遠位尿細管を示す。図5のD(腎臓の髄質)において、DTは腎遠位尿細管を示し、そして、CDは集合管を示す。写真中の白棒は、10μmを示す。

【図6】図6は、脳でのVPATタンパク質の局在を示す。左上段、左中段および左下段「VPAT」は抗VPAT抗体を用いた結果を示し、中央上段、中央中段および中央下段「GFAP」は抗GFAP抗体を用いた結果を示し、右「merge」は左の写真と中央の写真を重ね合わせた結果を示す。写真中の白棒は、10μmを示す。「dentate gyrus」は海馬歯状回を、「CA2」は海馬CA2領域を、「Cortex」は大脳

10

20

30

40

50

皮質示す。白棒は、10 μ mを示す。

【図7】図7は、ラット海馬より単離した初代培養アストロサイトおよび初代培養神経細胞でのVPATの発現を調べた。図7のAは初代培養ラット海馬アストロサイトでの結果を示し、図7のBは初代培養ラット海馬神経細胞での結果を示す。白棒は、10 μ mを示す。

【図8】図8は、マウス肥満細胞でのVPATの発現を調べた結果を示す。上段左は抗VPAT抗体による免疫染色の結果を、下段左はコントロール血清を用いた免疫染色の結果を示す。上段中央は、上段左で示した細胞の微分干涉顕微鏡による写真であり、上段右は、上段中央の写真に上段左の結果を重ねた写真である。下段中央は、下段左で示した細胞の微分干涉顕微鏡による写真であり、下段右は、下段中央の写真に下段左の結果を重ねた写真である。写真中の白棒は、10 μ mを示す。

10

【図9】図9のAは、マウスVPATポリペプチドとF₀F₁-ATPaseとを再構成した人工膜内へのポリアミン(スペルミン)の輸送活性を示すグラフである。図9のBは、マウスVPATポリペプチドとF₀F₁-ATPaseとを再構成した人工膜内へのポリアミン(スペルミン)の輸送のメカニズムを示す模式図である。

【図10】図10のAは、「Complete」はVPATおよびATPを含む場合、「-ATP」はATPを含まない場合、「-SLC18B1 +ATP」はVPAT(SLC18B1)を含まないリポソームを用いた場合のポリアミン(スペルミン)の輸送活性を示すグラフである。図10のBは、図10のAの「Complete」において、スペルミン濃度を変化させて輸送活性を測定した結果である。図10のCは、VPAT(SLC18B1)を含むリポソームに：ATPを添加しなかった場合(「-ATP」)、ATPを添加した場合(「+ATP」)；ATPを添加し、さらにナイジェリシンを添加した場合(「Nigericin」)；ATPを添加し、さらにバリノマイシンを添加した場合(「Valinomycin」)；ならびに、ATPを添加し、さらにナイジェリシンおよびバリノマイシンを添加した場合(「Nig+Val」)のスペルミン輸送活性を示す。図10のDは、リポソームの内側を酸性に、外側を酸性(「pH5.5」)またはアルカリ性(「pH8.0」)にして、スペルミン輸送活性を促成した結果である。図10のEは、「Complete」はVPATおよびATPを含む場合、「-ATP」はATPを含まない場合、「-SLC18B1 +ATP」はVPAT(SLC18B1)を含まないリポソームを用いた場合のスペルミジンの輸送活性を示すグラフである。図10のFは、図10のEの「Complete」において、スペルミジン濃度を変化させて輸送活性を測定した結果である。図10のGは、VPAT(SLC18B1)を含むリポソームに：ATPを添加しなかった場合(「-ATP」)、ATPを添加した場合(「+ATP」)；ATPを添加し、さらにナイジェリシンを添加した場合(「Nigericin」)；ATPを添加し、さらにバリノマイシンを添加した場合(「Valinomycin」)；ならびに、ATPを添加し、さらにナイジェリシンおよびバリノマイシンを添加した場合(「Nig+Val」)のスペルミジン輸送活性を示す。

20

30

【図11】図11は、VPATとF₀F₁-ATPaseとを再構成した人工膜に、(1)コントロール(F₀F₁-ATPaseがなく、VPATのみを含む人工膜)、(2)1 μ M レゼルピン(Reserpine)、(3)1 μ M テトラベナジン(Tetrabenazine)、(4)1mM スペルミン(Spermine)、(5)1mM アグマチン(Agmatine)、(6)1mM ドーパミン(Dopamine)、または、(7)1mM アセチルコリン(Acetylcholine)を添加することによる、VPAT輸送活性への阻害効果を示したグラフである。縦軸は、人工膜内に輸送された放射性スペルミンの量を、上記(1)~(7)を添加しなかった場合の相対値として示す。

40

【図12】図12は、精製したVPAT、VMAT2、VACHTをリポソームに組み込み、スペルミン(「Spermine」)、スペルミジン(「Spermidine」)、セロトニン(「Serotonin」)、アセチルコリン(「Acetylcholine」)の輸送を測定した結果である。

50

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0020】

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0021】

本明細書において使用される用語「トランスポーター」とは、脂質二重膜を透過できない物質（例えば、ポリアミン）を、脂質二重膜を越えて輸送する物質をいう。典型的には、トランスポーターは、脂質二重膜中に存在する膜タンパク質である。タンパク質であるトランスポーターは、本明細書において「輸送タンパク質」と互換可能に使用される。

【0022】

本明細書において使用される用語「輸送活性」とは、脂質二重膜を透過できない物質（例えば、ポリアミン）を、脂質二重膜を越えて輸送する活性をいう。ポリアミンの輸送活性を本明細書において「ポリアミン輸送活性」という。「ポリアミン輸送活性」を有するポリペプチドを「ポリアミントランスポーター」という。ポリアミントランスポーターには、動物の小胞に存在する小胞型ポリアミントランスポーター以外にも、例えば、植物のポリアミントランスポーターが知られている。本明細書において、「小胞型ポリアミントランスポーター」の略号を「VPAT」とし、そして、そうでないと記載しない限り、「小胞型ポリアミントランスポーター」を「ポリアミントランスポーター」とも記載する。

【0023】

本明細書において使用される用語「ポリアミン」とは、第一級アミノ基を2つ以上持つ直鎖脂肪属炭化水素または分岐脂肪属炭化水素をいう。ヒトにおけるポリアミンとしては、代表的には、プトレシン、スペルミジン、および、スペルミンが挙げられるがこれらに限定されない。

【0024】

本明細書において使用される用語「プロトンポンプ」とは、ATPをエネルギー源として H^+ を輸送する輸送活性を有するタンパク質をいう。代表的なプロトンポンプとしては、大腸菌、ミトコンドリアおよびクロロプラストに存在する F_0F_1 -ATPase、液胞およびクロマフィン顆粒に存在するV-ATPase、細胞膜に存在するH/K-ATPaseが挙げられるが、これに限定されない。

【0025】

本明細書において使用される用語「人工膜」とは、脂質（例えば、純粋な脂質、脂質とタンパク質との混合物、脂質を含む細胞の膜画分、または、細胞膜もしくは細胞膜由来の粗精製物が挙げられるがこれらに限定されない）を含む膜画分または細胞膜を原料として人工的に調製された膜であり、好ましくは、脂質二重膜であるがこれに限定されない。「人工膜」としては、例えば、リボソームが挙げられるが、これに限定されない。

【0026】

本明細書において使用される用語「ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤」とは、ポリアミン輸送タンパク質の輸送活性に影響を与える物質をいう。「ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤」は、輸送活性を促進する物質であっても、阻害する物質であってもよい。

【0027】

本明細書において使用される場合、「キット」とは、複数の容器、および製造業者の指

10

20

30

40

50

示書を含み、そして各々の容器が、本発明の核酸および/またはポリペプチドを含む製品をいう。必要に応じて、本発明のキットは、リボソームのような人工膜、あるいは、人工膜を調製するための脂質を含む。

【0028】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」または「核酸分子」は、一本鎖形態、二本鎖形態、または他の形態である、リン酸エステルポリマー形態のリボヌクレオチド（アデノシン、グアノシン、ウリジン、もしくはシチジン；「RNA分子」）またはデオキシリボヌクレオチド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、もしくはデオキシシチジン「DNA分子」）、またはそれらの任意のホスホエステルアナログ（例えば、ホスホオチオエートおよびチオエステル）を指し得る。

10

【0029】

「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」は、核酸（例えば、DNAまたはRNA）中の一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも呼ばれる）であり、2つの以上のヌクレオチドの任意の鎖またはその相補鎖を意味する。本発明の好ましい核酸は、配列番号1および/または配列番号3に示される核酸、ならびにその相補鎖、改変体およびフラグメントを包含する。

【0030】

「相補鎖」とは、ある核酸配列に対して塩基対を形成し得るようなヌクレオチドの鎖を意味する。例えば、二本鎖DNAの各々の鎖は互いに相補的な塩基配列を有し、一方の鎖から見て他方の鎖は相補鎖である。

20

【0031】

「コード配列」または発現生成物（例えば、RNA、ポリペプチド、タンパク質、もしくは酵素）を「コードする」配列は、発現された場合にその生成物の生成をもたらすヌクレオチド配列である。

【0032】

「タンパク質」、「ペプチド」または「ポリペプチド」は、2つ以上のアミノ酸の連続列を含む。本発明の好ましいペプチドは、配列番号2および/または配列番号4に示されるペプチド、ならびにその改変体およびフラグメントを包含する。

【0033】

「タンパク質配列」、「ペプチド配列」、または「ポリペプチド配列」または「アミノ酸配列」は、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチド中にある一連の2つ以上のアミノ酸を指す。

30

【0034】

本明細書において配列（核酸配列、アミノ酸配列など）の同一性とは、2以上の対比可能な配列の、互いに対する同一の配列（個々の核酸、アミノ酸など）の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が高い同一性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて相同性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、相同性と類似性とは同じ数値を示す。

40

【0035】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて算出される。あるいは、アミノ酸配列および塩基配列の同一性は、比較する2つの配列を整列させ、配

50

列全体に対する同一残基の割合を計算することによっても算出することができる。

【0036】

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n - 1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または下限としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本明細書において有用なフラグメントの長さは、そのフラグメントの基準となる全長タンパク質の機能のうち少なくとも1つの機能が保持されているかどうかによって決定され得る。

10

20

【0037】

本明細書において「単離された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

【0038】

本明細書において「精製された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。

30

【0039】

本明細書中で使用される用語「精製された」および「単離された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。

【0040】

本明細書において、「ストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC(saline-sodium citrate)溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムである)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。

40

50

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の同一性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の同一性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0041】

本明細書において「高度にストリンジェントな条件」は、核酸配列において高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そして多数のミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、限定されることはないが、代表的には、(1)0.0015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、65~68、(2)0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミド、42、(3)0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸ナトリウム、0.1%SDS、65~68、(4)0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、0.1%SDS、65~68、あるいは、(5)0.03M塩化ナトリウム、0.003Mクエン酸ナトリウム、0.1%SDS、65~68である。このような高度にストリンジェントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989); および Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach, IV, IRL Press Limited (Oxford, England). Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤)を、使用してもよい。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO₄またはSDS)、Ficoll、Denhardt溶液、超音波処理されたサケ精子DNA(または別の非相補的DNA)および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH6.8~7.4で実施されるが; 代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

【0042】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不

一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m (\text{ }) = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[Na^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の(グアニン+シトシン)塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致(ミスマッチ)に対して約1℃ずつ減少する。

【0043】

本明細書において「中程度にストリンジেন্টな条件」とは、「高度にストリンジেন্টな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジেন্টな条件」の例は、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、50~65℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37~50℃である。例として、0.015Mナトリウムイオン中、50℃の「中程度にストリンジেন্টな」条件は、約21%の不一致を許容する。

【0044】

約20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1MNaClにおける融解温度の適切な概算は、 $T_m = (1 \text{つの} A - T \text{塩基につき} 2 \text{ }) + (1 \text{つの} G - C \text{塩基対につき} 4 \text{ })$ によって提供される。なお、6xクエン酸ナトリウム塩(SSC)におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである(Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683頁、BrownおよびFox(編)(1981)を参照のこと)。

【0045】

配列番号2および/または配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントなどのタンパク質をコードする天然の核酸は、例えば、配列番号1および/または配列番号3の核酸配列の一部またはその改変体を含むPCRプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを有するcDNAライブラリーから容易に分離される。配列番号2および/または配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸は、本質的に1%ウシ血清アルブミン(BSA)；500mMリン酸ナトリウム($NaPO_4$)；1mMEDTA；42℃の温度で7%SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に2xSSC(600mMNaCl；60mMクエン酸ナトリウム)；50℃の0.1%SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジेंट条件下、さらに好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン(BSA)；500mMリン酸ナトリウム($NaPO_4$)；15%ホルムアミド；1mMEDTA；7%SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に50℃の1xSSC(300mMNaCl；30mMクエン酸ナトリウム)；1%SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジेंट条件下、最も好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン(BSA)；200mMリン酸ナトリウム($NaPO_4$)；15%ホルムアミド；1mMEDTA；7%SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に65℃の0.5xSSC(150mMNaCl；15mMクエン酸ナトリウム)；0.1%SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジेंट条件下に配列番号1および/または配列番号3に示す配列またはその一部とハイブリダイズし得る。

【0046】

本明細書において配列(アミノ酸または核酸など)の「同一性」、「相同性」および「類似性」のパーセンテージは、比較ウィンドウで最適な状態に整列された配列2つを比較

10

20

30

40

50

することによって求められる。ここで、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の比較ウィンドウ内の部分には、2つの配列の最適なアライメントについての基準配列（他の配列に付加が含まれていればギャップが生じることもあるが、ここでの基準配列は付加も欠失もないものとする）と比較したときに、付加または欠失（すなわちギャップ）が含まれる場合がある。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基がどちらの配列にも認められる位置の数を求めることによって、マッチ位置の数を求め、マッチ位置の数を比較ウィンドウ内の総位置数で割り、得られた結果に100を掛けて同一性のパーセンテージを算出する。検索において使用される場合、相同性については、従来技術において周知のさまざまな配列比較アルゴリズムおよびプログラムの中から、適当なものを用いて評価する。このようなアルゴリズムおよびプログラムとしては、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALW（Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410、Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680、Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410、Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272）があげられるが、何らこれに限定されるものではない。特に好ましい実施形態では、従来技術において周知のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)（たとえば、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410、Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272、Altschul et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402を参照のこと）を用いてタンパク質および核酸配列の相同性を評価する。特に、5つの専用BLASTプログラムを用いて以下の作業を実施することによって比較または検索が達成され得る。

【0047】

- (1) BLASTPおよびBLAST3でアミノ酸のクエリー配列をタンパク質配列データベースと比較；
- (2) BLASTNでヌクレオチドのクエリー配列をヌクレオチド配列データベースと比較；
- (3) BLASTXでヌクレオチドのクエリー配列（両方の鎖）を6つの読み枠で変換した概念的翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較；
- (4) TBLASTNでタンパク質のクエリー配列を6つの読み枠（両方の鎖）すべてで変換したヌクレオチド配列データベースと比較；
- (5) TBLASTXでヌクレオチドのクエリー配列を6つの読み枠で変換したものを、6つの読み枠で変換したヌクレオチド配列データベースと比較。

【0048】

BLASTプログラムは、アミノ酸のクエリー配列または核酸のクエリー配列と、好ましくはタンパク質配列データベースまたは核酸配列データベースから得られた被検配列との間で、「ハイスコアセグメント対」と呼ばれる類似のセグメントを特定することによって相同配列を同定するものである。ハイスコアセグメント対は、多くのものが従来技術において周知のスコアリングマトリックスによって同定（すなわち整列化）されると好ましい。好ましくは、スコアリングマトリックスとしてBLOSUM62マトリックス（Gonnet et al., 1992, Science 256:1443-1445、Henikoff and Henikoff, 1993, Proteins 17:49-61）を使用する。このマトリックスほど好ましいものではないが、PAMまたはPAM250マトリックスも使用できる（たとえば、Schwartz and Dayhoff

10

20

30

40

50

, eds., 1978, *Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundationを参照のこと)。BLASTプログラムは、同定されたすべてのハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価し、好ましくはユーザー固有の相同率などのユーザーが独自に定める有意性の閾値レベルを満たすセグメントを選択する。統計的な有意性を求めるKarlinの式を用いてハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価すると好ましい(Karlin and Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2267-2268参照のこと)。

10

【0049】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子(例えば、DNAまたはRNAなど)が用いられ得る。

【0050】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、16の連続するヌクレオチド長の、17の連続するヌクレオチド長の、18の連続するヌクレオチド長の、19の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プライマーとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、最も好ましくは95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成(増幅)が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム(例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTAR)を用いて行ってもよい。

20

30

【0051】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能(例えば、ポリアミンの輸送活性など)が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

40

【0052】

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F.M. (1987). *Current Protoco*

50

ls in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分(全部であり得る)が参考として援用される。

【0053】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

【0054】

本明細書において核酸の存在を確認するには、放射能法、蛍光法、ノーザンプロット法、ドットプロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価され得る。

【0055】

「抗体」は、抗体およびそのフラグメント(好ましくは、抗原結合フラグメント)を包含するが、これらに限定されない。この用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、Fab抗体フラグメント、F(ab)₂抗体フラグメント、Fv抗

体フラグメント（例えば、 V_H または V_L ）、単鎖Fv抗体フラグメント、およびdsFv抗体フラグメントを包含する。さらに、本発明の抗体分子は、完全ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ニワトリ抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体であり得る。本発明の抗体は、配列番号2および/または配列番号4のアミノ酸配列、ならびに/あるいは、これら配列のフラグメントからなるポリペプチドに、特異的に反応する。

【0056】

本発明の遺伝子は、siRNAを用いてその発現をノックダウン（抑制）することが可能である。所定の遺伝子からsiRNAを調製する方法は周知であり、例えば、当該分野で公知のsiRNA提供者（例えば、株式会社 ニッポンイージーティー、富山、日本）により、アニーリングしている2本鎖の合成siRNAを入手することができる。その合成siRNAをRNAseフリーの溶液に溶解し、最終濃度が20 μ Mになるように調整し、その後細胞へ導入する。siRNAを調製する場合には、例えば、(1)GまたはCが連続して4つ以上存在しない、(2)AまたはTが連続して4つ以上存在しない、(3)GあるいはCが9塩基以上存在しない、などの条件を加えてもよい。本発明のsiRNAは、19塩基長、20塩基長、21塩基長、22塩基長、23塩基長、24塩基長、25塩基長、26塩基長、27塩基長、28塩基長、29塩基長、または30塩基長である。本発明のsiRNAは、好ましくは、19塩基長である。本発明のsiRNAはまた、好ましくは20塩基長である。本発明のsiRNAはまた、好ましくは21塩基長である。本発明のsiRNAはまた、好ましくは22塩基長である。本発明のsiRNAはまた、好ましくは23塩基長である。本発明のsiRNAはまた、好ましくは24塩基長である。

10

20

【0057】

用語「発現する」および「発現」は、遺伝子、RNA配列もしくはDNA配列中の情報が明らかになるのを可能にすることまたはそれを引き起こすこと（例えば、対応する遺伝子の転写および翻訳に関与する細胞機能を活性化することによって、タンパク質を生成すること）を意味する。DNA配列は、細胞中または細胞によって、「発現生成物」（例えば、RNA（例えば、mRNA）またはタンパク質）を形成するように発現される。その発現生成物自体はまた、その細胞によって「発現される」と言われ得る。

【0058】

用語「形質転換」とは、核酸を細胞中に導入することを意味する。導入される遺伝子または配列は、「クローン」と呼ばれ得る。その導入されるDNAまたはRNAを受ける宿主細胞は、「形質転換」されており、これは、「形質転換体」または「クローン」である。宿主細胞に導入されるDNAまたはRNAは、任意の供給源由来であり得、宿主細胞と同じ属または種の細胞由来であっても、異なる属または種の細胞由来であってもよい。

30

【0059】

用語「ベクター」は、宿主を形質転換し、必要に応じて導入された配列の発現および/または複製を促進するように、DNA配列またはRNA配列が宿主細胞中に導入され得る媒体（例えば、プラスミド）を包含する。

【0060】

本発明において使用され得るベクターとしては、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組込み可能なDNAフラグメント、および宿主ゲノム中への核酸の導入を促進し得る他の媒体が挙げられる。プラスミドは、最も一般的に使用される形態のベクターであるが、同様の機能を提供しかつ当該分野で公知であるかまたは公知となる他のすべての形態のベクターが、本明細書中で野使用のために適切である。例えば、Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 and Supplements, Elsevier, N.Y.およびRodriguezら、(編), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses 1988, Butterworth, Boston, MAを参照のこと。

40

50

【0061】

用語「発現系」とは、適切な条件下で、そのベクターにより保有されて宿主細胞中に導入されるタンパク質または核酸を発現し得る、宿主細胞および適合性ベクターを意味する。一般的な発現系としては、E. coli 宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳動物宿主細胞およびベクターが挙げられる。

【0062】

本発明の配列番号2および/または配列番号4に記載のポリペプチドをコードする核酸の発現は、好ましくは真核生物細胞において従来の方法によって実行され得る。核酸を発現するために適切な宿主細胞としては、高等真核生物が挙げられ、動物細胞（非哺乳動物起源（例えば、昆虫細胞）および哺乳動物起源（例えば、ヒト、霊長類、および齧歯類）の両方の動物細胞）由来の樹立された組織培養細胞株を包含する。

10

【0063】

高等真核生物組織培養細胞もまた、本発明の配列番号2および/または配列番号4に記載のポリペプチド（あるいは、その改変体）の組換え生成のために使用され得る。任意の高等真核生物組織培養細胞株（昆虫バキュロウイルス発現系が挙げられる）が使用され得るが、哺乳動物細胞が、好ましい。このような細胞の形質転換、トランスフェクションおよび増殖は、慣用的手順となっている。有用な細胞株の例としては、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、J774細胞、Caco2細胞、ラット乳児腎臓（BRK）細胞株、昆虫細胞株、鳥類細胞株、およびサル（COS）細胞株が挙げられる。そのような細胞株のための発現ベクターは、通常は、複製起点、プロモーター、翻訳開始部位、RNAスプライス部位（ゲノムDNAが使用される場合）、ポリアデニル化部位、および転写終結部位を含む。これらのベクターはまた、通常は、選択遺伝子または増幅遺伝子を含む。適切な発現ベクターは、例えば、アデノウイルス、SV40、バルボウイルス、ワクシニアウイルス、またはサイトメガロウイルスのような供給源に由来するプロモーターを保有する、プラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスであり得る。発現ベクターの例としては、pCR（登録商標）3.1、pCDNA1、pCD（Okayamaら、（1985）Mol. Cell Biol. 5:1136）、pMC1neo Poly-A（Thomasら、（1987）Cell 51:503）、pREP8、pSVSPORTおよびそれらの誘導体、ならびにバキュロウイルスベクター（例えば、pAC373またはpAC610）が挙げられる。

20

30

【0064】

本発明の人工膜を調製する場合、宿主細胞において本発明の配列番号2および/または配列番号4に記載のポリペプチド（あるいは、その改変体）を組換え発現させ、その宿主細胞から膜画分を単離して人工膜を調製してもよい。

【0065】

本発明はまた、本発明の配列番号2および/または配列番号4に記載のポリペプチドおよび配列番号1および/または配列番号3に記載のポリヌクレオチドと、第2ポリペプチド部分もしくは第2ポリヌクレオチド部分（「タグ」と呼ばれ得る）とを含む、融合物を包含する。本発明の融合ポリペプチドは、例えば、本発明のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを、発現ベクター中に挿入することによって、簡便に構築され得る。本発明の融合物は、精製または検出を容易するタグを含み得る。そのようなタグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、ヘキサヒスチジン（His6）タグ、マルトース結合タンパク質（MBP）タグ、赤血球凝集素（HA）タグ、セルロース結合タンパク質（CBP）タグ、およびmycタグが挙げられる。検出可能なタグ（例えば、³²P、³⁵S、³H、^{99m}Tc、¹²³I、¹¹¹In、⁶⁸Ga、¹⁸F、¹²⁵I、¹³¹I、^{113m}In、⁷⁶Br、⁶⁷Ga、^{99m}Tc、¹²³I、¹¹¹Inおよび⁶⁸Ga）もまた、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを標識するために使用され得る。このような融合物を構築および使用するための方法は、当該分野で周知である。

40

50

【0066】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

【0067】

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、A
u s u b e l F . A . ら編(1988)、Current Protocols in
M o l e c u l a r B i o l o g y , W i l e y , N e w Y o r k , N Y ; S a m
b r o o k J ら(1987) Molecular Cloning: A Labora
t o r y M a n u a l , 2 n d E d . およびその第三版, Cold Spring
H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b
o r , N Y、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

10

【0068】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など(例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法など)が挙げられる。

20

【0069】

(ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤のスクリーニング法)

本発明のタンパク質を使用する種々の方法によって、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングすることが可能である。例えば、

(a) リポソームにATPase(例えば、液胞型ATPase、 F_0F_1 -ATPase、および/または、 H/K -ATPase)と本発明の膜タンパク質を再構成し、

(b) そのリポソームに(1)放射性標識したポリアミンのみ、(2)放射性標識したポリアミンと候補薬剤をそれぞれ添加してインキュベートし、

30

(c) リポソームを遠心して沈澱させるか、または、リポソームを遠心カラムで分離させるなどして、リポソームを分離し、(1)の場合と(2)の場合とで、そのリポソームに取り込まれた放射性標識ポリアミンの量を比較し、

(d) その候補薬剤がポリアミン輸送活性に影響を与えたか否かを決定する

ことによって、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングすることが可能である。

【0070】

あるいは、ATPaseによって生成される H^+ 濃度勾配に依存することなく、ポリアミン添加時に H^+ 濃度勾配を形成してもよい。例えば、以下の(I)~(II)が可能である：

40

(I)

(a) リポソームに本発明の膜タンパク質を再構成し、その際に、リポソームの内側を酸性にする、

(b) そのリポソームに、アルカリ条件で(1)放射性標識したポリアミンのみ、(2)放射性標識したポリアミンと候補薬剤をそれぞれ添加してインキュベートし、

(c) リポソームを遠心して沈澱させるか、または、リポソームを遠心カラムで分離させるなどして、リポソームを分離し、(1)の場合と(2)の場合とで、そのリポソームに取り込まれた放射性標識ポリアミンの量を比較し、

(d) その候補薬剤がポリアミン輸送活性に影響を与えたか否かを決定する

50

ことによって、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングする；

(I I)

(a) リポソームに本発明の膜タンパク質を再構成し、その際に、リポソームの内側を酸性～中性にする、

(b) そのリポソームに、リポソーム内部の pH と比較して、よりアルカリ条件で (1) 放射性標識したポリアミンのみ、(2) 放射性標識したポリアミンと候補薬剤をそれぞれ添加してインキュベートし、

(c) リポソームを遠心して沈澱させるか、または、リポソームを遠心カラムで分離させるなどして、リポソームを分離し、(1) の場合と (2) の場合とで、そのリポソームに取り込まれた放射性標識ポリアミンの量を比較し、

(d) その候補薬剤がポリアミン輸送活性に影響を与えたか否かを決定する

ことによって、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングする。

【 0 0 7 1 】

あるいは、

(a) 本発明の膜タンパク質を発現する細胞を調製し (例えば、本発明の遺伝子を用いて形質転換する) 、

(b) その細胞に、(1) 放射性標識したポリアミンのみ、(2) 放射性標識したポリアミンと候補薬剤をそれぞれ添加してインキュベートし、

(c) 細胞を破壊し、膜画分を調製し、(1) の場合と (2) の場合とで、膜画分に存在する放射性標識ポリアミンの量を比較し、

(d) その候補薬剤がポリアミン輸送活性に影響を与えたか否かを決定する

ことによって、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングすることが可能である。

【 0 0 7 2 】

あるいは、

(a) 本発明の膜タンパク質を発現する細胞 (例えば、本発明の遺伝子を用いて形質転換した細胞) から、天然膜または膜小胞を調製し、

(b) その天然膜または膜小胞に、(1) 放射性標識したポリアミンのみ、(2) 放射性標識したポリアミンと候補薬剤をそれぞれ添加してインキュベートし、

(c) インキュベートした溶液から天然膜または膜小胞を単離し、単離された天然膜または膜小胞について、(1) の場合と (2) の場合とで、放射性標識ポリアミンの量を比較し、

(d) その候補薬剤がポリアミン輸送活性に影響を与えたか否かを決定する

ことによって、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングすることが可能である。

【 0 0 7 3 】

リポソームの分離は、上記に記載の遠心分離、および、カラムによる分離以外に、フィルトレーションによる分離を用いてもよい。

【 0 0 7 4 】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、請求の範囲によってのみ限定される。

【 実施例 】

【 0 0 7 5 】

(実施例 1 : ポリアミントランスポーター候補遺伝子のクローニングおよび大量発現系の構築)

小胞型ポリアミントランスポーターは、従来報告されていない。本発明の発明者らは、SLC18型トランスポーターファミリーの各遺伝子をクローニングし、その、各々についてポリアミン輸送活性を検討した。試行錯誤の結果、SLC18B1がポリアミントランスポーターであることを、本発明の発明者らは見出し、本発明を完成させた。

10

20

30

40

50

種々の生物種由来の S L C 1 8 B 1 タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを図 1 に示す。S L C 1 8 B 1 遺伝子は動物界に広く存在する遺伝子であることから、動物の生存に必須であると考えられる。図 1 の「*」は、動物種に拘わらず保存されているアミノ酸残基を、網掛けは、推定膜貫通領域を示す。

【 0 0 7 6 】

本発明の小胞型ポリアミノトランスポーター (V P A T) (S L C 1 8 B 1) と、S L C 1 8 型トランスポーターファミリーの属する他のトランスポーターのアミノ酸配列のアラインメントを図 2 に示す。図 2 の図 1 の「*」は、種々のトランスポーターで保存されているアミノ酸残基を、網掛けは、推定膜貫通領域を示す。

【 0 0 7 7 】

S L C 1 8 型トランスポーターファミリーに属する公知のアミノトランスポーターは、いずれもモノアミンを輸送するトランスポーターである。そのため、ポリアミノトランスポーターが、従来公知のモノアミノトランスポーターとは異なり、かつ、S L C 1 8 型トランスポーターファミリーに属することは、予想外の結果であった (実際大腸菌や酵母、植物のポリアミノトランスポーターは A B C 型や S L C 2、6、7 型であり、S L C 1 8 型に属するものはない) 。

【 0 0 7 8 】

クローニングの詳細は、以下のとおりである。なお、以下、本発明のポリアミノトランスポーターを「 V P A T 」とも記載する。

【 0 0 7 9 】

ヒト V P A T c D N A のクローニングには 5 ' - c a c c a t g g a g g c g c t g g g t g a c - 3 ' (配列番号 5) と 5 ' - a c t a g g t t t c a t t a g g c a a g a g - 3 ' (配列番号 6) との配列からなるプライマーを用いた。またマウス V P A T c D N A のクローニングには 5 ' - C A C C a t g g a c g a g g c g g g c t c c c c - 3 ' (配列番号 7) と 5 ' - c t a g g t g t c a t t g g g c a a g a - 3 ' (配列番号 8) との配列からなるプライマーを用いた。クローニングした c D N A について、以下のとおり、インビトロジェン社の Gateway system を用いて、昆虫細胞用大量発現システムを構築した。エンターベクター (p E N T R) にヒトおよびマウスの V P A T c D N A を P C R 法で組み込み、昆虫細胞用大量発現システムを構築した。その後、L R 組換えにより、エンターベクターから p D E S T 1 0 発現ベクターに組み換えた。このプラスミドをバキュロウイルスゲノムを内包する D H 1 0 B a c 細胞にヒートショック法によって導入し、バクミドを得た。L B 培地 (5 0 μ g / m L カナマイシン、7 μ g / m L ゲンタマイシン、1 0 μ g / m L テトラサイクリン) で一晚培養後、ミニプレップ法によって V P A T c D N A を持つバクミドを回収した。得られたバクミド - は P C R 法にて確認した。

【 0 0 8 0 】

ウイルスは B a c - t o - B a c B a c u l o v i r u s E x p r e s s i o n S y s t e m (インビトロジェン社) を用いて作製した。まず S f 9 細胞を、3 . 5 c m のプレートあたり、細胞数が 9×10^5 になるように播種した。細胞がプレートに定着後、培地を G r a c e ' s I n s e c t M e d i u m + 0 . 3 5 m g / m L N a H C O ₃ に交換した。バクミド 1 μ g と C e l l f e c t i n 6 μ L を用い、リポフェクション法にてトランスフェクションした。インキュベーション後、C o m p l e t e T M N - F H 培地に交換し、感染兆候が見られるまで数日培養した。感染兆候が見られた後に培地を回収し、これを P 1 ウイルスとした。P 1 ウイルスに V P A T c D N A が組み込まれていることを、P C R 法にて確認した。

【 0 0 8 1 】

(実施例 2 : 小胞型ポリアミノトランスポーター (V P A T) の精製)

H i g h F i v e 細胞にウイルスを感染 (M . O . I . = 2) させ、E x p r e s s F i v e S F M (1 6 m M L - グルタミン) 培地に交換後、2 7 で培養した。4 8 時間後、細胞を回収した。これを D i s r u p t i o n b u f f e r (2 0 m M T r

10

20

30

40

50

is / HCl pH 8.0、100 mM 酢酸ナトリウム、10%グリセロール、0.5 mM DTT、10 µg/mL ロイペプチン、10 µg/mL ペプスタチンA)で懸濁し、超音波処理により細胞を破碎した。この上清を回収し、超遠心して、得られた沈澱物を膜画分とした。この膜画分をオクチルグルコシドで可溶化し、1 mLのNi-NTA super flow レジン(QIAGEN)に吸着させた。その後、60 mMのイミダゾールを含む溶出液(20 mM MOPS / Tris pH 7.0、1%オクチルグルコシド、20%グリセロール)でVPATを溶出し、VPATを精製した。

【0082】

(実施例3: VPAT抗原ペプチドと抗体の作製)

マウスのVPAT cDNAのC末領域(429-EDSTARRRRSKAQNSLG TEEERAA LLPNDT-457、配列番号9)をGST融合タンパク質発現用ベクターであるpGEX4T2(GEヘルスケア)に組み込み、pGEX4T2-VPATとした。同様に、ヒトVPAT N末領域(1-MEALGDLEGPRAPGGDDPA GSAGETPGWLSREQVFVLSAASVNLGSMCMCYSLGPFPP KEAEKKGASNT-70、配列番号10)を発現するベクターを作製した。

10

【0083】

大腸菌C-43株にヒートショック法によりpGEX4T2-VPATを導入し、IPTGにより、タンパク質発現を誘導した。この細胞を遠心操作で回収し、超音波処理により破菌した。終濃度が1%となるようにTriton X-100を加え、氷上で5分間放置し、可溶化した。遠心後の上清から、Glutathione Sepharose 4Bレジン(GE Healthcare)を用いて、抗原タンパク質を精製した。

20

【0084】

(実施例4: VPATの発現パターン)

(1. 各組織におけるVPATの発現)

ヒトおよびマウスVPAT遺伝子の各組織での発現をリアルタイムPCR法で解析した。ヒトVPAT遺伝子の増幅には、核酸配列5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'からなるFwプライマー(配列番号11)と、核酸配列5'-TG GTGAAGACGCCAGTGG A-3'からなるRvプライマー(配列番号12)とを用いた。マウスVPAT遺伝子の増幅には、核酸配列5'-TCGAGTGGGCAGCAGCTATG-3'からなるFwプライマー(配列番号13)と、核酸配列5'-CCAGAGCTCTCAAGGCTAGGTGTC-3'(配列番号14)からなるRvプライマーを用いた。

30

【0085】

コントロールとしてG3PDH遺伝子を用いた: ヒトFwプライマー: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'(配列番号15)、ヒトRvプライマー: 5'-TG GTGAAGACGCCAGTGG A-3'(配列番号16)、マウスFwプライマー: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'(配列番号17)、マウスRvプライマー: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'(配列番号18)。

【0086】

ヒトまたはマウスの各組織の全RNA 1 µgをTAKARA PrimeScript RT Master Mixキットを用いて37、15分間反応し、その後85で5秒間加熱してcDNAを得た。このcDNAをTAKARA SYBR Premix Ex Tqq IIキットと上記プライマーを用いてリアルタイムPCR反応を行った。PCR反応は95、30秒間のプレヒートの後、95 5秒間、60 30秒間のサイクルを35回繰り返した。

40

【0087】

ヒトについての結果を、図3に示す。VPAT遺伝子は、ポリアミンの分泌に関与する分泌小胞が多数存在する組織である脳および副腎に加え、精巣、肺、腎臓、胎盤などに多く発現していた。マウスを用いた場合も、同様の結果が得られた(図4)。

【0088】

50

(2 . 肺および腎臓における V P A T の発現)

抗マウス V P A T 抗体を用い、肺および腎臓における V P A T タンパク質の分布について実験をした。結果を図 5 に示す。図 5 の A は、肺の気管支周辺についての結果である。図 5 の B は、肺胞についての結果である。図 5 の C は、腎臓の皮質についての結果である。図 5 の D は、腎臓の髄質についての結果である。図 5 の A (肺の気管支周辺) において、C C はクララ細胞を示し、C は繊毛細胞を示し、そして、B T は気管支を示す。図 5 の B (肺胞) において、T 1 は 1 型肺胞細胞を示し、そして、T 2 は 2 型肺胞細胞を示す。図 5 の C (腎臓の皮質) において、G は系球体を示し、P T は腎近位尿細管を示し、そして、D T は腎遠位尿細管を示す。図 5 の D (腎臓の髄質) において、D T は腎遠位尿細管を示し、そして、C D は集合管を示す。

10

【 0 0 8 9 】

V P A T は特に集合管に多く発現していた。また、V P A T は、肺において、2 型肺胞細胞およびクララ細胞で発現していた。写真中の白棒は、1 0 μ m を示す。

【 0 0 9 0 】

(3 . 脳における V P A T の発現)

抗マウス V P A T 抗体を用い、脳における小胞型ポリアミントランスポーター (V P A T) の局在について実験をした。結果を図 6 に示す。

【 0 0 9 1 】

図中、dentate gyrus は海馬歯状回を C A 2 は海馬 C A 2 領域を、C o r t e x は大脳皮質を示す。左列はマウスの V P A T 抗体を用いた実験を、中列の G F A P (G l i a F i b r i l l a r y A c i d i c P r o t e i n) はアストロサイトのマーカータンパク質の抗体を用いた結果を示す。右端の「merge」は左端と中央列の写真を重ね合わせた結果を示す。抗 G F A P 抗体は、脳アストロサイトの位置を示す。写真中の白棒は、1 0 μ m を示す。

20

【 0 0 9 2 】

これらの結果から、(1) 小胞型ポリアミントランスポーターは、脳アストロサイトに強く発現すること、および、(2) 小胞型ポリアミントランスポーターは、アストロサイト以外の部分にも発現すること、が示された。

【 0 0 9 3 】

次に、ラット海馬より単離した初代培養ラット海馬アストロサイトおよび初代培養ラット海馬神経細胞での V P A T の発現を調べた。結果を図 7 に示す。写真中の白棒は、1 0 μ m を示す。図 7 の A は初代培養ラット海馬アストロサイトでの結果を示し、図 7 の B は初代培養ラット海馬神経細胞での結果を示す。図 7 の結果は V P A T がアストロサイトと一部の神経細胞に発現している事を示している。

30

【 0 0 9 4 】

(4 . 肥満細胞における V P A T の発現)

免疫染色法により、マウス肥満細胞での V P A T の発現を調べた。結果を図 8 に示す。写真中の白棒は、1 0 μ m を示す。上段左は抗 V P A T 抗体による免疫染色の結果を、下段左はコントロール血清を用いた免疫染色の結果を示す。上段中央は、上段左で示した細胞の微分干渉顕微鏡による写真であり、上段右は、上段中央の写真に上段左の結果を重ねた写真である。下段中央は、下段左で示した細胞の微分干渉顕微鏡による写真であり、下段右は、下段中央の写真に下段左の結果を重ねた写真である。図 8 の結果に示されるように、肥満細胞の顆粒において V P A T の発現が見られた。これに対して、コントロールの血清では反応が見られなかった。肥満細胞はヒスタミンを分泌する免疫応答細胞であり、V P A T がヒスタミン輸送を介して免疫反応にも関わっている事を示している。

40

【 0 0 9 5 】

(実施例 5 : 小胞型ポリアミントランスポーター (V P A T) の再構成と活性の測定)

(1 . スペルミン輸送のタイムコース)

精製した V P A T 5 0 μ g 、リポソーム 5 5 0 μ g 、F₀F₁-ATPase 9 0 μ g を混合し、- 8 0 °C にて 1 5 分静置して凍結した。迅速に解凍し、R e c o n s t i

50

tution Buffer [20 mM MOPS / Tris pH 7.0、100 mM KCl、10 mM 酢酸マグネシウム]にて30倍に希釈し、超遠心(200,000 × g、1時間、4℃)した。沈澱物にReconstitution Buffer 200 μLを加え懸濁し、再構成プロテオリソームを得た。

【0096】

反応液[20 mM MOPS / Tris pH 7.0、100 mM KCl、10 mM 酢酸マグネシウム]に作製した再構成プロテオリソームを1.5 μg加えて、27℃水浴において2分間インキュベートした。これに終濃度5 mMのATPを加えてさらに27℃、2分間インキュベートした。これに終濃度10 μMのterminal methylene-³H スペルミン(American Radiolabeled Chemicals Inc. 18.5 MBq/μmol)を加えて反応を開始した。このとき全量が150 μLとなるようにした。ここから130 μL分取し、Sephadex G-50 fine スピカラム(GEヘルスケア)にアプライし、遠心(700 × g、2分、4℃)した。その溶出液をクリアゾル 3 mLに混ぜ、中に含まれる放射能(リポソーム内に取り込まれた基質の量に相当する)を液体シンチレーションカウンターにより計測した。その結果を図9のAに示す。小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT)によるポリアミン輸送は、ATPによって促進された。この結果は、小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT)によるポリアミンの輸送が、人工膜上に存在するH⁺ポンプ(F₀F₁-ATPase)がATPを消費して形成するH⁺濃度勾配を利用したこと、すなわち、小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT)がH⁺とポリアミン(スペルミン)を対向輸送で小胞内に輸送したことを示す(図9のB)。

10

20

【0097】

上記と同様に、マウスVPATポリペプチドとF₀F₁-ATPaseとを再構成した人工膜内へのポリアミン(スペルミン)の輸送活性を測定する実験を、VPAT(SLC18B1)を含まないコントロールおよびATPを含まないコントロールを用いて行った。結果を図10のAに示す。「Complete」はVPATおよびATPを含む場合、「-ATP」はATPを含まない場合、「-SLC18B1 + ATP」はVPAT(SLC18B1)を含まないリポソームを用いた場合の結果である。

【0098】

(2. スペルミン濃度依存性)

図10のAの「Complete」(すなわち、VPATおよびATPを含む場合)において、スペルミン濃度を变化させて輸送活性を測定した結果を図10のBに示す。K_mは94 μMであり、V_{max}は8.6 nmol/min/mgであった。

30

【0099】

(3. スペルミン輸送の駆動力)

図10のAの「Complete」(すなわち、VPATおよびATPを含む場合)において、スペルミン輸送はH⁺濃度勾配を破壊するナイジェリシン(Nigericin)の添加によって阻害された。一方、膜電位を消失させるバリノマイシン(Valinomycin)では変化しなかった。また、ナイジェリシンとバリノマイシンを添加した場合(Nig + Val)でも輸送活性は阻害された(図10のC)。この事はVPATがH⁺の濃度勾配を駆動力とするH⁺/ポリアミン対向輸送体である事を示している。

40

【0100】

(4. pH勾配によるスペルミン輸送)

F₀F₁-ATPaseを組み込むことなく、VPATのみをリポソームに組み込み、リポソームの内側を酸性に、外側をアルカリ性(pH 8.0)にして、スペルミンの輸送活性を測定した。その結果、図10のDに示すように、スペルミンの輸送活性が観察された。この結果はVPATがH⁺の濃度勾配を駆動力とするH⁺/ポリアミン対向輸送体である事を示す

(5. スペルミン輸送のタイムコース)

上記の「1. スペルミン輸送のタイムコース」と同様の実験を、スペルミンをスペルミ

50

ジンに代えて行った。図10のEに示される結果から明らかなように、VPATはスペルミンと同様にスペルミジンを輸送する。

【0101】

(6. スペルミジン濃度依存性)

上記の「2. スペルミン濃度依存性」と同様の実験を、スペルミンをスペルミジンに代えて行った。図10のFに示される結果から明らかなように、VPATはスペルミンと同様の濃度依存性でスペルミジンを輸送する。Kmは4.2mMであり、Vmaxは170nmol/min/mgであった。

【0102】

(7. スペルミジン輸送の駆動力)

上記の「3. スペルミン輸送の駆動力」と同様の実験を、スペルミンをスペルミジンに代えて行った。図10のGに示される結果から明らかなように、VPATはスペルミンと同様にスペルミジンの輸送においても、H⁺の濃度勾配を駆動力とするH⁺/ポリアミン対向輸送体である。

【0103】

(実施例6: 小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT)の輸送活性の阻害)

実施例5と同様に、VPATとF₀F₁-ATPaseとを再構成した人工膜に、(1) F₀F₁-ATPaseなしのリポソーム(F-ATPase)、(2) 1μM レゼルピン(Reserpine)、(3) 1μM テトラベナジン(Tetrabenazine)、(4) 1mM スペルミン(Spermine)、(5) 1mM アグマチン(Agmatine)、(6) 1mM ドーパミン(Dopamine)、または、(7) 1mM アセチルコリン(Acetylcholine)を添加することによる輸送活性の阻害を測定した。結果を図7に示す。縦軸は、人工膜内に輸送された放射性スペルミンの量を、上記(1)~(7)を添加しなかった場合(No Addition)の相対値として示す。非放射性スペルミンを大過剰添加したコントロール(4)では、放射性スペルミンの輸送がほぼ完全に阻害された。ATPを分解し、H⁺を輸送するF₀F₁-ATPaseを含まないリポソームでは放射性スペルミンの輸送が見られなかった結果は(1)、ポリアミンの輸送が、H⁺との対向輸送であることを支持する。小胞型モノアミントランスポーター(VMAT)阻害剤であるレゼルピン(2)またはテトラベナジン(3)を添加しても、ポリアミントランスポーターの輸送活性は、完全には阻害されなかった。このことは、ポリアミントランスポーターが、小胞型モノアミントランスポーター(VMAT)とは異なる性質を有することを示す。また、ドーパミン(6)は小胞型モノアミントランスポーター(VMAT)の基質であり、アセチルコリン(7)は小胞型アセチルコリントランスポーター(VAChT)の基質であるが、これらが大過剰に添加しても、ポリアミントランスポーターの輸送活性が阻害されなかったことは、ポリアミントランスポーターの基質が、小胞型モノアミントランスポーター(VMAT)とも、小胞型アセチルコリントランスポーター(VAChT)とも異なることを示す。

【0104】

(実施例7: VPATの基質特異性)

精製したVPAT、VMAT2、VAChTをリポソームに組み込み、スペルミン、スペルミジン、セロトニン、アセチルコリンの輸送を測定した。ポリアミン(スペルミン、スペルミジン)はVPATのみが輸送した。一方、いずれのトランスポーターもセロトニンを輸送した。アセチルコリンはVAChTによってのみ運ばれた。結果を、VPATによるスペルミンの輸送活性との相対値として図12に示す。「N.D.」は検出限界以下であることを示す。この結果はVPATがポリアミンだけでなく、モノアミン類が関わる化学伝達にも重要である事を示している。

【0105】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的

10

20

30

40

50

な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

【0106】

本発明に従って、ポリアミン輸送を担うトランスポーターおよびそれをコードする遺伝子が同定された。本発明に従って、そのようなトランスポーターを含む人工膜を用いる、トランスポーターの活性調節剤のスクリーニング法が提供される。さらに、そのようなスクリーニング法によって、ポリアミン代謝が関与する疾患の予防剤・治療剤の候補物質をスクリーニングする方法およびそのような候補物質もまた、提供される。

10

【配列表フリーテキスト】

【0107】

配列番号1は、ヒトポリアミントランスポーターの核酸配列である。

【0108】

配列番号2は、ヒトポリアミントランスポーターのアミノ酸配列である。

【0109】

配列番号3は、マウスポリアミントランスポーターの核酸配列である。

【0110】

配列番号4は、マウスポリアミントランスポーターのアミノ酸配列である。

20

【0111】

配列番号5は、ヒトポリアミントランスポーターのクローニングに使用したFwプライマーの核酸配列である。

【0112】

配列番号6は、ヒトポリアミントランスポーターのクローニングに使用したRvプライマーの核酸配列である。

【0113】

配列番号7は、マウスポリアミントランスポーターのクローニングに使用したFwプライマーの核酸配列である。

【0114】

配列番号8は、マウスポリアミントランスポーターのクローニングに使用したRvプライマーの核酸配列である。

30

【0115】

配列番号9は、マウスのVPATのC末領域の配列である。

【0116】

配列番号10は、マウスのVPATのN末領域の配列である。

【0117】

配列番号11は、ヒトVPAT遺伝子 Fwプライマーの配列である。

【0118】

配列番号12は、ヒトVPAT遺伝子 Rvプライマーの配列である。

40

【0119】

配列番号13は、マウスVPAT遺伝子 Fwプライマーの配列である。

【0120】

配列番号14は、マウスVPAT遺伝子 Rvプライマーの配列である。

【0121】

配列番号15は、ヒトG3PDH遺伝子 Fwプライマーの配列である。

【0122】

配列番号16は、ヒトG3PDH遺伝子 Rvプライマーの配列である。

【0123】

配列番号17は、マウスG3PDH遺伝子 Fwプライマーの配列である。

50

【 0 1 2 4 】

配列番号 1 8 は、マウス G 3 P D H 遺伝子 R v プライマーの配列である。

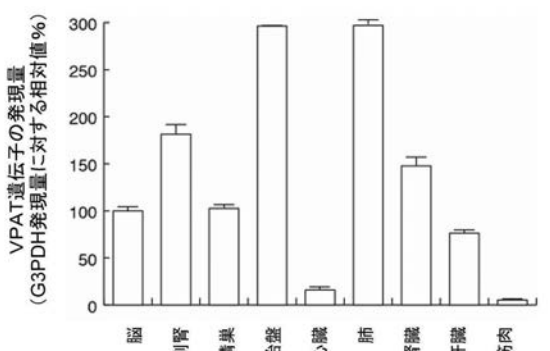
【 図 1 】

Human	MEALG-----DLFGPRAP-----GGDDPAGSGAPGRLS	30
Mouse	M-----DEAGSPAPAGTGGGGPDSGTSRRLS	30
Rat	M-----DTAGSPAPAGTGGGGPDSGTSRRLS	30
Chicken	MGRRAA-----DGAAPERP-----PEDGTPFAPEEERLL	31
Zebrafish	M-----MENNNSNSKDIQI-----STEEHPSVSHKVVDERTLQNEHDESDDAKNEEKINSNMSNSDQKKPKYIT	73
Sea urchin	M-----MTKXKPFTEPAPFISTQIVSDRPSALSANKWSTFAELSKSEKESGSDDEESATSDEEQVPLKSLHTVGLS	80
Apis	M-----REQVFLVLSAASVNLGQMYCYSLGPPFPAEKAGKASNTIDMIFGCFALFELLASLVFQNYLVIHAKNFVAGMFS	110
Human	KEQIFVLSAASVNLGQMYCYSLGPPFPAEKAGKASNTIDMIFGCFALFELLASLVFQNYLVIHAKNFVAGMFS	110
Mouse	KEQIFVLSAASVNLGQMYCYSLGPPFPAEKAGKASNTIDMIFGCFALFELLASLVFQNYLVIHAKNFVAGMFS	110
Rat	KEQIFVLSAASVNLGQMYCYSLGPPFPAEKAGKASNTIDMIFGCFALFELLASLVFQNYLVIHAKNFVAGMFS	110
Chicken	ROOLFVMAAASVNLGQMYCYSLGPPFPAEKAGKASNTIDMIFGCFALFELLASLVFQNYLVIHAKNFVAGMFS	111
Zebrafish	ROOLFVMAAASVNLGQMYCYSLGPPFPAEKAGKASNTIDMIFGCFALFELLASLVFQNYLVIHAKNFVAGMFS	111
Sea urchin	RKRLTFAGFAFWLTDADMLVSLAPFFVPLAKNGVSTVSLVQVYVALISIASPIGKVTIYIGRPLFFGCTGL	153
Apis	KDQMLTVLSTAGFAFWLTDADMLVSLAPFFVPLAKNGVSTVSLVQVYVALISIASPIGKVTIYIGRPLFFGCTGL	153
Nematode	SNQLSTSMLSLANLCTTAFSTADPFAEAKLNKLSSETQGLVGFIEFTMTIISPLGKVIITGARTMIVGIATV	160
Human	GOVTLFGVLDVDPGPIFAMFLVRVNDVNSFAAMTASSLSLAKAPNVAITVMSLVEVSGGLVAGPPLGGLL	190
Mouse	GOVTLFGVLDVDPGPIFAMFLVRVNDVNSFAAMTASSLSLAKAPNVAITVMSLVEVSGGLVAGPPLGGLL	190
Rat	GOVTLFGVLDVDPGPIFAMFLVRVNDVNSFAAMTASSLSLAKAPNVAITVMSLVEVSGGLVAGPPLGGLL	190
Chicken	GOVTLFGVLDVDPGPIFAMFLVRVNDVNSFAAMTASSLSLAKAPNVAITVMSLVEVSGGLVAGPPLGGLL	190
Zebrafish	SGCTLFGVLDVDPGPIFAMFLVRVNDVNSFAAMTASSLSLAKAPNVAITVMSLVEVSGGLVAGPPLGGLL	191
Sea urchin	AGONLFGVLDVDPGPIFAMFLVRVNDVNSFAAMTASSLSLAKAPNVAITVMSLVEVSGGLVAGPPLGGLL	162
Apis	GTCAIFGLLDKVNHPFIIISFVIRVEAMGAAFLTASFATIAKEPNDWATFASLTFEFGGLVGPVVGGLL	166
Nematode	GVTAIFGLVNFVPSGVTFFPVSFLVRLAEGDAAFPVSAFAAKSFKONVAVVGLIEFPAGTITAGVVGFPFD	240
Human	SFYGVVFLVGLVLLMPLMNYLTP-----NYSDDGHSFKMLTALPKVGLTAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK	266
Mouse	SFYGVVFLVGLVLLMPLMNYLTP-----SYESDPGKSPKMLVTKPMGLLAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK	266
Rat	SFYGVVFLVGLVLLMPLMNYLTP-----SYESDPGKSPKMLVTKPMGLLAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK	266
Chicken	SFYGVVFLVGLVLLMPLMNYLTP-----KYDSTPKSFKMLVTKPMGLLAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK	267
Zebrafish	AFYGVVFLVGLVLLMPLMNYLTP-----SFAVSPKSFMLVTKPMGLLAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK	238
Sea urchin	IGYGLVFLVGLVLLMPLMNYLTP-----KETSPEKSPKMLVTKPMGLLAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK	267
Apis	VGDTTPPVGLSALFTAAMTIFVLPVSNMNTVNTVYKQALREPOVLTATSSVIAIMSIGFQATLEPHLRFQ	245
Nematode	TGDFQPLVGLVLLMPLMNYLTP-----NFKDSESNPKMLVTKPMGLLAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK	318
Human	NLPAGVGLVFLGVALSVASISPLGGLLSDKRRPKRLVFNGLITAGCYMLGPPVPL-----HIKSQMLVLLVLSVGL	344
Mouse	SLSTGVVGLVFLGVALSVASISPLGGLLSDKRRPKRLVFNGLITAGCYMLGPPVPL-----HIKSQMLVLLVLSVGL	344
Rat	SLSTGVVGLVFLGVALSVASISPLGGLLSDKRRPKRLVFNGLITAGCYMLGPPVPL-----HIKSQMLVLLVLSVGL	344
Chicken	KLPAHVGLVFLGVALSVASISPLGGLLSDKRRPKRLVFNGLITAGCYMLGPPVPL-----HIKSQMLVLLVLSVGL	345
Zebrafish	KLPAHVGLVFLGVALSVASISPLGGLLSDKRRPKRLVFNGLITAGCYMLGPPVPL-----HIKSQMLVLLVLSVGL	345
Sea urchin	GVSTPVAGVFLVLLGGLVAILMPLMNYLSDKRRPKRLVFNGLITAGCYMLGPPVPL-----HIKSQMLVLLVLSVGL	316
Apis	DLSFTVGLVNSVGLTAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEK-----HIKSQMLVLLVLSVGL	388
Nematode	KLPTETGLMPLCCGGTYTKMPPVGAINDRNGENL-LFGSATLISMPFTGPTLNGVYKDRVIVIGTSLVAVGL	397
Human	SAGMSIIPFPETLSCAHEGFEGLSTLGVSLFGAMNSVAGMFPILGGFLCEKIFEBAAAAGLWTLSSVSMAL	424
Mouse	SAGMSIIPFPETLSCAHEGFEGLSTLGVSLFGAMNSVAGMFPILGGFLCEKIFEBAAAAGLWTLSSVSMAL	424
Rat	SAGMSIIPFPETLSCAHEGFEGLSTLGVSLFGAMNSVAGMFPILGGFLCEKIFEBAAAAGLWTLSSVSMAL	424
Chicken	KLPAHVGLVFLGVALSVASISPLGGLLSDKRRPKRLVFNGLITAGCYMLGPPVPL-----HIKSQMLVLLVLSVGL	425
Zebrafish	SLMCTCIPFPAEMACAHVGFEESSLTLGVSLFGAMNSVAGMFPILGGFLCEKIFEBAAAAGLWTLSSVSMAL	396
Sea urchin	SLMCTCIPFPAEMACAHVGFEESSLTLGVSLFGAMNSVAGMFPILGGFLCEKIFEBAAAAGLWTLSSVSMAL	468
Apis	QMAQLVASFTDALRTSIVQFPNLETYVLSGLWSTFALIGDIPGAVGILNIGFRNATMFLVLMVLA-----ATAA	481
Nematode	AASALYPCFMGLCEKIDKGFDDHTYGGVSLTQMAAGFGGFGTGGVSVVVERFRWNTMEAFHLNLS-----TWV	476
Human	FYLL-----YSR-RRKSQ-ONLSTEEERTLLPNET-----	456
Mouse	FYLL-----DSTARRSKA-ONLSTEEERTLLPNET-----	457
Rat	FYLL-----DSTARRSKA-ONLSTEEERTLLPNET-----	457
Chicken	YYIAE-----ATR-KSSSLGPPDSNEEGTHLGSST-----	458
Zebrafish	YYIAE-----ATR-KSSSLGPPDSNEEGTHLGSST-----	458
Sea urchin	FCIMEYQKGRKRRPKRYGEE-----PERDEN-ONLSDTESLQAHFHPNPNVLENLAINIDHPVNGVYDCCVSVN	546
Apis	YYIAE-----ATR-KSSSLGPPDSNEEGTHLGSST-----	458
Nematode	LGIII-----KRC-RR-----	486
Human	-----	456
Mouse	-----	456
Rat	-----	456
Chicken	-----	434
Zebrafish	-----	434
Sea urchin	CTENPQWPKRERLRLV-----	502
Apis	-----PITVDRPSQNSLVNCSYNRAGASRSYSHRSYSGYETKRYLEMT	486
Nematode	-----	486

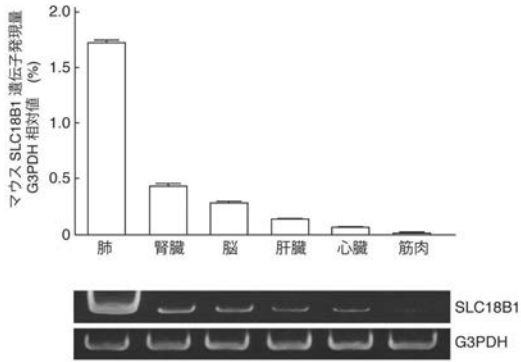
【 図 2 】

SLC18A1_WM1	MLRTILDADQRL-----LKEGRASRLVIVVVFALLDMLFTVVPTVPTLVDHEKFNYSLSLHGAGS	68
SLC18A2_WM2	MALSELALLV-NW-----LQESRSRXLILFVVFALLDMLFTVVPTVPTLVDHEKFNYSLSLHGAGS	67
SLC18A3_VACHT	NESEKAPAGQAAATKLSEAVGAALQPRRORLVLVIVVVFALLDMLFTVVPTVPTLVDHEKFNYSLSLHGAGS	67
SLC18B1_VPAT	NEALQNLGPRAGGDDPQKAGEITPQMLDREQVPLVLSAASVNLGQMYCYSLGPPFPAEKAGKASNTIDMIFGCFAL	67
SLC18A1_WM1	SPHALSAPSTISFSFNNTVAVEESVSGIANNMDTASTIPPTATIASHKNKQLOQTGLEETTRVQVLFASKAV	148
SLC18A2_WM2	T-----ASISDGSISFSYDSTMTGNATRELTLHQIATQWMTASAPSPQSEMDL-----NENVQGLFASKAT	148
SLC18A3_VACHT	TLPLTPANASAYTANTSASPTAMPAGSALRPYPT-----ESEDKLVLFASKAT	133
SLC18B1_VPAT	-----SNTIDMIFGCFAL	131
SLC18A1_WM1	NOLLNVPVGLTNRIGYHPIHAFVIMFLVTFMFAFSQTY-----TLLFVARTLOGIGSSFSVAGLQMLASVYTD	221
SLC18A2_WM2	VQLTNMPFGLTNRIGYHPIHAFVIMFLVTFMFAFSQTY-----TLLFVARTLOGIGSSFSVAGLQMLASVYTD	213
SLC18A3_VACHT	LQLLVNPVSGFFIDMSYVPLVLSGLQMPASTVLFARAEI-----ATLFAKSLGGLGSFADTSQIAMEADPYS	286
SLC18B1_VPAT	FELASLVFQNYLVIHAKNFVAGMFSGGVTLFGVLDVDPGPIFAMFLVRVNDVNSFAAMTASSLSLAKAPNVAITVMSL	161
SLC18A1_WM1	DHERGAMNLTGLLGLLGPFGSFWHEFKSAPLILAFALLDGLALCCLQSVKVPESAK-----GTFPLML	297
SLC18A2_WM2	DHERGAMNLTGLLGLLGPFGSFWHEFKSAPLILAFALLDGLALCCLQSVKVPESAK-----GTFPLML	297
SLC18A3_VACHT	EPERSALQVALAFISFGLVAPPFGGLVEFAGKVPVPLVLAQVLDALLLAWKPFSAARARANLVGTFPIHRLM	286
SLC18B1_VPAT	NWATY-----LQLETFSGGLLGLLGPFGSFWHEFKSAPLILAFALLDGLALCCLQSVKVPESAK-----GTFPLML	232
SLC18A1_WM1	KDPTILVAAGSFCFANMVAIETPLPTIMMOTMSPKQGLAFPLPASVYLGTLNFGVLANMG-----RMLCSLQML	375
SLC18A2_WM2	KDPTILVAAGSFCFANMVAIETPLPTIMMOTMSPKQGLAFPLPASVYLGTLNFGVLANMG-----RMLCSLQML	375
SLC18A3_VACHT	LDPYIAVAGALTCNPLAFLEPTIATMNMHMAASEMAMLPAPVPHVGLVYTLRLAARPHQLVGLALGLAV	366
SLC18B1_VPAT	ALPKVGLTAFVNSLSGCFGLDPTLSLVLEKFNLPAGVYVFLGVALSVASISPLGGLLSDKRRPKRLVFNGLITAG	312
SLC18A1_WM1	VTSLCYLVAHNTFGLTGNAGLGLATQVDSMMPDMHGLVDRH-----TSVYGVYATADVAFMGFATG	445
SLC18A2_WM2	VGVVSLCIPFANVYGLTAPNFVGFAGIAMDSSMMPDMHGLVDRH-----TSVYGVYATADVAFMGFATG	437
SLC18A3_VACHT	TASCSVPKPCFAPLVLSGLCFZALVOTALLPTLAFVDRH-----VSYGVYATADVAFMGFATG	436
SLC18B1_VPAT	TAGCYMLGPPVPLHIKSQMLVLLVLSVGLSAGMSIIPFPETLSCAHEGFEGLSTLGVSLFGAMNSVAGMFP	392
SLC18A1_WM1	STGGAIVKAGFPMLMIVTQZINIVYAPLCYLRSPAAEKKLALSO-----DCMERTMATQKTFEPLGDSDEEPPH	524
SLC18A2_WM2	SAGGALAKAGFPMLMIVTQZINIVYAPLCYLRSPAAEKKLALSO-----DCMERTMATQKTFEPLGDSDEEPPH	514
SLC18A3_VACHT	TVAGHVHSLFQELSLQMLANLAPVLLLRNGLLRSRSRDLVLEDPQGLYDAVRLRERPVSGGDEPRSPPO	516
SLC18B1_VPAT	TLGGFLYKCFEBAAAAGLWTLSSVSMALGGLVLLVLSVGLSAGMSIIPFPETLSCAHEGFEGLSTLGVSLFGAMNSVAGMFP	456
SLC18A1_WM1	E-----	525
SLC18A2_WM2	-----	514
SLC18A3_VACHT	PFDACEDDNYNYRYS	532
SLC18B1_VPAT	-----	456

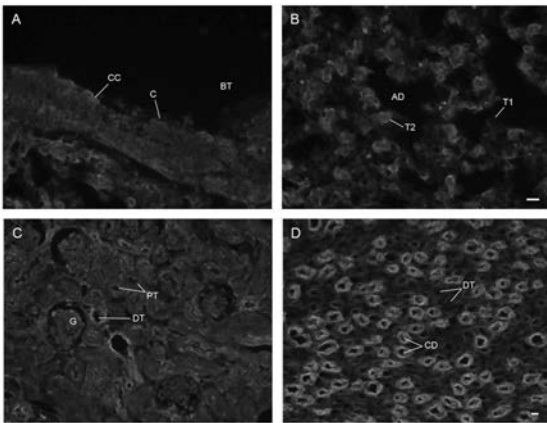
【 図 3 】



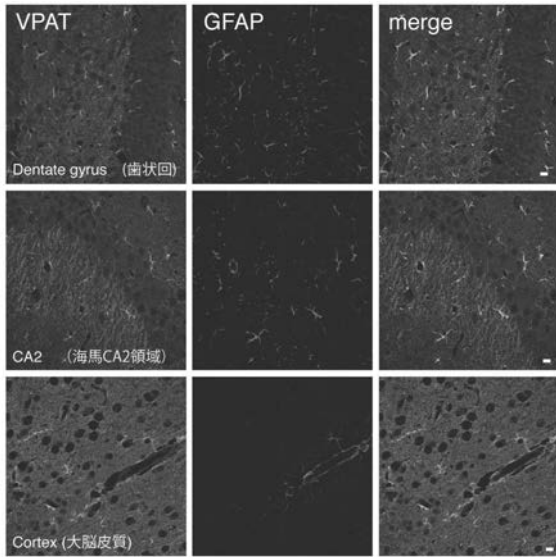
【 図 4 】



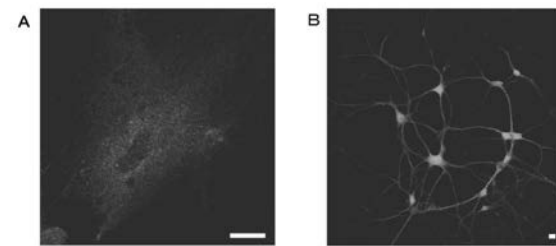
【 図 5 】



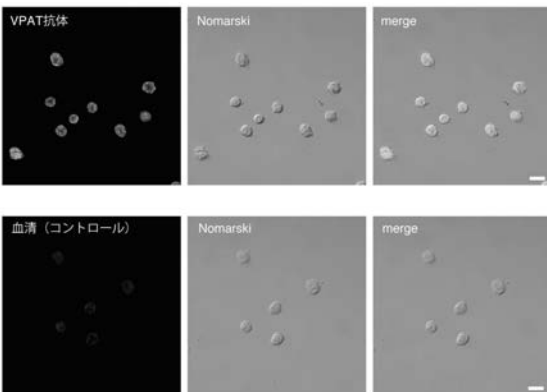
【 図 6 】



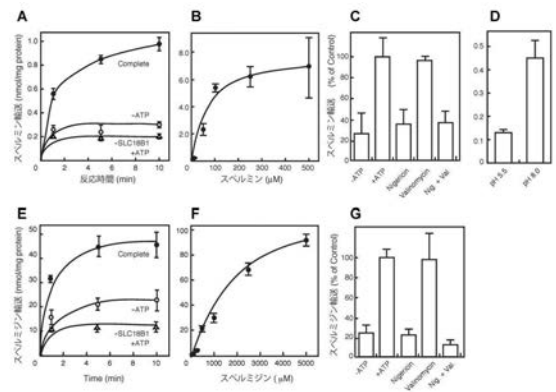
【 図 7 】



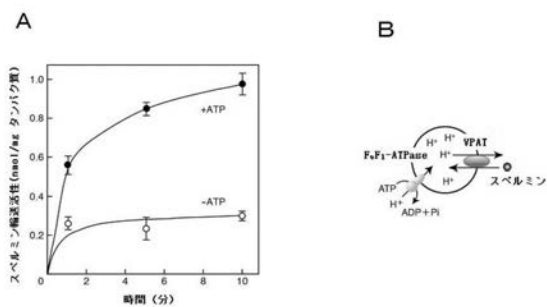
【 図 8 】



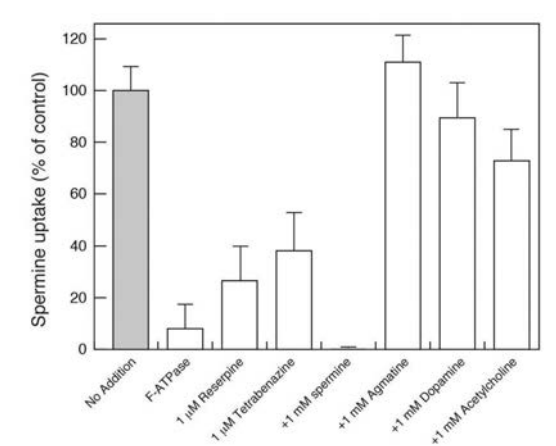
【 図 10 】



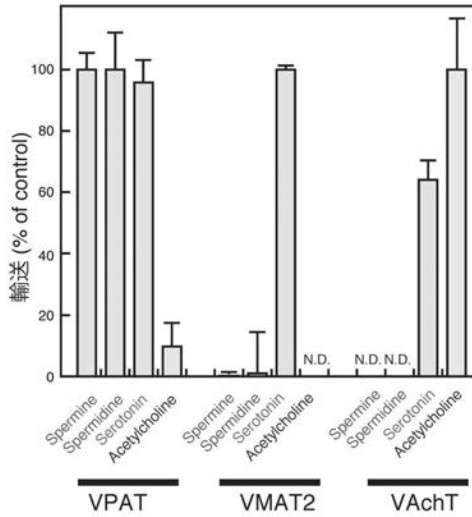
【 図 9 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】



【 配 列 表 】

2014068991000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 26 年 1 月 31 日 (2014.1.31)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

(削 除)

【 請 求 項 2 】

(削 除)

【 請 求 項 3 】

(削 除)

【 請 求 項 4 】

(削 除)

【 請 求 項 5 】

(削 除)

【 請 求 項 6 】

(削 除)

【 請 求 項 7 】

(削 除)

【 請 求 項 8 】

(削除)

【請求項 9】

(削除)

【請求項 10】

(削除)

【請求項 11】

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤のスクリーニング法であって、

(1) 人工膜を提供する工程であって、ここで、該人工膜が、以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；

(b) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(d) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(e) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む、工程；

(2) 該人工膜に候補薬物を接触させる工程；

(3) 該人工膜のポリアミン輸送活性を測定する工程；および、

(4) 工程 (3) で測定されたポリアミン輸送活性から、該候補薬物がポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤であるか否かを決定する工程；

を包含する、方法。

【請求項 12】

前記活性調節剤が阻害剤である、請求項 11 または 22 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記活性調節剤が活性促進剤である、請求項 11 または 22 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

(削除)

【請求項 15】

以下：

(a) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；

(b) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 90% 同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(d) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列において 1 また

は数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(e) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列において1または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む人工膜を含む、ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするための、組成物。

【請求項16】

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするためのキットであって、以下：

(I) 核酸であって、以下：

(a) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；

(b) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列と少なくとも90%同一である配列を含む核酸であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(d) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列において1または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列であって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

(e) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸；

(f) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；ならびに、

(g) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列において1または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

からなる群から選択される核酸、ならびに、

(II) 脂質を含む、キット。

【請求項17】

請求項16に記載のキットであって、前記(I)核酸が、以下：

(a) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列を含む核酸；ならびに、

(i) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される、キット。

【請求項18】

ポリアミン輸送タンパク質の活性調節剤をスクリーニングするためのキットであって、以下：

(III) ポリペプチドであって、以下：

(j) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド；

(k) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列を含む核酸の相補鎖と高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(l) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列と少なくとも90%同一である配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(m) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列において1または数個の変異、置換、挿入または欠失を含む核酸配列を有する核酸配列によってコードされるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

(n) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(o) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；ならびに、

(p) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列において1または数個の変異、置換、挿入または欠失を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ポリアミン輸送活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチド、ならびに、

(II) 脂質を含む、キット。

【請求項19】

請求項18に記載のキットであって、前記(III)ポリペプチドが、以下：

(q) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列からなる核酸によってコードされるポリペプチド、ならびに；

(r) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

からなる群から選択される、キット。

【請求項20】

さらに、プロトンポンプを含む、請求項16～19のいずれか1項に記載のキット。

【請求項21】

さらに、F₀F₁-ATPaseを含む、請求項16～19のいずれか1項に記載のキット。

【請求項22】

請求項11に記載の方法であって、前記人工膜が、以下：

(h) 配列番号1および配列番号3からなる群から選択される核酸配列からなる核酸；ならびに、

(i) 配列番号2および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む、方法。

【請求項23】

請求項11に記載の方法であって、前記人工膜が膜小胞である、方法。

【請求項24】

請求項11に記載の方法であって、前記人工膜がリボソームである、方法。

【請求項25】

請求項11に記載の方法であって、前記人工膜がさらにプロトンポンプを含む、方法。

【請求項26】

請求項11に記載の方法であって、前記人工膜がさらにF₀F₁-ATPaseを含む、方法。

【請求項27】

請求項15に記載の組成物であって、前記人工膜が、以下：

(h) 配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列からなる核酸 ;
ならびに、

(i) 配列番号 2 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択される核酸によってコードされるポリペプチドを含む、組成物。

【請求項 28】

請求項 15 に記載の組成物であって、前記人工膜が膜小胞である、組成物。

【請求項 29】

請求項 15 に記載の組成物であって、前記人工膜がリポソームである、組成物。

【請求項 30】

請求項 15 に記載の組成物であって、前記人工膜がさらにプロトンポンプを含む、組成物。

【請求項 31】

請求項 15 に記載の組成物であって、前記人工膜がさらに F_0F_1 -ATPase を含む、組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/006488
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/705(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/705, C07K17/00, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2001/064875 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC.), 07 September 2001 (07.09.2001), claim 9; fig. 1; page 51, lines 1 to 3 & US 2002/0068710 A1	1-10/11-21
Y/A	WO 2009/116546 A1 (Okayama University), 24 September 2009 (24.09.2009), paragraphs [0017] to [0020], [0121] to [0131] (Family: none)	1-10/11-21
A	GASNIER, B., "The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids", Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 2004, Vol. 447, pp.756-759	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 November, 2013 (21.11.13)		Date of mailing of the international search report 03 December, 2013 (03.12.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/006488

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MASUKO, T. et al., Polyamine transport, accumulation, and release in brain, Journal of Neurochemistry, 2003, Vol. 84, pp.610-617	1-21
A	BYCHKOV, R., et al., "OCT-transporters of perivascular astrocytes may contribute to polyamine uptake in the brain.", Society for Neuroscience, 2008, 481.10/RR17	1-21
A	NOSKOVA, V. et al., "Histamine uptake by human endometrial cells expressing the organic cation transporter EMT and the vesicular monoamine transporter-2", Molecular Human Reproduction, Vol. 12, No. 8, 2006, pp.483-489	1-21

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 0 6 4 8 8	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/705(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/705, C07K17/00, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) CPlus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y/A	WO 2001/064875 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC.) 2001.09.07, Claim9, Fig. 1, 第51頁第1-3行 & US 2002/0068710 A1	1-10/11-21	
Y/A	WO 2009/116546 A1 (国立大学法人 岡山大学) 2009.09.24, 段落【0017】 - 【0020】、【0121】 - 【0131】 (ファミリーなし)	1-10/11-21	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 21.11.2013		国際調査報告の発送日 03.12.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高山 敏充	4 B 4 1 5 3
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 0 6 4 8 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	GASNIER, B. , "The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids", Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 2004, Vol. 447, pp.756-759	1-21
A	MASUKO, T. et al. , Polyamine transport, accumulation, and release in brain, Journal of Neurochemistry, 2003, Vol. 84, pp.610-617	1-21
A	BYCHKOV, R. , et al. , "OCT-transporters of perivascular astrocytes may contribute to polyamine uptake in the brain.", Society for Neuroscience, 2008, 481.10/RR17	1-21
A	NOSKOVA, V. et al. , "Histamine uptake by human endometrial cells expressing the organic cation transporter EMT and the vesicular monoamine transporter-2", Molecular Human Reproduction, Vol. 12, No. 8, 2006, pp.483-489	1-21

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 宮地 孝明
 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内

(72) 発明者 日浅 未来
 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内

F ターム (参考) 2G045 AA40 DA13 DA14 DA19 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA11 BA11 BA63 CA04 CA20 DA02 EA02 FA01 GA11
 HA03 HA11
 4B063 QA05 QQ85 QR13 QR48 QR84 QX07
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。