

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/044196

発行日 平成17年3月24日 (2005. 3. 24)

(43) 国際公開日 平成15年5月30日 (2003. 5. 30)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
 A 6 1 K 38/00
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 48/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 25/28

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 94 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-545817 (P2003-545817)	(71) 出願人	000002831 第一製薬株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/012102		東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(22) 国際出願日	平成14年11月20日 (2002. 11. 20)	(71) 出願人	596175810
(31) 優先権主張番号	特願2001-354678 (P2001-354678)		財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
(32) 優先日	平成13年11月20日 (2001. 11. 20)		千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100088904
(31) 優先権主張番号	特願2002-46786 (P2002-46786)		弁理士 庄司 隆
(32) 優先日	平成14年2月22日 (2002. 2. 22)	(72) 発明者	小原 收
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7
(31) 優先権主張番号	特願2002-229863 (P2002-229863)		財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
(32) 優先日	平成14年8月7日 (2002. 8. 7)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポストシナプス蛋白質

(57) 【要約】

N - メチル - D - アスパラギン酸 (N M D A) 受容体に結合する蛋白質 A および該蛋白質 A と相互作用する蛋白質 B を提供し、さらにこれら蛋白質が N M D A 受容体のシグナル伝達を著しく促進することに基づいて、これら蛋白質の発現および/または機能の調節剤 (阻害剤または促進剤) 、および調節方法を提供することにより、N M D A 受容体のシグナル伝達異常や記憶再生の異常に起因する疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病およびポリグルタミン病等の神経変性疾患の解明、並びにそれら疾患の防止、改善、または治療を可能にした。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害または促進し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害または促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の調節剤。

【請求項 2】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の阻害剤。

【請求項 3】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を促進し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の促進剤。

【請求項 4】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害または促進し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害または促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の調節方法。

【請求項 5】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の阻害方法。

【請求項 6】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を促進し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の促進方法。

【請求項 7】

下記の群から選ばれるポリペプチド；

i) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
 i i) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
 i i i) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70 % の相同性を有し、かつ N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 / 2 B サブユニットと結合するポリペプチド、
 および

i v) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有し、かつ N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 / 2 B サブユニットと結合するポリペプチド。

【請求項 8】

下記の群から選ばれるポリペプチドであって、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 /

10

20

30

40

50

2 Bサブユニットと結合するポリペプチド；

i) 配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

ii) 前記i)のポリペプチドを含有するポリペプチド、

iii) 前記i)のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約70%の同一性を有するポリペプチド、

および

iv) 前記i)のポリペプチドのアミノ酸配列において1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

【請求項9】

下記の群から選ばれるポリペプチド；

i) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

ii) 前記i)のポリペプチドを含有するポリペプチド、

iii) 前記i)のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約70%の同一性を有し、かつ配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド、

および

iv) 前記i)のポリペプチドのアミノ酸配列において1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有し、かつ配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド。

【請求項10】

下記の群から選ばれるポリペプチドであって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド；

i) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

ii) 前記i)のポリペプチドを含有するポリペプチド、

iii) 前記i)のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約70%の同一性を有するポリペプチド、

および

iv) 前記i)のポリペプチドのアミノ酸配列において1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

【請求項11】

下記の群から選ばれるポリペプチドであって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下で、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体のシグナル伝達を増幅するポリペプチド；

i) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

ii) 前記i)のポリペプチドを含有するポリペプチド、

iii) 前記i)のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約70%の同一性を有するポリペプチド、

および

iv) 前記i)のポリペプチドのアミノ酸配列において1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

【請求項12】

下記のポリペプチドであって、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体/2Bサブユニットと結合し、かつ配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用しないポリペプチド；

i) 配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約70%の同一性を有するポリペプチド、

または

ii) 前記i)のポリペプチドのアミノ酸配列において1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

【請求項13】

10

20

30

40

50

配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチド。

【請求項 14】

配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体と結合するペプチド。

【請求項 15】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するペプチド。

【請求項 16】

配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチド。

【請求項 17】

配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するペプチド。

【請求項 18】

請求の範囲第 7 項から第 17 項に記載のポリペプチドまたはペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる請求の範囲第 1 項に記載の調節剤。

【請求項 19】

請求の範囲第 12 項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる請求の範囲第 2 項に記載の阻害剤。

【請求項 20】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる請求の範囲第 3 項に記載の促進剤。

【請求項 21】

請求の範囲第 7 項から第 17 項に記載のポリペプチドまたはペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、請求の範囲第 4 項に記載の調節方法。

【請求項 22】

請求の範囲第 12 項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、請求の範囲第 5 項に記載の阻害方法。

【請求項 23】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、請求の範囲第 6 項に記載の促進方法。

【請求項 24】

請求の範囲第 7 項、第 8 項もしくは第 12 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 13 項から第 15 項のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 25】

配列表の配列番号 4 または配列番号 5 に記載の塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

請求の範囲第 2 4 項または第 2 5 項に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項 2 7】

請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求の範囲第 1 6 項もしくは第 1 7 項に記載のペプチドをコードする塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 2 8】

配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 2 9】

請求の範囲第 2 7 項または第 2 8 項に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項 3 0】

請求の範囲第 2 4 項から第 2 6 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 3 1】

組換えベクターが発現組換えベクターである請求の範囲第 3 0 項に記載の組換えベクター。

【請求項 3 2】

請求の範囲第 2 7 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 3 3】

組換えベクターが発現組換えベクターである請求の範囲第 3 2 項に記載の組換えベクター。

【請求項 3 4】

請求の範囲第 3 0 項または第 3 1 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項 3 5】

請求の範囲第 3 2 項または第 3 3 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項 3 6】

請求の範囲第 3 0 項または第 3 1 項に記載の組換えベクター、および請求の範囲第 3 2 項または第 3 3 項に記載の組換えベクターのいずれか 1 つの組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項 3 7】

請求の範囲第 3 1 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または請求の範囲第 3 0 項もしくは第 3 1 項に記載の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む、請求の範囲第 7 項、第 8 項もしくは第 1 2 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 1 3 項から第 1 5 項のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。

【請求項 3 8】

請求の範囲第 3 3 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または請求の範囲第 3 2 項もしくは第 3 3 項に記載の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む、請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 1 6 項もしくは第 1 7 項に記載のペプチドの製造方法。

【請求項 3 9】

請求の範囲第 7 項、第 8 項もしくは第 1 2 項に記載のポリペプチドおよび / または請求の範囲第 1 3 項から第 1 5 項のいずれか 1 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項 4 0】

請求の範囲第 7 項、第 8 項もしくは第 1 2 項に記載のポリペプチドおよび / または請求の範囲第 1 3 項から第 1 5 項のいずれか 1 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体で

10

20

30

40

50

あって、該ポリペプチドの機能を阻害する抗体。

【請求項 4 1】

請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドおよび / または請求の範囲第 1 6 項もしくは第 1 7 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項 4 2】

請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドおよび / または請求の範囲第 1 6 項もしくは第 1 7 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体であって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害する抗体。

【請求項 4 3】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および / または、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする化合物の同定方法。

【請求項 4 4】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および / または、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ポリペプチドまたは化合物と該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ポリペプチドまたは化合物と該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、化合物が該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ポリペプチドの機能または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する化合物の同定方法。

【請求項 4 5】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および / または、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体と化合物とを接触させ、該ポリペプチドの発現または機能の有無を検出することのできるシグナルおよび / またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび / またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、該化合物が該ポリペプチドの発現または機能を阻害または促進するかどうかを決定する化合物の同定方法。

【請求項 4 6】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 7 項または第 8 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 6 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項または第 3 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 3 9 項または第 4 0 項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする化合物の同定方法。

【請求項 4 7】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請

10

20

30

40

50

請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、および請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする化合物の同定方法。

【請求項48】

請求の範囲第43項から第47項のいずれか1項に記載の同定方法で同定された化合物。

【請求項49】

請求の範囲第7項または第8項に記載のポリペプチドと相互作用し、その機能を阻害または促進する化合物。

【請求項50】

請求の範囲第24項から第26項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物。

【請求項51】

請求の範囲第9項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチドと相互作用し、当該ポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害または促進する化合物。

【請求項52】

請求の範囲第9項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチドと相互作用し、当該ポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下におけるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の増幅を阻害または促進する化合物。

【請求項53】

請求の範囲第27項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物。

【請求項54】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体、請求の範囲第48項から第53項のいずれか1項に記載の化合物、請求の範囲第1項または第18項に記載の調節剤、請求の範囲第2項または第19項に記載の阻害剤、および請求の範囲第3項または第20項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなる医薬組成物。

【請求項55】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体、請求の範囲第48項から第53項のいずれか1項に記載の化合物、請求の範囲第1項または第18項に記載の調節剤、請求の範囲第2項または第19項に記載の阻害剤、および請求の範囲第3項または第20項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の異常に起因する疾患の防止剤、治療剤、または改善剤。

【請求項56】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項

10

20

30

40

50

に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体、請求の範囲第48項から第53項のいずれか1項に記載の化合物、請求の範囲第1項または第18項に記載の調節剤、請求の範囲第2項または第19項に記載の阻害剤、および請求の範囲第3項または第20項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなる記憶再生の異常に起因する疾患の防止剤、治療剤、または改善剤。

【請求項57】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体、請求の範囲第48項から第53項のいずれか1項に記載の化合物、請求の範囲第1項または第18項に記載の調節剤、請求の範囲第2項または第19項に記載の阻害剤、および請求の範囲第3項または第20項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなる神経変性疾患の防止剤、治療剤、または改善剤。

10

【請求項58】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体、請求の範囲第48項から第53項のいずれか1項に記載の化合物、請求の範囲第1項または第18項に記載の調節剤、請求の範囲第2項または第19項に記載の阻害剤、および請求の範囲第3項または第20項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなるアルツハイマー病の防止剤、治療剤、または改善剤。

20

【請求項59】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体、請求の範囲第48項から第53項のいずれか1項に記載の化合物、請求の範囲第1項または第18項に記載の調節剤、請求の範囲第2項または第19項に記載の阻害剤、および請求の範囲第3項または第20項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか1つを適用することを特徴とするN-メチル-D-アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の異常に起因する疾患の防止方法、治療方法、または改善方法。

30

【請求項60】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第30項から第33項のいずれか1項に記載の組換えベクター、請求の範囲第34項から第36項のいずれか1項に記載の形質転換体、請求の範囲第39項から第42項のいずれか1項に記載の抗体、請求の範囲第48項から第53項のいずれか1項に記載の化合物、請求の範囲第1項または第18項に記載の調節剤、請求の範囲第2項または第19項に記載の阻害剤、および請求の範囲第3項または第20項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか1つを適用することを特徴とする記憶再生の異常に起因する疾患の防止方法、治療方法、または改善方法。

40

【請求項61】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチド、請求の範囲第24項から第29項のい

50

ずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 48 項から第 53 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 18 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 19 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 20 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを適用することを特徴とする神経変性疾患の防止方法、治療方法、または改善方法。

【請求項 62】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 24 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 48 項から第 53 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 18 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 19 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 20 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを適用することを特徴とするアルツハイマー病の防止方法、治療方法、または改善方法。

10

【請求項 63】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求の範囲第 24 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法。

20

【請求項 64】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 24 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体を少なくとも 1 つ以上含んでなる試薬キット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

30

本発明は、PDZドメインを保有しており N - メチル - D - アスパラギン酸 (N - m e t h y l - D - a s p a r t a t e) (以下、NMDA と略称する) 受容体と複合体を形成し得るポストシナプス デンシティー蛋白質 (以下、蛋白質 A と略称する) および蛋白質 A と相互作用する蛋白質 (以下、蛋白質 B と称する)、並びに蛋白質 A と NMDA 受容体との複合体形成の阻害または促進を特徴とする NMDA 受容体のシグナル伝達 (s i g n a l t r a n s d u c t i o n) の調節剤 (阻害剤または促進剤)、蛋白質 A と蛋白質 B との相互作用の阻害または促進特徴とする NMDA 受容体のシグナル伝達の調節剤、蛋白質 A と NMDA 受容体との複合体形成の阻害または促進による NMDA 受容体のシグナル伝達の調節方法、および蛋白質 A と蛋白質 B との相互作用の阻害または促進による NMDA 受容体のシグナル伝達の調節方法に関する。さらに詳しくは、蛋白質 A または蛋白質 B のアミノ酸配列の全部または一部を有するポリペプチドまたはペプチド、該ポリペプチドまたはペプチドをコードする塩基配列、またはその相補的塩基配列を含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ポリペプチドまたはペプチドに対する抗体、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用する化合物、これらの 1 種以上を含む医薬組成物、該ポリペプチドまたはペプチドの製造方法、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用する化合物の同定方法、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドの測定方法、並びに試薬キットに関する。

40

背景技術

ポストシナプス デンシティー蛋白質 (P o s t s y n a p t i c D e n s i t y P

50

rotein) (以下、PSDと略称する)は、神経細胞間情報伝達においてシナプスの情報を受け取るシナプス後細胞に存在するポストシナプス デンシティーを構成する蛋白質である。PSDは、シナプス後膜において受容体やイオンチャネル等の機能性膜蛋白質の局在化や集積または生体マルチソームの形成に関与していると考えられている。

一方、シナプスやタイトジャンクションのような複雑な細胞膜構造の形成と維持、膜蛋白質の集積、情報伝達、複合体の形成および細胞極性の維持等の生体機能に関する蛋白質が、蛋白質間相互作用を担うモジュールとしてこれら機能に関与すると考えられるペプチド結合ドメインを保有することが報告された(非特許文献1)。このドメインはPDZドメインと呼ばれ、90乃至100アミノ酸残基からなる。これら生体機能の中で、特定の蛋白質を細胞内の特定の部位に局在させる、あるいはPDZドメイン自身が含まれる蛋白質と標的蛋白質との結合を促進するといった機能に、PDZドメインがより重要な役割を果たしていると考えられている。例えば、PDZドメインによるシグナル伝達蛋白質の細胞膜上の蛋白質複合体への局在化が適切なシグナル伝達に必要であると考えられる。

PDZドメインは、蛋白質間相互作用において標的蛋白質の最もC末端のアミノ酸配列を認識する。その標的蛋白質は膜貫通型の受容体やチャネルであることが多い。例えば、脊椎動物または無脊椎動物のシナプスに存在するMAGUK蛋白質(membrane associated guanylate kinase protein)ファミリーに属するPSD-95、PSD-93(chapsyn110またはKAP-5)およびショウジョウバエdlg蛋白質のヒトにおけるホモログであるhdlgは、その第2番目および第3番目のPDZドメインにより、NMDA受容体およびシェーカー型カリウムイオンチャネルKir1.4のC末端を認識することが報告されている(非特許文献2)。

PDZドメインを有する蛋白質のインビボでの局在と、インビトロの生化学的解析から同定された膜貫通型の標的蛋白質の局在との解析により、PSD-95、PSD-93およびhdlgが、全てNMDA受容体またはカリウムイオンチャネルと同じ局在を示すことが、各組織あるいは神経系の各細胞種において確認されている(非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5および非特許文献6)。

また、PSD-95とNMDA受容体あるいはカリウムイオンチャネルとを線維芽細胞に共発現させると、細胞表面上にこれら蛋白質のクラスター形成が見られるが、それぞれ単独で発現させたときは分散した局在しか示さない(非特許文献4)。一方、PSD-95が認識するC末端のアミノ酸モチーフ(S/TXV)を欠失したスプライシングアイソフォームは分散した局在を示す(非特許文献7)。これらから、MAGUK蛋白質がPDZドメインを介した相互作用によって、細胞膜蛋白質の架橋と集積に直接関与していると考えられる。

さらに、Kirを導入した線維芽細胞においてPKA(Protein Kinase A)を活性化するとアミノ酸配列第440番目のセリン(S440)がリン酸化され、KirとPSD-95が乖離し、カリウムイオン電導率が低下する。S440をアラニンに置換すると、PKAのこの効果は見られない。これらの結果は、KirへのPSD-95の結合がチャネルをクラスター化させるだけでなく、チャネル電導率にPKA感受性を付与することを示している。

PSD-95は、ポストシナプス デンシティー蛋白質の1つであり、数々の機能、例えば胚の発生、神経の発生、神経伝達、情報伝達および蛋白質複合体の形成等への関与が知られている。また、トランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、アンカー蛋白質として膜蛋白質、例えば受容体やイオンチャネル等を細胞骨格に連結する作用、および細胞の集合や接合に関するアドヘシン/アグルチニンとしての作用が報告されている(非特許文献4および非特許文献8)。これらから、PSD-95は、神経伝達物質放出の制御、あるいは細胞増殖やがんの抑制に関与していると考えられている(非特許文献9、非特許文献10および非特許文献11)。

PSD-95のアミノ酸配列中には、3つのPDZドメイン、1つのSH3ドメイン(Srchomology region 3 domain)、1つのGKドメイン(グ

10

20

30

40

50

アニレートキナーゼ ドメイン) (g u a n y l a t e k i n a s e d o m a i n) が存在する。

PSD-95は、そのPDZドメインを介して、シナプス後膜に存在するNMDA受容体の構成因子である2Bサブユニットと結合する(非特許文献2、非特許文献12、非特許文献13および非特許文献14)。このことから、PSD-95は該受容体のシグナル伝達等に関する細胞骨格蛋白質の1つであると考えられている。

また、PSD95がそのGKDドメインを介して、PSD95/SAP90関連蛋白質3(PSD95/SAP90-associated protein-3)(以下、SAPAP-3と略す)と相互作用することが、ラットにおいて報告されている(非特許文献15)。ラットSAPAP-3は神経細胞に特異的に発現しており、ポストシナプス 10
デンシティー画分に豊富に存在する。この報告では、ラットSAPAP-3は、ポストシナプス 10
デンシティーの構成要素、例えばPSD95/SAP90等、を膜領域に集合させることによりポストシナプス 10
デンシティーの構造維持に関与していると考えられている。一方、NMDA受容体は、グルタミン酸受容体の1種であり、リガンド依存性イオンチャンネルに共通する高次構造を有することから、細胞膜上においてイオンチャンネルを形成していると考えられている。該イオンチャンネルはカルシウムイオン透過性を持ち、シナプス後膜内のカルシウム濃度を上昇させる生理的機能を有する。通常は、シナプス間隙中のマグネシウムイオンによって閉塞されており、単発のシナプス伝達には関与しないと考えられているが、頻回興奮等によって膜電位が脱分極状態にあるとマグネシウムイオンによる閉塞が解かれて活性化する。生体内でのリガンドとしてはグルタミン酸およびアスパラギン酸が挙げられる。NMDA受容体の阻害剤として知られているアミノホスホノ吉草酸やMK-801等を哺乳動物脳に直接投与することにより記憶障害が起きることから、NMDA受容体の記憶成立への関与が示唆されている。 20

上記のように、PDZドメインの機能は、かなり広範囲の生命現象において利用されていると予想される。したがって、PDZドメインを有する蛋白質によって形成される複合体や、その複合体に関わる蛋白質の解明とその制御により、蛋白質相互作用、例えば細胞骨格構造の形成、膜蛋白質の集積、シグナル伝達、複合体の形成および細胞極性の維持等、の異常に起因する疾患の防止、治療および診断が可能になる。例えば、PDZドメインを有する新規なPSDを見出すことにより、該PSDの異常が関与する疾患、例えば神経変性疾患の解明、並びにそれらの防止、治療および診断が可能になる。すなわち、蛋白質相互作用やPDZドメインの認識機構の研究、並びに医薬品開発の分野において、PDZドメインを有する蛋白質および該蛋白質と相互作用する蛋白質、並びに両蛋白質の相互作用を制御する方法を見出すことが必要である。 30

以下に、本背景技術の説明に引用した文献を列記する。

非特許文献1:「細胞工学」、2001年、第20巻、p.1345-1349。

非特許文献2:ニーサマー(Nie th a m m e r, M.)ら、「ジャーナル オブ ニューロサイエンス(Jouranl of Neurosc i e n c e)」、1996年、第16巻、p.2157-2163。

非特許文献3:コーナウ(Kornau, H. C.)ら、「サイエンス(Science)」、1995年、第269巻、p.1737-1740。 40

非特許文献4:キム(Kim, E.)ら、「ネイチャー(Nature)」、1995年、第378巻、p.85-88。

非特許文献5:キム(Kim, E.)ら、「ニューロン(Neuron)」、1996年、第17巻、p.103-113。

非特許文献6:ミラー(Miller, B. M.)ら、「ジャーナル オブ ニューロサイエンス(Jouranl of Neurosc i e n c e)」、1995年、第15巻、p.2354-2366。

非特許文献8:スタサキス(Stathakis, D.)ら、「ゲノミクス(Genomics)」、1997年、第44巻、p.71-82。

非特許文献9:ハナダ(Hanada, T.)ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル 50

ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2000年、第275巻、p. 28774 - 28784。

非特許文献10：ミゴード (Migaud, M.) ら、「ネイチャー (Nature)」、1998年、第396巻、p. 433 - 439。

非特許文献11：サットラー (Sattler, R.) ら、「サイエンス (Science)」、1999年、第284巻、p. 1845 - 1848。

非特許文献12：モンヤー (Monyer, H.) ら、「サイエンス (Science)」、1992年、第256巻、p. 1217 - 1221。

非特許文献13：イシイ (Ishii, T.) ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1993年、第268巻、p. 2836 - 2843。

非特許文献14：シェン (Sheng, M.) ら、「ネイチャー (Nature)」、1994年、第368巻、p. 144 - 147。

非特許文献15：タケウチ (Takeuchi, M.) ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1997年、第272巻、p. 11943 - 11951。

発明の開示

本発明は、蛋白質間相互作用を担うモジュールとして作用するPDZドメインを保有しNMDA受容体と複合体を形成し得る特定のアミノ酸配列からなる蛋白質Aおよび該蛋白質Aと相互作用する蛋白質B、並びにこれらをそれぞれコードする遺伝子を見出し、これらを利用することにより達成したものである。

すなわち、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとNMDA受容体との結合を阻害または促進し、および/または、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害または促進することを特徴とする、NMDA受容体のシグナル伝達の調節剤である。

また、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとNMDA受容体との結合を阻害し、および/または、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害することを特徴とする、NMDA受容体のシグナル伝達の阻害剤である。

さらに、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとNMDA受容体との結合を促進し、および/または、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を促進することを特徴とする、NMDA受容体のシグナル伝達の促進剤である。

さらにまた、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとNMDA受容体との結合を阻害または促進し、および/または、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害または促進することを特徴とする、NMDA受容体のシグナル伝達の調節方法である。

またさらに、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとNMDA受容体との結合を阻害し、および/または、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害することを特徴とする、NMDA受容体のシグナル伝達の阻害方法である。

また、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとNMDA受容体との結合を促進し、および/または、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を促進することを特徴とする、NMDA受容体のシグナル伝達の

促進方法である。

さらに、本発明の一態様は、下記の群から選ばれるポリペプチドである；

- i) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有し、かつ NMDA 受容体 / 2B サブユニットと結合するポリペプチド、

および

- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有し、かつ NMDA 受容体 / 2B サブユニットと結合するポリペプチド。

10

さらにまた、本発明の一態様は、下記の群から選ばれるポリペプチドであって、NMDA 受容体 / 2B サブユニットと結合するポリペプチドである；

- i) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有するポリペプチド、

および

- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

またさらに、本発明の一態様は、下記の群から選ばれるポリペプチドである；

- i) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド、

20

および

- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド。

また、本発明の一態様は、下記の群から選ばれるポリペプチドであって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチドである；

- i) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有するポリペプチド、

30

および

- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

さらに、本発明の一態様は、下記の群から選ばれるポリペプチドであって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下で、NMDA 受容体のシグナル伝達を増幅するポリペプチドである；

- i) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有するポリペプチド、

40

および

- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

さらにまた、本発明の一態様は、下記のポリペプチドであって、NMDA 受容体 / 2B サブユニットと結合し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチ

50

ドと相互作用しないポリペプチドである；

i) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の相同性を有するポリペプチド、

または

ii) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

またさらに、本発明の一態様は、配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドである。

また、本発明の一態様は、配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、NMDA 受容体と結合するペプチドである。

10

さらに、本発明の一態様は、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するペプチドである。

さらにまた、本発明の一態様は、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドである。

またさらに、本発明の一態様は、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するペプチド。

また、本発明の一態様は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる NMDA 受容体のシグナル伝達の調節剤である。

20

さらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチドおよび上記ペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる NMDA 受容体のシグナル伝達の阻害剤である。

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリペプチドおよび上記ペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる NMDA 受容体のシグナル伝達の促進剤である。

またさらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチドおよび上記ペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、NMDA 受容体のシグナル伝達の調節方法である。

30

また、本発明の一態様は、上記ポリペプチドおよび上記ペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、NMDA 受容体のシグナル伝達の阻害方法である。

さらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチドおよび上記ペプチドから選ばれる少なくとも 1 種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、NMDA 受容体のシグナル伝達の促進方法である。

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドのいずれかをコードする塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチドである。

またさらに、本発明の一態様は、配列表の配列番号 4 または配列番号 5 に記載の塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

40

また、本発明の一態様は、配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

さらに、本発明の一態様は、上記ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドである。

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリヌクレオチドを含有する組換えベクターである。

またさらに、本発明の一態様は、組換えベクターが発現組換えベクターである上記組換えベクターである。

また、本発明の一態様は、上記組換えベクターを導入されてなる形質転換体である。

50

さらに、本発明の一態様は、上記組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または上記組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドの製造方法である。

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリペプチドおよび/または上記ペプチドを免疫学的に認識する抗体である。

またさらに、本発明の一態様は、上記抗体であって、上記ポリペプチドの機能を阻害する抗体である。

また、本発明の一態様は、上記抗体であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害する抗体である。

10

さらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および/または、上記ポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、上記ポリペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、および上記抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする化合物の同定方法である。

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および/または、上記ポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ポリペプチドまたは化合物と該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ポリペプチドまたは化合物と該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、化合物が該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ポリペプチドの機能または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する化合物の同定方法である。

20

またさらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および/または、上記ポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、上記形質転換体と化合物とを接触させ、該ポリペプチドの発現または機能の有無を検出することのできるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび/またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、該化合物が該ポリペプチドの発現または機能を阻害または促進するかどうかを決定する化合物の同定方法である。

30

また、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとN-メチル-D-アスパラギン酸受容体との結合を阻害または促進する化合物の同定方法であって、上記ポリペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、および上記抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする化合物の同定方法である。

さらに、本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害または促進する化合物の同定方法であって、上記ポリペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、および上記抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする化合物の同定方法である。

40

さらにまた、本発明の一態様は、上記いずれかの同定方法で同定された化合物である。

またさらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチドと相互作用し、その機能を阻害または促進する化合物である。

また、本発明の一態様は、上記ポリペプチドと相互作用し、当該ポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害または促進する化合物である。

さらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチドと相互作用し、当該ポリペプチドと配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下におけるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の増幅を阻害または促進する化合物である。

50

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物である。

またさらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなる医薬組成物である。

また、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の異常に起因する疾患の防止剤、治療剤、または改善剤である。

10

さらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなる記憶再生の異常に起因する疾患の防止剤、治療剤、または改善剤である。

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなる神経変性疾患の防止剤、治療剤、または改善剤である。

またさらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを有効量含んでなるアルツハイマー病の防止剤、治療剤、または改善剤である。

20

また、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを適用することを特徴とするN-メチル-D-アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の異常に起因する疾患の防止方法、治療方法、または改善方法である。

さらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを適用することを特徴とする記憶再生の異常に起因する疾患の防止方法、治療方法、または改善方法である。

30

さらにまた、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを適用することを特徴とする神経変性疾患の防止方法、治療方法、または改善方法である。

またさらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体、上記化合物、上記調節剤、上記阻害剤、および上記促進剤のうちの少なくともいずれか1つを適用することを特徴とするアルツハイマー病の防止方法、治療方法、または改善方法である。

40

また、本発明の一態様は、上記ポリペプチドまたは上記ポリヌクレオチドを、定量的あるいは定性的に測定する方法である。

さらに、本発明の一態様は、上記ポリペプチド、上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記組換えベクター、上記形質転換体、上記抗体を少なくとも1つ以上含んでなる試薬キットである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、参照によりここに援用されるところの、日本特許出願番号第2001-354678号、同第2002-46786号および同第2002-229863号からの優先権を請求するものである。

本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されていない限り、本

50

発明の属する技術分野において通常の知識を有する者（当業者）により普通に理解される意味を持つ。本明細書中では当業者に既知の種々の方法が参照されている。そのような引用されている公知の方法を開示する刊行物等の資料はそれらを引用することにより本明細書中にそれらの全体が完全に記載されているものとして導入される。

以下、本発明について、発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。以下の詳細な説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

（新規 PSD および該 PSD と相互作用する蛋白質）

本発明においては、新規なヒト PSD および該 PSD と相互作用する蛋白質、並びにこれらをそれぞれコードする遺伝子を提供する。

新規ヒト PSD は、ヒト脳由来長鎖 cDNA ライブラリーから、PDZ ドメイン、SH3 ドメインおよび GK ドメインを有する遺伝子として選出したクローン h j 0 2 5 3 7 がコードする蛋白質である。当該蛋白質は、h j 0 2 5 3 7 遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを導入した大腸菌で発現させて得た。

以下、本発明に係るヒト PSD を Protein - X、当該 PSD をコードする遺伝子を Protein - X 遺伝子と呼ぶ。Protein - X 遺伝子は 4 9 4 1 塩基（配列表の配列番号 4）からなり、そのオープンリーディングフレーム（ORF）全長は 1 7 3 1 塩基、該遺伝子の遺伝子産物は 5 7 6 アミノ酸残基（配列表の配列番号 1）からなる。Protein - X は既知 PSD と同様に、そのアミノ酸配列中の第 1 3 9 番目イソロイシン（Ile）から第 2 1 9 番目グリシン（Gly）に PDZ ドメインを、第 2 3 1 番目メチオニン（Met）から第 2 9 6 番目アルギニン（Arg）に SH3 ドメインを、および第 4 0 4 番目トレオニン（Thr）から第 5 0 0 番目アスパラギン（Asn）に GK ドメインを保有している。このことから、Protein - X は PSD - 9 5 が含まれる DLG 様 PDZ 蛋白質のホモログ（homolog）であると推定した（第 1 図を参照）。したがって、Protein - X は、PSD - 9 5 と同様の作用を持つと考えられ、膜受容体・イオンチャネル近傍に存在して器官（apparatus）を形成し、細胞間での情報伝達や神経伝達物質放出の制御に係わると想定される。

実際、Protein - X は、PSD - 9 5 と同様に PDZ ドメインで NMDA 受容体 / 2 B サブユニットと結合し、さらに NMDA 受容体のリガンド刺激によるシグナルに対して PSD - 9 5 よりも強い増幅作用を示した。すなわち、Protein - X は NMDA 受容体と複合体を形成し、NMDA 受容体のシグナル伝達を促進すると考えられる。しかし、Protein - X と PSD - 9 5 は保有する PDZ ドメイン数が異なり、PSD - 9 5 には 3 つ存在するのに対して、Protein - X においては 1 つである。このことから、Protein - X は PSD - 9 5 と異なる受容体シグナルを担う可能性がある。あるいは、Protein - X は、PSD - 9 5 様のシグナル伝達の補足や、PDZ ドメイン数による他の受容体等への結合選択性を現すことが考えられる

また、本発明においては、Protein - X の N 末端側 8 5 アミノ酸残基が欠失したポリペプチド（配列表の配列番号 2）を提供する。該ポリペプチドは、ヒト脳海馬由来長鎖 cDNA ライブラリーから得られた遺伝子クローン p j 0 2 6 7 7 がコードするものである。p j 0 2 6 7 7 は 4 3 7 0 塩基からなるポリヌクレオチド（配列表の配列番号 5）であり、4 9 1 アミノ酸からなるポリペプチド（配列表の配列番号 2）をコードする。p j 0 2 6 7 7 がコードするポリペプチドのアミノ酸配列は、Protein - X と比較して、N 末端側 8 5 アミノ酸残基が欠失している他は同一である。したがって、そのアミノ酸配列中に PDZ ドメイン、SH3 ドメイン、および GK ドメインをそれぞれ 1 つ保有しており、このことから Protein - X と同様に NMDA 受容体 / 2 B サブユニットと結合し、同様の生理活性を示すものと推定される。p j 0 2 6 7 7 は、脳、例えば小脳等、心臓、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、脊髄等、各種臓器で広範に発現していることを確認した。p j 0 2 6 7 7 は上記 h j 0 2 5 3 7 の 5 ' 末端側塩基配列が欠失したものと考えられることから、Protein - X 遺伝子も同様にこれらの臓器で発現していると考えられる。

一方、Protein - X と相互作用する蛋白質は、かずさ DNA 研究所のヒト脳由来長

10

20

30

40

50

鎖cDNA解析情報データベースから、ラットPSD95/SAP90-アソシエーティッドプロテイン-3(SAPAP-3)(GenBank:アクセッション番号:U67139)と96%の相同性を有する遺伝子として抽出したクローンPJ01087がコードする蛋白質である。当該蛋白質は、PJ01087遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを導入した大腸菌で発現させて得た。以下、この蛋白質をPJ01087蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子をPJ01087遺伝子と呼ぶ。また、PJ01087蛋白質をProtein-Yと称することもある。PJ01087遺伝子は3705塩基(配列表の配列番号6)からなり、そのORF全長は2940塩基、該遺伝子の遺伝子産物は979アミノ酸残基(配列表の配列番号3)からなる。また、PJ01087蛋白質は脳に特異的に発現していることが、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)および酵素免疫固相法(ELISA)により判明した。

10

PJ01087蛋白質は、Protein-Xの共存下でNMDA受容体からのシグナルを著しく増幅した。PJ01087蛋白質とProtein-Xとによる該シグナルの増幅は、Protein-X単独による増幅よりも格段に大きかった。一方、PSD-95の共存下ではPJ01087蛋白質による上記シグナルの増幅は認められなかった。これらから、PJ01087蛋白質がProtein-Xと相互作用すること、および該相互作用によりNMDA受容体リガンド刺激によるシグナル伝達が著しく増幅されることが判明した。

本明細書中で、PJ01087蛋白質がProtein-Xと相互作用するとは、両蛋白質がある様式により互いに作用を及ぼし、その結果、それぞれの蛋白質の機能が促進されることを意味する。それぞれの蛋白質の機能としては、例えば膜受容体・イオンチャネルの生理機能の促進、具体的には当該膜受容体の安定化や当該受容体のシグナル伝達の促進等が挙げられる。かかる膜受容体・イオンチャネルとしては、例えばNMDA受容体が例示できる。相互作用する様式としては、結合、一過性の結合、あるいは他の物質を介した複合体の形成等が例示されるが、これらに限定されない。PJ01087蛋白質とProtein-Xとの結合が免疫沈降法による分析では認められなかったことから、両蛋白質の相互作用は結合による様式ではなく、何らかの別様式によるものと考えている。

20

これらから、Protein-Xの過剰発現により、あるいはその生理活性、例えば他の蛋白質との相互作用やグアニレートキナーゼ活性の促進により、膜受容体、例えばNMDA受容体のシグナルの増幅が可能になると考えられる。また、Protein-Xの発現阻害により、あるいはその生理活性、例えば他の蛋白質との相互作用やグアニレートキナーゼ活性の阻害により、膜受容体、例えばNMDA受容体の異常シグナルを正常化できると考えられる。同様に、PJ01087蛋白質の過剰発現により、あるいはその生理活性の促進により、膜受容体シグナルの増幅が可能になる。また、PJ01087蛋白質の発現阻害により、あるいはその生理活性の阻害により、膜受容体の異常シグナルを正常化できる。すなわち、Protein-Xと膜受容体または当該受容体のシグナル伝達に關与する蛋白質等との相互作用の阻害または促進により、膜受容体のシグナル伝達等を調節することが可能である。ここで、「調節」とは、「阻害」または「促進」を意味する。また「促進」には、「増強」および「増幅」という意味も含まれる。例えば、Protein-XとNMDA受容体との相互作用の阻害または促進、あるいはProtein-XとPJ01087蛋白質との相互作用の阻害または促進により、NMDA受容体のシグナル伝達等を調節できる。したがって、Protein-X自体、PJ01087蛋白質自体、並びにそれらの発現あるいは生理活性の阻害剤および促進剤は、Protein-Xの異常、PJ01087蛋白質の異常、両蛋白質の異常、または両蛋白質の相互作用の異常に起因する疾患の防止、改善、または治療に適用できる。すなわち、これら疾患の防止剤、改善剤、または治療剤、および防止方法、改善方法、または治療方法に使用できる。かかる疾患として、例えばProtein-Xおよび/またはPJ01087蛋白質が係わる膜受容体のシグナル伝達等の異常に基づく疾患が挙げられる。具体的には、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病およびポリグルタミン病等を例示できるが、これらに限定されない。

30

40

50

(ポリペプチドまたはペプチド)

本明細書において、ポリペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドのうち、蛋白質等の長鎖ペプチドを意味し、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチドを単にペプチドという。本明細書においてはアミノ酸を3文字表記することもある。

本発明に係るポリペプチドは、Protein-X遺伝子の遺伝子産物であり、該遺伝子が大腸菌等の細胞で発現させて得られたポリペプチドである。また当該ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、化学合成して得られるポリペプチドや、細胞またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織に由来するポリペプチドであってもよい。当該ポリペプチドは、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列と同一、または実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドであり得る。配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、少なくともNMDA受容体/2Bサブユニットと結合し得るポリペプチドである限りは特に限定されず、例えば、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチドであり得る。あるいは、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のポリペプチドと、アミノ酸配列上で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有し、かつNMDA受容体/2Bサブユニットと結合し得るものであってもよい。さらに、グアニレートキナーゼ活性を有するものがより好ましい。加えて、PDZドメインを1つ保有するものがさらに好ましい。NMDA受容体/2Bサブユニットとの結合は、例えば後述する実施例に示したように、オーバーレイ法等の公知の方法により測定できる。また、グアニレートキナーゼ活性は自体公知の方法で測定できる。アミノ酸配列の相同性を決定する技術は自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNAの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が可能である。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。さらに、このように特定されたポリペプチドを基にして、NMDA受容体/2Bサブユニットとの結合および/またはグアニレートキナーゼ活性を指標にすることにより、1個以上、例えば1個乃至100個、好ましくは1個乃至30個、より好ましくは1個乃至20個、さらに好ましくは1個乃至10個、特に好ましくは1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、および/または挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが提供できる。これらポリペプチドも、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドに含まれる。このようなポリペプチドとして、例えば、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。上記変異を有するペプチドは天然に存在するものであってもよく、また変異を導入したものであってもよい。さらにまた、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用しないポリペプチドも、本発明の範囲に包含される。かかるポリペプチドは、Protein-Xと競合することにより、Protein-XとPJ01087蛋白質との相互作用を阻害すると推定できる。このため、かかるポリペプチドは、NMDA受容体のシグナル伝達を阻害できると考えられる。

本発明に係る別のポリペプチドは、PJ01087遺伝子の遺伝子産物であり、該遺伝子が大腸菌等の細胞で発現させて得られたポリペプチドである。また当該ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、化学合成して得られるポリペプチドや、細胞またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織に由来するポリペプチドであってもよい。当該ポリペプチドは、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列と同一、または実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドであり得る。配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、少なくとも配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチドである限りは特に限定されず、例えば、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチドであ

10

20

30

40

50

り得る。あるいは、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、アミノ酸配列上で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有し、かつ配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するものであってもよい。また、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下でNMDA受容体のシグナル伝達を増幅するものであってもよい。このとき、SAPAP-3のアミノ酸配列は本発明の範囲に含まれない。また、相互作用するペプチドは、蛋白質の立体構造から決まる構造単位で、しばしば機能単位としても働くモジュールの概念から考えると、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸配列を有するものも利用できる。モジュールのアミノ酸残基数は平均15として知られているが、抗原となり得る機能等を考えるとアミノ酸残基5個でも充分機能単位となり得ると考えている。配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用は、例えば当該ポリペプチド、被検対象であるポリペプチド、およびNMDA受容体を細胞に共発現させ、NMDA受容体のリガンド刺激による細胞内シグナル伝達を公知の方法を利用して測定することにより検定可能である(実施例4参照)。アミノ酸配列の相同性を決定する技術は自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNAの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が可能である。このように特定されたポリペプチドを基にして、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用、具体的には例えばNMDA受容体のシグナル伝達の促進、または配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下におけるNMDA受容体のシグナル伝達を増幅を指標にすることにより、1個以上、例えば1個乃至100個、好ましくは1個乃至30個、より好ましくは1個乃至20個、さらに好ましくは1個乃至10個、特に好ましくは1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、および/または挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが提供される。これらポリペプチドも、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドに含まれる。このとき、上記SAPAP-3のアミノ酸配列は本発明の範囲に含まれない。上記変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。

10

20

欠失、置換、付加、および/または挿入といった変異の導入方法は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR)を単独でまたは適宜組み合わせ、サンプルから編[モレキュラークロニング, アラボラトリーマニュアル 第2版]コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、1989年、村松正實編[ラボマニュアル遺伝子工学]丸善株式会社、1988年、エールリッヒ, HE. 編[PCRテクノロジー, DNA増幅の原理と応用]ストックトンプレス、1989年等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばウルマー(Ulmer)の技術[「サイエンス(Science)」、1983年、第219巻、p.666-]を利用することができる。このような変異の導入において、ポリペプチドの基本的な性質(物性、機能、生理活性または免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これらポリペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

30

40

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較して、その機能や作用がより促進されたものあるいは低下したものであり得る。例えば、NMDA受容体との複合体形成能、グアニレートキナーゼ活性、および/または配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用の程度が異なるものであり得る。より具体的には例えば、NMDA受容体のシグナル伝達を促進する機能の強度が異なるもの、例えば機能がより促進されたもの、あるいは機能が低下したものであり得る。

50

配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較して、その機能や作用がより促進されたものあるいは低下したものであり得る。例えば、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用の程度が異なるもの、例えば相互作用がより促進されたもの、あるいは相互作用が低下したものであり得る。より具体的には、例えばNMDA受容体のシグナル伝達を促進する機能の強度が異なるもの、例えば機能がより促進されたもの、あるいは機能が低下したものであり得る。

本発明の範囲には、上記ポリペプチドに別種の蛋白質または物質、例えばキャリア等を結合したものも包含される。例えば、本発明に係るポリペプチド等の検出または精製を容易にするために、または別の機能を付加するために、そのN末端側やC末端側に別種の蛋白質またはペプチド、例えばアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、イムノグロブリンG(IgG)等の免疫グロブリンFc断片、ヒスチジン-タグ(His-tag)またはフラッグ-タグ(FLAG-tag)等を、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的手法等の公知方法を用いて付加することもできる。

また、本発明は、配列表の配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドを包含する。当該部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、その最小単位として5個以上のアミノ酸、好ましくは8個以上のアミノ酸、より好ましくは12個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸からなるものである。例えば、Protein-XまたはPJ01087蛋白質の機能に関わる最小活性単位(領域またはドメイン)からなるポリペプチドまたはペプチドも本発明において提供される。上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、例えばProtein-Xおよび/またはPJ01087蛋白質の機能を阻害するために使用できる。具体的には例えば、NMDA受容体/2Bサブユニットと結合し得る上記ペプチドは、Protein-XとNMDA受容体/2Bサブユニットとの結合を阻害できる。また、例えば、Protein-XまたはPJ01087蛋白質の部分ペプチドであって、両蛋白質の相互作用に関与する領域を含むペプチドは、当該相互作用を阻害できる。あるいは、PJ01087蛋白質とProtein-Xの共存下におけるNMDA受容体のシグナル伝達の増幅を阻害できる。したがって、かかるペプチドは、NMDA受容体のシグナル伝達の促進を阻害することができる。また、上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、Protein-XまたはProtein-Xと同様の生理活性、例えばNMDA受容体/2Bサブユニットとの結合、グアニレートキナーゼ活性、および/またはPJ01087蛋白質との相互作用を有する上記ポリペプチドの生理活性を調節する物質の同定等に使用する試薬として有用である。さらに、PJ01087蛋白質またはPJ01087蛋白質と同様の生理活性、例えばProtein-Xとの相互作用を有する上記ポリペプチドの生理活性を調節する物質の同定等に使用する試薬として有用である。免疫学的に認識され得るペプチド、例えばエピトープペプチドであれば、後述するように、例えばProtein-XまたはPJ01087蛋白質に特異的な抗体を作成するための抗原として単独でまたはキャリア(例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白アルブミン)と結合して使用できる。

(ポリヌクレオチド)

一つの態様において、本発明に係るポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドをそれぞれコードする塩基配列またはその相補的塩基配列を含むポリヌクレオチドを意味する。例えば、配列表の配列番号1、配列番号2または配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列、またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドであり得る。好ましくは、配列表の配列番号4、配列番号5または配列番号6に記載の塩基配列、またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドである。本発明において、相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドを相補鎖と称することもあ

別の態様において本発明は、上記ポリヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号4、配

10

20

30

40

50

列番号5または配列番号6に記載の塩基配列、またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドの、対応する領域にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを包含する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック等編[モレキュラークロニング, ア ラボラトリーマニュアル 第2版]コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、1989年等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号4、配列番号5または配列番号6に記載の塩基配列、またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドに、ハイブリダイゼーションするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。例えば、配列表の配列番号4、配列番号5または配列番号6に記載の塩基配列、またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドに対する相同性において、少なくとも約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上のものであればよい。このとき、SAPAP-3遺伝子の塩基配列は本発明の範囲には含まれない。また本発明に係るポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチドの指定された塩基配列領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上のヌクレオチドからなる塩基配列または該塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを包含する。

10

これらポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチド等の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬または標準品としても利用できる。例えば、Protein-XまたはPJ01087蛋白質をコードする核酸、例えばその遺伝子またはmRNAの検出のためのプローブまたはプライマーとして、または遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として利用できる。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。ここで、上記本発明に係るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの選別は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性を指標にして実施できる。指標にする生理活性は、例えばNMDA受容体/2Bサブユニットとの結合、グアニレートキナーゼ活性、あるいは配列表の配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用等が挙げられる。相互作用は、例えばNMDA受容体のシグナル伝達を促進させる機能の測定により評価できる。具体的には、配列表の配列番号1および配列番号3に記載のそれぞれのアミノ酸配列からなる2種のポリペプチドの共存下で、NMDA受容体のシグナル伝達を増幅する機能を指標にして測定可能である。公知の蛋白質発現系としては、例えば、胚芽または家兔網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用した無細胞蛋白質発現系〔「ネイチャー(Nature)」、1957年、第179巻、p.160-161〕を例示できる。

20

30

(組換えベクター)

本発明に係るポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組込むことにより、組換えベクターが得られる。用いるベクターDNAは、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。また、目的により発現ベクターやクロニングベクター等を用いることができる。

40

組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製する。前記ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組込む方法は、自体公知の方法を適用

50

できる。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。

(形質転換体)

上記ポリヌクレオチドが組み込まれたベクターDNAを、自体公知の宿主に自体公知の方法で導入することにより形質転換体を得られる。宿主に導入するベクターDNAは、1種のベクターDNAであってもよく、2種以上のベクターDNAを導入してもよい。例えば、配列表の配列番号4に記載のポリヌクレオチドを含むベクターDNAと配列番号6に記載のポリヌクレオチドを含むベクターDNAの、一方を導入してもよいし、両方を導入することもできる。宿主としては、例えば大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞または動物細胞等が例示できる。遺伝子の導入を行う場合、より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、例えば、サムブルックら編[モレキュラークローニング, アラボラトリーマニュアル]コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、1989年等に記載されている標準的な方法により実施できる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(ballistic introduction)および感染等が挙げられる。

宿主に導入するベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを提供可能である。上記ポリヌクレオチドが組み込まれた発現ベクターDNAを導入した形質転換体は、各々の宿主に最適な自体公知の培養条件および培養方法で培養する。培養は、形質転換体により発現される本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの機能、例えばNMDA受容体/2Bサブユニットとの結合、グアニレートキナーゼ活性、あるいは配列表の配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を指標にして実施できる。あるいは、宿主中または宿主外に産生された該ポリペプチドまたはペプチド量を指標にして培養してもよく、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養を行ってもよい。

(ポリペプチドおよびペプチドの回収および/または精製)

上記形質転換体を培養した培地からの本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの回収および/または精製は、当該ポリペプチドまたはペプチドの機能、例えばNMDA受容体/2Bサブユニットとの結合、グアニレートキナーゼ活性、あるいは配列表の配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を指標にして実施できる。回収および/または精製の方法としては、硫酸やアルコール等を用いた溶解度差に基づく分画手段、ゲルろ過、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等が挙げられ、これらを単独でまたは組み合わせて使用する。好ましくは、回収および/または精製しようとするペプチドのアミノ酸配列の情報に基づき、これらに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作成し、該抗体を用いて特異的に吸着回収する方法を使用する。

(抗体)

抗体は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを抗原として用いて作製する。抗原は上記ポリペプチドまたは上記ペプチド、あるいはそれらの断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。上記ポリペプチドおよび/または上記ペプチドに特異的な抗体を作成するためには、該ポリペプチドまたは該ペプチドに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも上記ポリペプチドまたは上記ペプチドに記載のものと相同または同一である必要はなく、蛋白質の立体構造

上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は免疫学的に、上記ポリペプチドおよび/または上記ペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定できる。

抗体の産生には、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、上記抗原をアジュバントの存在下または非存在下で、単独でまたは担体に結合して動物に投与し、体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより抗体が得られる。担体はそれ自体が宿主に対して有害作用を示さずかつ抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) 等が例示される。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント (F C A)、フロイント不完全アジュバント (F I A)、R i b i (M P L)、R i b i (T D M)、R i b i (M P L + T D M)、百日咳ワクチン (B o r d e t e l l a p e r t u s s i s v a c c i n e)、ムラミルジペプチド (M D P)、アルミニウムアジュバント (A L U M)、およびこれらの組み合わせが例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得される。好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。

モノクローナル抗体は、上記免疫手段が施された動物から抗体産生細胞 (例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球) を回収し、自体公知の永久増殖性細胞 (例えば、P 3 - X 6 3 - A g 8 株等のミエローマ株) への形質転換手段を導入することにより生産できる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化し、上記ポリペプチドおよび/または上記ペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

かくして得られた上記ポリペプチドおよび/または上記ペプチドを認識して結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、上記ポリペプチドまたはペプチドの精製用抗体、試薬または標識マーカー等として利用できる。

上記ポリペプチドおよび/または上記ペプチドを認識して結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のうち、例えば、直接 P r o t e i n - X に結合してその生理活性、例えば N M D A 受容体等の他の蛋白質との結合活性、グアニレートキナーゼ活性、および/または P J 0 1 0 8 7 蛋白質との相互作用を阻害する抗体は、P r o t e i n - X および/またはその機能の異常に起因する各種疾患の解明、防止、改善、または治療のために有用である。また、例えば、直接 P J 0 1 0 8 7 蛋白質に結合して、その機能、例えば少なくとも P r o t e i n - X との相互作用を阻害するものは、P J 0 1 0 8 7 蛋白質および/またはその機能の異常に起因する各種疾患の解明、防止、改善、または治療に有用である。かかる抗体として例えば、P r o t e i n - X と P J 0 1 0 8 7 蛋白質の相互作用による、N M D A 受容体のシグナル伝達の促進を阻害する抗体が例示できる。より具体的には例えば、P r o t e i n - X と P J 0 1 0 8 7 蛋白質の共存下における、N M D A 受容体のシグナル伝達の増幅を阻害する抗体が挙げられる。

(化合物の同定方法)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを組み込んだベクター、該ベクターが導入されてなる形質転換体、これらを用いる蛋白質合成系、または該ポリペプチドおよび/または該ペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独でまたは複数を組み合わせることによって、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドの機能の阻害剤または促進剤、および/または上記ポリヌクレオチドの発現の阻害剤もしくは促進剤の同定に有効な方法を提供する。該方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。本発明に係る同定方法によれば、例えば上記ポリペプチドまたは上記ペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現の阻害剤または促進剤の選別、または

10

20

30

40

50

抗体を利用した抗体認識物質の選別等が可能である。

例えば、Protein - X に由来するポリペプチドまたはペプチドを用いて、被検化合物とこれらポリペプチドまたはペプチドとの間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下でこれらポリペプチドまたはペプチドと該化合物とを接触させて、その相互作用により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、Protein - X および Protein - X と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を促進する化合物または阻害する化合物を同定可能である。このとき、該ポリペプチドまたは該ペプチドと結合する他の蛋白質、例えば NMDA 受容体との相互作用を測定するアッセイ系を用い、ここに被検化合物を加えて当該相互作用により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、Protein - X と例えば NMDA 受容体との相互作用を促進する化合物または阻害する化合物を同定可能である。かかるアッセイ系は、自体公知のスクリーニングシステムを利用して構築可能であるが、例えば後述する実施例 3 に記載した方法が使用可能である。また、Protein - X のグアニレートキナーゼ活性を指標にして、該グアニレートキナーゼ活性を促進する化合物または阻害する化合物が同定できる。グアニレートキナーゼ活性の測定は、自体公知の方法により行うことができる〔クック (Cook, P. F.) ら「バイオケミストリー (Biochemistry)」、1982 年、第 21 巻、p. 5794 - ; ライト (Wright, D. E.) ら、「プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」、1981 年、第 78 巻、p. 6048 - ; コービン (Corbin, J. D.) ら「メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in enzymology)」、1974 年、第 38 巻、p. 287 -)。また、PJ01087 蛋白質に由来するポリペプチドまたはペプチドを用いて、上記同様に、PJ01087 蛋白質および同様の生理活性を有するポリペプチドの活性を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。Protein - X に由来するポリペプチドまたはペプチドと PJ01087 蛋白質に由来するポリペプチドまたはペプチドとを用いて、それらの相互作用を測定するアッセイ系を用い、ここに被検化合物を加えて当該相互作用により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、当該相互作用を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。具体的には、例えば Protein - X と PJ01087 蛋白質の相互作用による NMDA 受容体のシグナル伝達の促進を阻害する化合物またはさらに促進する化合物を同定可能である。あるいは、例えば Protein - X と PJ01087 蛋白質の共存下における NMDA 受容体のシグナル伝達の増幅を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。かかるアッセイ系は、自体公知のスクリーニングシステムを利用して構築可能であるが、例えば後述する実施例 6 に記載した方法が使用可能である。

10

20

30

また、本発明に係るポリヌクレオチドと被検化合物との間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下でこれらポリヌクレオチドと該化合物とを接触させて、該ポリヌクレオチドの発現を検出できるシグナルおよび / またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび / またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、これらポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。得られた化合物から、さらに形質転換体を用いた下記の方法により、これらポリヌクレオチド、例えば Protein - X または PJ01087 遺伝子の発現を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。

40

さらに、本発明に係る形質転換体を用いて、被検化合物または上記同定された化合物と適当な条件下で接触させ、本発明に係るポリヌクレオチド、例えば Protein - X 遺伝子または PJ01087 遺伝子の発現の有無または変化を検出することにより、該ポリヌクレオチド、例えば Protein - X 遺伝子または PJ01087 遺伝子の発現を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。Protein - X 遺伝子または PJ01087 遺伝子の発現の有無または変化の検出は、簡便には、発現される遺伝子産物の機能を測定することにより実施できる。例えば、Protein - X 遺伝子発現の有無または変化の検出は、グアニレートキナーゼ活性を指標として測定することにより実施で

50

きる。あるいは、Protein-X遺伝子またはPJ01087遺伝子の発現の有無または変化を検出するために、検出のためのシグナルまたはマーカーを使用する自体公知の系を導入し、このシグナルまたはマーカーの存在、不存在または変化を検出してもよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的性質または化学的性質により直接検出されるものを指し、マーカーとはそのものの物理的性質または生物学的性質を指標として間接的に検出されるものをいう。シグナルとしてはルシフェラーゼやグリーン蛍光蛋白質(GFP)等、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子等、または検出用のタグ、例えばHis-tag等、公知のものが利用できる。これらのシグナルまたはマーカーを目的の遺伝子配列に付加した後にベクターに組み込み、得られたベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を作成すればよい。また、これらのシグナルまたはマーカーの利用方法および検出方法は、当業者には周知のものである。

10

具体的には、例えば後述する実施例に準じてProtein-XまたはPJ01087蛋白質とHis-tagとの融合蛋白質を例えば大腸菌で発現させてHis-tagを検出する実験系において、ここに被検化合物を加えることにより、PJ01087蛋白質またはPJ01087蛋白質の発現または機能を阻害する化合物または促進する化合物を同定できる。

また別の具体例として、例えばProtein-X遺伝子、PJ01087蛋白質遺伝子およびNMDA受容体遺伝子を細胞に導入して共発現させ、被検化合物を加えて、NMDA受容体のリガンド刺激による細胞内シグナル伝達を公知の方法を利用して測定する方法が挙げられる。上記遺伝子を共発現させたかかかる細胞を用いれば、Protein-XまたはPJ01087蛋白質の機能を阻害する化合物または促進する化合物の他に、Protein-XまたはPJ01087蛋白質の発現を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。

20

上記例示した同定方法および実験系は、これらを具体的に説明するために例示したものであり、本発明に係る化合物の同定方法および該方法に用いる実験系はこれらに限定されない。

(PJ01087蛋白質とProtein-Xとの相互作用調節剤および医薬組成物)
本発明においては、Protein-XがNMDA受容体/2Bサブユニットと結合してNMDA受容体のシグナル伝達を増幅すること、並びにPJ01087蛋白質がProtein-Xの共存下で、膜受容体、例えばNMDA受容体のシグナル伝達を著しく増幅することを見出した。このことから、PJ01087蛋白質は、膜受容体・イオンチャネル、例えばNMDA受容体とそのリガンド等により刺激を受けると該受容体近傍に集積し、Protein-Xとの相互作用により、例えば当該受容体を安定化する、および/または、当該受容体のシグナル伝達を促進すると推察した。Protein-XおよびPJ01087蛋白質は、これらに関わる膜受容体、例えばNMDA受容体のシグナル伝達の結果引き起こされる生理機能、例えば神経伝達物質放出等に関わると考えられる。したがって、PJ01087蛋白質とProtein-Xの相互作用の阻害または促進により、PJ01087蛋白質およびProtein-Xに関わる生理機能、例えば少なくともNMDA受容体のシグナル伝達を調節することができる。また、NMDA受容体とProtein-Xとの結合の阻害または促進により、NMDA受容体のシグナル伝達を調節可能である。

30

40

かくして、本発明においては、Protein-XとNMDA受容体との結合を阻害するまたは促進する手段、および/または、Protein-XとPJ01087蛋白質の相互作用を阻害するまたは促進する手段を導入されたNMDA受容体のシグナル伝達の調節剤および調節方法を提供する。ここで、調節剤とは阻害剤、拮抗剤または促進剤等を総称的にいうものである。また調節方法とは、阻害方法または促進方法を意味する。Protein-XとNMDA受容体との結合の促進には、例えばProtein-X自体またはその遺伝子を用いることができる。Protein-Xおよび/またはPJ01087蛋白質の相互作用の促進には、これら蛋白質自体またはそれらの遺伝子を用いることがで

50

きる。例えば、Protein - XまたはProtein - XとPJ01087蛋白質を過剰発現させることにより、あるいはそれらの機能を促進することにより、Protein - XとNMDA受容体との結合またはProtein - XとPJ01087蛋白質の相互作用が促進されるため、NMDA受容体のシグナル伝達を促進することができる。Protein - XとNMDA受容体との結合の阻害、またはProtein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質の相互作用の阻害は、例えばProtein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質の発現を阻害することにより実現可能である。蛋白質発現の阻害、あるいはそれらの機能の阻害により受容体の異常シグナルを正常化できる。

Protein - XとNMDA受容体の結合、またはProtein - XとPJ01087蛋白質の相互作用を阻害または促進する手段としては、その他に、例えば上記方法により同定された化合物が挙げられる。当該化合物は、例えばProtein - XとNMDA受容体の結合の阻害剤または促進剤、Protein - XとPJ01087蛋白質の相互作用の阻害剤または促進剤として用いることができ、さらにNMDA受容体のシグナル伝達の阻害剤または促進剤として利用可能である。より具体的には、本発明に係るProtein - XとPJ01087蛋白質の共存下におけるNMDA受容体シグナル伝達の増幅の阻害剤または促進剤として利用可能である。阻害剤として使用できる化合物としては、本発明に係る上記ポリペプチドの機能に関わる最小活性単位（領域またはドメイン）からなるポリペプチドまたはペプチドであって、Protein - XとPJ01087蛋白質の相互作用を阻害できるものが例示できる。このようなポリペプチドまたはペプチドは、例えばPJ01087蛋白質のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法によって合成し、上記同定方法で試験することにより同定可能である。また、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用しないポリペプチドが阻害剤として利用できる。さらに、PJ01087蛋白質とProtein - Xの相互作用を阻害する抗体も上記化合物の1つとして例示できる。

上記選別された化合物、上記調節剤は、単独でまたは複数組み合わせる使用することにより、試薬として、あるいは医薬組成物の成分として使用できる。これらは、Protein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質、並びにそれらの遺伝子が関与する生体機能あるいは疾患の解明、例えばNMDA受容体のシグナル伝達機構の解明あるいはNMDA受容体のシグナル伝達異常に起因する疾患や神経変性疾患の解明に使用できる。

また、上記方法により同定された化合物は、Protein - XまたはProtein - Xと同様の生理活性を有するポリペプチドの活性、例えばNMDA受容体等の他の蛋白質との結合活性やグアニレートキナーゼ活性の調節剤、例えば阻害剤、拮抗剤または促進剤の候補化合物として利用可能である。また、Protein - XまたはProtein - Xと同様の生理活性を有するポリペプチドの遺伝子レベルでの発現に関する調節剤、例えば阻害剤、拮抗剤または促進剤の候補化合物としても利用可能である。あるいはPJ01087蛋白質またはPJ01087蛋白質と同様の生理活性を有するポリペプチドの活性、例えばProtein - Xとの相互作用の調節剤、例えば阻害剤、拮抗剤または促進剤の候補化合物として利用可能である。また、PJ01087蛋白質またはPJ01087蛋白質と同様の生理活性を有するポリペプチドの遺伝子レベルでの発現に関する調節剤、例えば阻害剤、拮抗剤または促進剤の候補化合物としても利用可能である。これらの発現を阻害する化合物としては、例えばProtein - X遺伝子またはPJ01087遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドが例示できる。当該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、Protein - X遺伝子またはPJ01087遺伝子の発現系を用いて、Protein - X遺伝子またはPJ01087遺伝子の塩基配列を基に設計したオリゴヌクレオチドから、Protein - X遺伝子またはPJ01087遺伝子の発現を特異的に阻害するものを選択することにより得られる。ここで「Protein - X遺伝子またはPJ01087遺伝子の発現を特異的に阻害する」とは、Protein - X遺伝子またはPJ01087遺伝子の発現を強く阻害し、他の遺伝子の発現は阻害しないか、または弱く阻害することを意味する。

10

20

30

40

50

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮してさらに選別することにより、医薬組成物として調製可能である。また、本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含むベクター、並びに本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を本発明に係るポリペプチドの発現や機能の異常に起因する各種病的症状、例えば神経変性疾患の解明、診断、防止、改善、または治療に使用できる。すなわち本発明は、上記物質を単独でまたは複数組み合わせる使用することにより、これらのうち少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供する。

発現の異常としては発現の過剰または低下が挙げられる。機能の異常としては、例えば、Protein - XとNMDA受容体の結合の異常、あるいはProtein - XとPJ01087蛋白質の相互作用の異常等が挙げられる。これら異常の結果として、例えばNMDA受容体のシグナル伝達の異常、具体的には例えばNMDA受容体シグナル伝達の過剰、低下または欠失等が起きる。神経変性疾患としては、次に挙げる例に限定されるものではないが、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病およびポリグルタミン病等が挙げられる。

また、Protein - Xは、PSD - 95が3つ有するPDZドメインを1つ有する。この1つのPDZドメインもNMDA受容体/2Bサブユニットと結合することが示されたことより、PSD - 95様のシグナル伝達の補足や、PDZドメイン数による他の受容体等への結合選択性を現すことが考えられる。この想定される機能に由来するシグナルの強化や異常シグナルの正常化の工夫も利用できる。

本発明に係るProtein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質の発現、および/またはその機能の低下または欠失等に関連する異常な症状の治療には、1つの方法としてProtein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質自体もしくはこれら蛋白質と同様の機能を有するポリペプチド、またはこれらをコードする遺伝子を活性化し治療上有効量の化合物を医薬上許容される担体とともに投与し、そのことにより異常な症状を改善することを特徴とする方法が挙げられる。あるいは、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞内でProtein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質自体もしくはこれら蛋白質と同様の機能を有するポリペプチドを生成させしめてもよい。遺伝子治療は、公知の方法が利用できるが、例えば、上記のごとく本発明に係るポリヌクレオチドを組み入れた複製欠損レトロウイルスベクターを作成して遺伝子治療に利用すればよい。また、例えば、目的とする蛋白質をコードしているDNAまたはRNAを用いて、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いることによりエクスピボ(ex vivo)において対象由来の細胞を処理し、次いで細胞を対象に導入することもできる。

Protein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質の発現、および/またはその機能が過剰である場合、有効量の上記阻害剤化合物を医薬上許容される担体とともに対象に投与してこれら蛋白質の機能、例えばProtein - XとNMDA受容体の結合、および/またはProtein - XとPJ01087蛋白質の相互作用によるNMDA受容体シグナル伝達の促進を阻害し、そのことにより異常な症状を改善することもできる。さらに、発現ブロック法を用いて内在性の当該ポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。細胞内で生成させた、あるいは別個に投与された当該遺伝子のアンチセンス配列からなるオリゴヌクレオチドを使用して当該遺伝子の発現を阻害できる。これらオリゴヌクレオチドは、上記本発明に係るポリヌクレオチドを基にして設計し合成できる。当該オリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは関連オリゴマーをインピボで発現させることもできる。

Protein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質の発現、および/または機能の過剰、低下もしくは欠失等の機能障害は、Protein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質が関わる生理機能、例えば膜受容体のシグナル伝達の結果引き起こされる神経伝達物質放出等の制御の異常をきたし、病的症状を引き起こす。したがって、本発明は、Protein - Xおよび/またはPJ01087蛋白質の関与する生体機能の解明、例えば細胞内シグナル伝達や神経伝達物質放出の制御の解明に有用である。さらに、本発明

10

20

30

40

50

は、Protein-Xおよび/またはPJ01087蛋白質の関与する細胞内シグナル伝達や神経伝達物質放出の制御の異常により引き起こされる疾患、例えばNMDA受容体のシグナル伝達異常に起因する疾患や神経変性疾患の、防止剤、改善剤、または治療剤および防止方法、改善方法、または治療方法、さらに該疾患の診断手段として用いる測定法に非常に有用なものである。

最近、ノックアウトマウスを用いた実験により、脳内の記憶再生メカニズムに関し知見が得られた。つまり、海馬のCA3領域のNMDA受容体が記憶再生に重要な役割を演じていた〔ナカザワ(Nakazawa, K.)ら、「サイエンス(Science)」、2002年、第297巻、第5579号、p.211-218〕。このNMDA受容体の機能は、その機能を正常化したり、亢進すると、記憶再生に関わる疾患、例えばアルツハイマー病等の記憶力が低下する症状を防止、改善、または治療できる。このことから本発明は、記憶再生に関わる疾患、例えばアルツハイマー病等の防止、改善、または治療に用いられる薬剤の開発を可能にする。

本発明に係る医薬組成物、調節剤、防止剤、治療剤、または改善剤の処方は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含むベクター、並びに本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体、上記化合物、上記調節剤、上記防止剤、上記治療剤、上記改善剤、または上記医薬組成物、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるがこれらに限らない。処方投与経路に適したものを選択すればよく、該処方投与経路は当業者によく知られている。これら医薬組成物、調節剤、防止剤、治療剤、または改善剤は、単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と一緒に使用してもよい。

本発明に係る医薬組成物、調節剤、防止剤、治療剤、または改善剤の投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方投与がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与もしくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲル等の形態での投与であってもよい。

必要な用量範囲は、本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含むベクター、並びに本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体、上記化合物、上記調節剤、上記防止剤、上記改善剤、上記治療剤、または上記医薬組成物の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1μg乃至100μgの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、抗体、または化合物等各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、またはシクロデキストリン等の包接体等の製剤化方法が利用できる。

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロースおよびマンニトール等の賦形剤、澱粉およびアルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレートおよびタルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースおよびゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトールおよびフラクトース等の糖類、PEG等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

10

20

30

40

50

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルム等）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油およびオリーブ油等の植物油並びにMCT等）、乳化剤（リン脂質等）等を混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトールおよび果糖等）が例示される。

10

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

（診断のための測定方法および試薬）

本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、または当該ポリペプチドもしくはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用できる。これらは試薬であるとき、緩衝液、塩、安定化剤、および/または防腐剤等の物質を含んであってもよい。本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または当該細胞や生体試料から調製したものであってもよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの機能、例えばNMDA受容体との結合、Protein-Xとの相互作用、またはPJ01087蛋白質との相互作用、または該相互作用における例えばNMDA受容体のシグナル伝達の増幅が阻害されなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質またはペプチド、例えば α -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tagまたはFLAG-tag等が、直接またはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加されたものであってもよい。本発明に係るポリヌクレオチドはその機能、例えばコードするポリペプチドの発現や、発現されたポリペプチドの機能が阻害されなければ、5'末端側や3'末端側に、ルシフェラーゼやグリーン蛍光蛋白質（GFP）等のシグナル、あるいはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子等のレポーター遺伝子が付加されたものでもよい。また本発明は、これらのうちの1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットを提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチドまたはペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

20

30

これら試薬および試薬キットは、本発明に係る同定方法に使用できる。また、当該試薬および試薬キットは、本発明に係るポリペプチド、ペプチドまたはこれらのいずれか1つをコードするポリヌクレオチドの定量的および/または定性的な測定に使用できる。当該測定のための方法は、当業者に周知の方法を利用して構築できる。ポリペプチドまたはペプチドの測定に利用できる方法としては、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等を例示できる。また、ポリヌクレオチドは、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブロットティングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて核酸レベル、例えばRNAレベルで検出および定量が可能である。

40

上記試薬、試薬キットおよび測定方法は、本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、例えばProtein-Xおよび/またはPJ01087蛋白質の発現、およびそれらの機

50

能の異常に起因する疾患の検出方法に適用できる。または、これらをコードするDNAの変異等に起因する各種病的疾患の検出方法に使用できる。当該疾患としては、例えば神経変性疾患、より具体的には、アルツハイマー病、パーキンソン病およびポリグルタミン病が例示できる。

測定される試料は、個体由来の、例えば細胞、血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等が挙げられる。また、測定される核酸は上記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを、標識した本発明に係るポリペプチドをコードするDNAにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定できる。

すなわち、個体由来の試料について、例えば当該ポリペプチドまたは当該ペプチドをコードするポリヌクレオチドとの相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在を検出すること、その存在量を決定すること、および/またはその変異を同定すること、並びに当該ポリペプチドまたはペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、当該ポリペプチドまたはペプチドの存在を検出すること、その存在量を決定すること、および/またはその変異を検出することによって、上記疾患の診断が可能である。

さらに、本発明に係るポリペプチドもしくはペプチドまたはこれらのいずれか1つをコードする核酸を診断マーカーとして定性的にあるいは定量的に測定することにより、上記疾患の検査および診断が可能である。すなわち、上記検出方法を利用して、さらに上記疾患の検査方法または診断方法が実施可能である。

実施例

以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(新規PSD遺伝子(Protein-X遺伝子)の単離・同定)

本発明に係るProtein-X遺伝子は、かずさDNA研究所のヒト脳由来長鎖cDNA解析情報データベースから、バイオインフォマティクス(bioinformatics)により、PDZドメイン、SH3ドメインおよびGKドメインを有する遺伝子として抽出したクローンhj02537に基づいて、ヒト脳由来mRNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により作成したcDNAを鋳型としてクローニングを行うことにより、生体におけるその発現を確認した。

まず、ヒト脳由来mRNAを用い、スーパースク립トII(Superscript II)キット(Gibco BRL社)を使用して逆転写反応を行った。ヒト脳由来mRNA(1 μ g/ μ l)0.2 μ l、オリゴ(dT)プライマー(0.5 μ g/ μ l)1 μ l、H₂O 10.8 μ lを混合し、70 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、氷冷後に5 \times ファーストストランドバッファー(First strand buffer)4 μ l、0.1M ジチオスレイトール(DTT)2 μ l、10mM デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)ミックス 1 μ lを添加した。続いてスーパースク립トII(200U/ μ l)を1 μ l添加し、室温で10分間、42 $^{\circ}$ Cで50分間、70 $^{\circ}$ Cで15分間反応させて、cDNAを調製した。

つぎに、クローンhj02537の塩基配列に基づいて、下記プライマーを設計して合成した。プライマーの配列中、下線で示したATGは翻訳開始コドンである。

<プライマー>

Pr-HJf (配列番号7):

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA
ATGCCAGCTTTGTCAACGG-3'

Pr-HJr (配列番号8):

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGGTC
 CATCTTGGAGATAGAGCGG-3'

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) はアドバンテージ2 PCRキット (Advantage 2 PCR kit) (Clontech社) を用いて行った。10x アドバンテージ2 PCRバッファー2 μ l、上記Pr-HJf (53.09 pmol/ μ l) 0.2 μ l、上記Pr-HJr (38.59 pmol/ μ l) 0.3 μ l、上記調製したcDNAを1 μ l、1.25 mM dNTPミックス1.6 μ l、50x ポリメラーゼミックス0.4 μ l、H₂O 14.5 μ lを混合し (合計20 μ l)、下記条件でPCR反応を行った。

10

< PCR運転条件 >

前ステップ (pre)	95°C	1分間
ステップ1	95°C	30秒間
ステップ2	68°C	2分間
(ステップ1~2を25サイクル)		
後ステップ (post)	68°C	5分間

得られたPCR産物を用いて、ゲイトウェイシステム (Gateway system) (Invitrogen社) を使用してクローニングを行った。PCR産物16 μ lをTEバッファーで100 μ lとし、30% PEG8000/30 mM MgCl₂を50 μ l添加して、室温で遠心 (15,000 rpmで10分間) した後、ペレットを70%エタノールで洗浄して乾燥し、TEバッファー30 μ lに溶解した。その後、BPクローナーゼ反応バッファー (clonase reaction buffer) 1 μ l、PCR産物1 μ l、エンリーベクター (entry vector) (pDONR201:150 ng/ μ l) 0.5 μ l、TEバッファー1.5 μ lを氷上で混合し (合計4 μ l)、BPクローナーゼ酵素ミックス (clonase enzyme mix) を1 μ l添加後、25°Cで4.5時間反応させた。反応後、プロテイナーゼK (proteinase K) を0.5 μ l添加し、37°Cで10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1 μ lをコンピテント細胞 (competent cell) JM109にトランスフォーメーション (transformation) し、pDONR201/hj02537#7およびpDONR201/hj02537#9を得た。これらクローンの塩基配列から、脳における発現が確認された。

30

実施例2

(新規PSD (Protein-X) の発現)

Protein-Xを発現させるために、大腸菌発現ベクターおよび発現系をゲイトウェイシステム (Invitrogen社) を用いて構築した。クローンhj02537を鑄型とし、アドバンテージ2 PCRキットを用いて蛋白質翻訳領域の増幅を行った。10x アドバンテージ2 PCRバッファー2 μ l、実施例1で作成したPr-HJf (53.09 pmol/ μ l) 0.2 μ lおよびPr-HJr (38.59 pmol/ μ l) 0.3 μ l、クローンhj02537 (1 ng/ μ l) 2 μ l、1.25 mM dNTPミックス1.6 μ l、50x ポリメラーゼミックス0.4 μ l、H₂O 13.5 μ lを混合し (合計20 μ lを2本調製した)、実施例1と同様にPCR反応を行った。

40

PCR産物35 μ lをTEバッファーで100 μ lとし、30% PEG8000/30 mM MgCl₂を50 μ l添加し、室温で遠心 (15,000 rpmで10分間) 後、

50

ペレットを70%エタノールで洗浄して乾燥し、TEバッファ-50 μ lに溶解した。その後、BPクロナーゼ反応バッファ-1 μ l、PCR産物1 μ l、エンターベクター(pDONR201:150ng/ μ l)0.5 μ l、TEバッファ-1.5 μ lを氷上で混合し(合計4 μ l)、BPクロナーゼ酵素ミックスを1 μ l添加後、25 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。反応後にプロテイナーゼKを0.5 μ l添加し、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1 μ lをコンピテント細胞(JM109)にトランスフォーメーションし、pDONR201/hj02537#1を得た。

次にpDONR201/hj02537#1を用い、6xHis-tagとの融合蛋白質としてProtein-Xを発現するベクターを構築した。LRクロナーゼ反応バッファ-1 μ l、pDONR201/hj02537#1(50ng/ μ l)1 μ l、6xHis-tag発現ベクター(pDEST17:150ng/ μ l)0.5 μ l、TEバッファ-1.5 μ lを氷上で混合し(合計4 μ l)、LRクロナーゼ酵素ミックスを1 μ l添加後、25 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。反応後にプロテイナーゼKを0.5 μ l添加し、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1 μ lをコンピテント細胞(BL21-SI)にトランスフォーメーションし、3クローン(pDEST17/hj02537#9、pDEST17/hj02537#10、pDEST17/hj02537#11)を得た。

上記3クローンについて、NaClによる目的蛋白質の産生誘導の有無および可溶性蛋白質の調製について検討した。各大腸菌を、アンピシリンを含むLB培地(以下、LB-Ampという)であってNaCl非添加(NaCl-)のもの2mlで37 $^{\circ}$ Cにて一晩振とう培養した。この前培養液を300 μ l添加したLB-Amp(NaCl-)合計3mlで37 $^{\circ}$ Cにて2時間振とう培養後、5M NaClを180 μ l添加し(終濃度0.3M)、さらに37 $^{\circ}$ Cで2時間振とう培養した。コントロールとしてNaClの代わりにH₂Oを180 μ l添加して同様に培養した。その後、培養液を1.2mlずつサンプリングしたものを2本作製して遠心(4 $^{\circ}$ Cにて15,000rpmで10分間)し、上清(以下、可溶性画分という)とペレットとに分けた。該ペレットは2% SDS/20mM Tris(pH7.4)または20mM Tris(pH7.4)200 μ lにけん濁後、超音波処理し、再度遠心(10 $^{\circ}$ Cまたは4 $^{\circ}$ Cにて15,000rpmで10分間)した。この遠心上清(以下、不溶性画分ということもある)を10% -メルカプトエタノール(ME)を含む2x サンプルバッファ-〔2% SDS/50mM Tris(pH6.8)/30% グリセロール/0.01% ブロモフェノールブルー(BPB)〕と等量ずつ混合し、2分間煮沸後、7.5% ポリアクリルアミドゲルにてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、クマシーブリリアントブルー(CBB)染色により蛋白質を検出した。また、上記可溶性画分についても同様にSDS-PAGEにより蛋白質の検出を行った。その結果、第2図に示すように、ヒトProtein-Xと、6xHis-tagとの融合蛋白質と思われる約65.8kDaのバンドが検出された。当該融合蛋白質は、上記培養された大腸菌の可溶性画分には少なく(第3図)、不溶性画分に多量に存在すると考えられた。

Protein-Xと6xHis-tagとの融合蛋白質の可溶性画分での発現を検討するため、上記大腸菌の培養を25 $^{\circ}$ Cで行った。各大腸菌をLB-Amp(NaCl-)2mlで25 $^{\circ}$ Cにて一晩振とう培養した。この前培養液を200 μ l添加したLB-Amp(NaCl-)合計2.2mlで25 $^{\circ}$ Cにて4時間振とう培養後、5M NaClを132 μ l添加し(終濃度0.3M)、さらに25 $^{\circ}$ Cで2時間振とう培養した。コントロールとして、NaClの代わりにH₂Oを132 μ l添加して同様に培養した。その後、培養液を1mlずつサンプリングしたものを2本調製して遠心し(4 $^{\circ}$ Cにて15,000rpmで10分間)、上清とペレットとに分けた。ペレットを2% SDS/20mM Tris(pH7.4)および20mM Tris(pH7.4)200 μ lにけん濁し、超音波処理後に再度遠心(10 $^{\circ}$ Cまたは4 $^{\circ}$ Cにて15,000rpmで10分間)した。遠心上清を10% -MEを含む2x サンプルバッファ-と等量ずつ混合し、2分間煮沸後、7.5% ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行い、上記同様に融合

10

20

30

40

50

蛋白質を検出した。第4図に示すように、25における培養では、Protein-Xと6×His-tagとの融合蛋白質は可溶性画分にも発現された。

上記のようにクローンhj02537を基にして得られたヒトProtein-Xは、配列表の配列番号1に記載したように576残基のアミノ酸からなり、そのアミノ酸配列の第139番目Ileから第219番目GlyにPDZドメイン、第231番目Metから第296番目ArgにSH3ドメイン、第404番目Thrから第500番目AsnにGKドメインを有していた。

実施例3

(新規PSD(Protein-X)のNMDA受容体/2Bサブユニットへの結合) Protein-XのNMDA受容体/2Bサブユニットへの結合作用を、オーバーレイ(Overlay)法により検討した。

まず、Protein-Xと6×His-tagとの融合蛋白質を発現する大腸菌(pDEST17/hj02537#11)をLB-Amp(NaCl-)2mlで25にて一晚培養した。この前培養液を200μl添加したLB-Amp(NaCl-)合計2.2mlで25にて4時間本培養後、5M NaClを132μl添加(終濃度0.3M)し、さらに25で2時間培養して、Protein-Xの産生を誘導した。培養後に大腸菌を集菌して、抽出バッファ(1% TritonX/10mM Tris(pH 7.5)/150mM NaCl/1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド))を200μl添加し、超音波処理後に、氷上で20分間インキュベーション後、遠心(4にて15,000rpmで10分間)した。遠心上清を回収し、Protein-Xを含む試料として用いた。また、遠心上清の一部を用い、実施例2に記載したのと同様にSDS-PAGEを行って、Protein-Xの発現と発現量をウェスタンブロットティング法により確認し(第5図)、用いる試料の量を決定した。ウェスタンブロットティングは以下のように行った。まず、泳動後に、湿潤化(wetting)処理したPVDF転写膜(transfer membrane)にセミドライ法で転写し(100mAで1時間)、5% スキムミルク/TBS-Tで室温にて1時間ブロッキングした。その後、マウス抗His抗体(Amersham pharmacia biotech社)を5% スキムミルク/TBS-Tで1000倍希釈して添加し、室温にて1時間反応させた。反応後、該転写膜をTBS-Tを用いて室温で10分間洗浄し、該洗浄を3回行った後に、二次抗体[抗マウスIgG抗体-ホースラディッシュパーオキシダーゼ(HRP)(Cell signaling社)]を5% スキムミルク/TBS-Tで3000倍希釈して添加し、室温にて1時間反応させ、その後TBS-Tによる10分間洗浄を室温で3回行った。その後、ECLキットおよびハイパーフィルム(Hyper film)を用いてシグナルを検出した。

ネガティブコントロールとして用いるために、NMDA受容体/2Bサブユニットとの結合領域であるPDZドメインを欠失させた変異体(mutant)を発現する大腸菌pDEST17/hjPDZ(-)#2を後述するように作製し、LB-Amp(NaCl-)2mlで37にて一晚培養した。この前培養液を200μl添加したLB-Amp(NaCl-)合計2.2mlで37にて4時間本培養後、H₂Oを132μl添加し、さらに37で2時間培養して、Protein-X変異体の産生を誘導した。培養後大腸菌を集菌して、上記同様に処理してProtein-X変異体を含む試料を調製した。また、上記同様にその発現と発現量を確認した(第5図)。

GSTとNMDA受容体/2Bサブユニットとの融合蛋白質(以下、GST-NMDA受容体/2Bサブユニットということもある)を発現する大腸菌pDEST15/NMDA receptor#5を後述するように作製し、LB-Amp(NaCl-)2mlで37にて一晚培養した。この前培養液を300μl添加したLB-Amp(NaCl-)合計3mlで37にて4時間本培養後、5M NaClを180μl添加し(終濃度0.3M)、さらに37で2時間培養して、GSTとNMDA受容体/2Bサブユニットとの融合蛋白質の産生を誘導した。コントロールとしてNaClの代わりにH₂Oを添加して同様に培養した。培養後に大腸菌を集菌して、2% SDS/20mM Tris(

10

20

30

40

50

pH 7.5) を 200 μ l 添加して超音波処理した後に遠心 (10 にて 15,000 rpm で 10 分間) した。遠心上清を回収し、NMDA 受容体 / 2B サブユニットを含む試料として用いた。また、目的とする蛋白質の発現と発現量を確認するために、遠心上清の一部を採り、2% SDS / 20 mM Tris (pH 7.5) で $\times 1$ 倍、 $\times 1/2$ 倍希釈した。希釈した各遠心上清と 10% - ME を含む 3 \times サンプルバッファー (NEB 社) を 2 : 1 の割合で混合し、2 分間煮沸後に 5% - 20% のポリアクリルアミドゲルで泳動した。泳動後、湿潤化処理した PVDF 転写膜 [Poly screen (NEN 社)] に転写し (液槽、300 mA で 1.5 時間)、5% スキムミルク / TBS - T (TBS - T : 10 mM Tris (pH 7.5) / 150 mM NaCl / 0.05% Tween 20) で室温にて 1 時間ブロッキングした。その後、ヤギ抗 GST 抗体 (Amersham pharmacia biotech 社) を 5% スキムミルク / TBS - T で 1000 倍希釈して添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後に、該転写膜を TBS - T を用いて室温にて 10 分間洗浄し、該洗浄を 3 回行った後に、二次抗体 (抗ヤギ IgG 抗体 - HRP) (Santa cruz biotechnology 社) を 5% スキムミルク / TBS - T で 2000 倍希釈して添加し、室温にて 1 時間反応させ、その後 TBS - T による 10 分間洗浄を室温で 3 回行った。その後 ECL キットおよびハイパーフィルム (Amersham pharmacia biotech 社) を用いてシグナルを検出した (第 6 図)。

10

また、ネガティブコントロールとして用いるため、GST のみを発現する大腸菌 DH5 (Amersham pharmacia biotech 社の pGEX - 4T - 3 由来) を LB - Amp 8 ml で 37 にて一晩培養した。この前培養液を 2 ml 添加した LB - Amp 合計 22 ml で、OD 600 が 1.0 前後となるまで 37 にて 1.5 時間本培養した後に、500 mM IPTG (イソプロピル 1 - チオ - - D - ガラクトシド) を 42 μ l 添加 (終濃度 1 mM) し、さらに 37 で 2 時間培養した。培養後 1.5 ml ずつサンプリングして集菌した。この大腸菌に上記同様の処理を行い、得られた遠心上清を試料として用いた。また、目的とする蛋白質の発現と発現量を確認するために、遠心上清の一部を採り、2% SDS / 20 mM Tris (pH 7.5) で $\times 1/40$ 、 $\times 1/80$ 、 $\times 1/160$ 、 $\times 1/320$ 、 $\times 1/640$ 、 $\times 1/1280$ 倍に希釈した。希釈した各遠心上清を用いて、上記同様に GST の発現を確認した (第 7 図)。

20

次に、オーバーレイ法により Protein - X と NMDA 受容体 / 2B サブユニットとの結合について検討した。上記調製した GST - NMDA 受容体 / 2B サブユニット (NaCl により誘導したものと未誘導のもの) または GST を含む試料は、発現量を上記のようにウェスタンブロットングで確認した結果 (第 6 図および第 7 図) に基づいて、GST - NMDA 受容体 / 2B サブユニット (誘導、未誘導) を含む試料は原液を、GST を含む試料は 2% SDS / 20 mM Tris (pH 7.5) で 640 倍希釈したものをを用いた。各試料と 10% - ME を含む上記 3 \times サンプルバッファー (NEB 製) を 2 : 1 の割合で混合して 2 分間煮沸後、5% - 20% のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。泳動後、湿潤化処理した PVDF 転写膜に転写 (液槽、300 mA で 1.5 時間) し、5% スキムミルク / TBS - T で室温にて 2 時間ブロッキングした。

30

次いで、上記調製した Protein - X を含む試料 20 μ l と抽出バッファー 40 μ l、または上記調製した Protein - X 変異体を含む試料 60 μ l にそれぞれ 1 mM PMSF / TBS - T を 3 ml 添加して混合した。コントロールとして、抽出バッファー 60 μ l に 1 mM PMSF / TBS - T を 3 ml 添加して混合したものをを用いた。各混合物を用いて、上記各転写膜に 4 で 2 時間反応させて結合させた。その後、TBS - T による 5 分間の洗浄を室温にて 3 回を行い、再度 5% スキムミルク / TBS - T で室温にて 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、マウス抗 His 抗体 (Amersham pharmacia biotech 社) を 5% スキムミルク / TBS - T で 1000 倍希釈して添加し、室温にて 1 時間反応させた。反応後に、転写膜を TBS - T を用いて室温にて 10 分間洗浄し、該洗浄を 3 回行った後、二次抗体 (抗マウス IgG 抗体 - HRP) (Cell signaling 社) を 5% スキムミルク / TBS - T で 3000

40

50

倍希釈して添加し、室温にて1時間反応させ、TBS-Tによる10分間の洗浄を室温で3回行った。その後ECLキットおよびハイパーフィルムを用いてシグナルを検出した。その結果、Protein-Xを結合させた転写膜において、全長GST-NMDA受容体/2Bサブユニットのバンドの位置(189.2kDa)にシグナルが検出されたことから、Protein-XとNMDA受容体/2Bサブユニットとの結合が認められた。コントロールおよびProtein-X変異体を用いたときにはシグナルは検出されず、すなわち結合は確認されなかった(第8図)。またGSTに対する結合を検討した転写膜ではいずれもバンドは検出されず、GSTに対する結合は確認されなかった(第9図)。これらのことから、Protein-XはそのPDZドメインでNMDA受容体/2Bサブユニットと結合していることが示唆された。また、NMDA受容体/2Bサブユニットは分解しやすい蛋白質であることが第6図から示唆されたが、上記実験の結果から全長NMDA受容体/2Bサブユニットのバンドの位置でのみシグナルが検出されたこと(第8図)、並びにGSTがN末に位置しているということから、Protein-Xとの結合領域はNMDA受容体/2BサブユニットのC末端であることが予想され、これは文献情報と一致していた〔ナガノ(Nagano, T.)ら、「ジャーナル オブ バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)」、1998年、第124巻、p.869-875〕。PDZドメインを持つ蛋白質は標的蛋白質のC末端3残基のアミノ酸がセリン(Ser)あるいはトレオニン(Thr)、その次は他のアミノ酸、その次がバリン(Val)(SXVまたはTXV)の配列(tSXVモチーフ)を認識する。本実施例で用いたNMDA受容体/2BサブユニットのC末端アミノ酸配列はSDVであった。

10

20

(新規PSD(Protein-X)変異体の調製)

Protein-XからNMDA受容体/2Bサブユニットとの結合領域であるPDZドメインを欠失させた変異体の調製は、下記のように行った。

まず、クローンhj02537の塩基配列に基づいて、下記プライマーを設計して合成した。

<プライマー>

Pr-Dpdz-F1 (配列番号9):

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTG
CAGCAAAGAGGAGACACCATCAA-3'

つぎに、クローンhj02537を鋳型としてアドバンテージ2 PCRキットを用いてPCRを行った。10x アドバンテージ2 PCRバッファー 2μl、Pr-Dpdz-F1(58.64pmol/μl)0.2μl、Pr-Hjr(38.59pmol/μl)0.3μl、クローンhj02537(1ng/μl)1μl、1.25mM dNTPミックス 1.6μl、50x ポリメラーゼミックス 0.4μl、H₂O 14.5μlを混合し(合計20μl)、実施例1に記載の条件でPCR反応を行った。その後、PCR産物16μlをTEバッファーで50μlとし、30% PEG8000/30mM MgCl₂を25μl添加して、室温で遠心(15,000rpmで10分間)した後に、ペレットを70%エタノールで洗浄して乾燥し、TEバッファー30μlに溶解した。その後、BPクロナーゼ反応バッファー1μl、PCR産物1μl、エンターベクター(pDONR201:150ng/μl)0.5μl、TEバッファー1.5μlを氷上で混合(合計、4μl)し、BPクロナーゼ酵素ミックスを1μl添加後、25℃にて2.7時間反応させた。反応後、プロテイナーゼKを0.5μl添加して37℃にて10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1μlをコンピテント細胞(DH5α)にトランスフォーメーションし、pDONR210/hjPDZ(-)#2を得た。

40

続いて、pDONR210/hjPDZ(-)#2を用い、PDZドメインを欠失させたProtein-X変異体と6xHis-tagとの融合蛋白質を発現するベクターを構

50

築した。LRクロナーゼ反応バッファー1 μ l、pDONR201/hjPDZ(-)#2(50ng/ μ l)1 μ l、6xHis-tag発現ベクター(pDEST17:150ng/ μ l)0.5 μ l、TEバッファー1.5 μ lを氷上で混合し(合計4 μ l)、LRクロナーゼ酵素ミックスを1 μ l添加後25 $^{\circ}$ Cで0.5時間反応させた。反応後にプロテイナーゼKを0.5 μ l添加し、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1 μ lをコンピテント細胞(BL21-SI)にトランスフォーメーションし、3クローン[pDEST17/hjPDZ(-)#1、pDEST17/hjPDZ(-)#2、pDEST17/hjPDZ(-)#3]を得た。

上記3クローンについて、NaClによる目的蛋白質の産生誘導の有無および可溶性蛋白質の調製について検討した。各大腸菌をLB-Amp(NaCl-)2mlで37 $^{\circ}$ Cにて一晩振とう培養した。この前培養液を300 μ l添加したLB-Amp(NaCl-)合計3.3mlで37 $^{\circ}$ Cにて2時間振とう培養した後、5M NaClを180 μ l添加(終濃度0.3M)し、さらに37 $^{\circ}$ Cにて2時間振とう培養した。コントロールとしてH₂Oを180 μ l添加して同様に培養した。その後、培養液を1.5mlずつサンプリングしたものを2本調製して遠心(4 $^{\circ}$ Cにて15,000rpmで10分間)し、ペレットを2% SDS/20mM Tris(pH7.4)および20mM Tris(pH7.4)150 μ lにけん濁して、超音波処理後に再度遠心(10 $^{\circ}$ Cまたは4 $^{\circ}$ Cにて15,000rpmで10分間)した。遠心上清を10% -MEを含む2x サンプルバッファーと等量ずつ混合し、2分間煮沸後に5%-20%ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行い、実施例2と同様に目的蛋白質の検出を行った。その結果、第10図に示すように、ヒトProtein-X変異体蛋白質と6xHis-tagとの融合蛋白質と思われる約41.7kDaのバンドが検出された。当該融合蛋白質は、上記培養された大腸菌の可溶性画分にも不溶性画分にも認められた。さらに、培養を25 $^{\circ}$ Cで行ったときにも可溶性画分にその発現が認められた(第11図)。

(NMDA受容体/2Bサブユニットの調製)

NMDA受容体/2Bサブユニットの調製は、その一部を含むクローンfj07108(かずさDNA研究所)を用いて、下記のように行った。クローンfj07108はN末側347アミノ酸残基が欠けていたため、まずこの領域を、ヒト脳由来mRNAを鋳型として、RT-PCRによりサブクローニングした。

ヒト脳由来mRNAをスーパースクリプトIIでオリゴ(dT)プライマーおよびランダムプライマーを用いて逆転写したcDNAを鋳型として、開始コドン上流および組換えを勘案してクローンfj07108の第352番目のAflII部位下流の塩基配列に基づいてPCR用プライマー[下記Pr-NMDAR2Bf、Pr-NMDAR2B(RV)]を設計し、アドバンテージ2 PCRキットを使用して、実施例1と同様にPCRを行った。その後、PCR産物をBKLキット(TaKaRa社)を用いて平滑末端化およびリン酸化処理し、pBluescript(SK-)(SmaI消化)に導入後、pBS(SK-)/NMDAr-N#10、pBS(SK-)/NMDAr-N#25を得た。塩基配列の確認を行ったところ、pBS(SK-)/NMDAr-N#10はPCRによる変異が2箇所存在していたがアミノ酸置換には至らなかった。しかし、塩基配列中第144bp目のグアニン(G)が1bp欠失していたため、pBS(SK-)/NMDAr-N#25を用い、その領域の下流に存在するSmaI部位およびpBluescript(SK-)のBamHI部位を利用して組み換えを行い、新たにpBS(SK-)/NMDAr-N#3を得た。その塩基配列を確認したところ、GenBankに登録されているNMDA受容体/2Bサブユニット(アクセッション番号:NM_000843)と一致した。

<プライマー>

10

20

30

40

Pr-NMDAR2Bf (配列番号10):

5' -TTTGGCTTCTACAAACCAAGGGAG-3'

Pr-NMDAR2B (RV) (配列番号11):

5' -TCCAATCATACCATTCAGGTTCCA-3'

その後、クローンfj07108のマルチクローニングサイト(MCS)(pBluescript)をXhoI消化後、ブランディングキット(Blunting kit)(Takara社)を用いて平滑末端処理し、AflII消化した。次に、pBS(SK-)/NMDAr-N#3のMCSをXbaI消化して平滑末端処理後にAflII消化した約1.5kbp断片を、上記AflII消化したクローンfj07108に導入してpBS/NMDAr#2を得た。pBS/NMDAr#2は全長NMDA受容体/2Bサブユニットを含有するベクターである。

10

上記pBS/NMDAr#2を鋳型としてアドバンテージHF2PCRキット(Clontech社)を用い、目的遺伝子の蛋白質翻訳領域の増幅を行った。プライマーはNMDA受容体/2Bサブユニットの全長塩基配列から設計し、合成した。10xアドバンテージHF2PCRバッファー 2.5μl、Pr-2Bf(52.94pmol/μl)0.4μl、Pr-2Br(37.44pmol/μl)0.6μl、pBS/NMDAr#2(0.48μg/μl)0.2μl、dNTPミックス 2.5μl、50xポリメラーゼミックス 0.5μl、H₂O 18.3μlを混合(合計25μl)し、PCRを行った。

20

<プライマー>

Pr-2Bf (配列番号12):

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA
ATGAAGCCCAGAGCGGAG-3'

Pr-2Br (配列番号13):

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
CTGTTCCCTCACTCAGAC-3'

<PCR運転条件>

前ステップ(pre)	95℃	1分間
ステップ1	95℃	30秒間
ステップ2	58℃	30秒間
ステップ3	72℃	5分間
	(ステップ1~3を2サイクル)	
ステップ4	95℃	30秒間
ステップ5	68℃	5分間
	(ステップ4~5を20サイクル)	
後ステップ(post)	68℃	5分間

次にPCR産物を電気泳動(1%アガロースゲル)して目的遺伝子の約4.5kbpバンドを分離し、Gen elute EtBr minus spin column(SIGMA社)で抽出、精製、乾燥後、TEバッファー10μlに溶解した。続いてTEバッファーで100μlとし、30%PEG8000/30mM MgCl₂を50μl添加し、室温で遠心(15,000rpmで10分間)後、ペレットを70%エタノールで洗浄して乾燥し、TEバッファー20μlに溶解した。その後BPクローナーゼ反応バッファー1μl、PCR産物1μl、エンターベクター(pDONR201:150ng/μl)0.5μl、TEバッファー1.5μlを氷上で混合し(合計4μl)、BPクローナーゼ酵素ミックスを1μl添加後、25℃にて1.7時間反応させた。反応後、プ

50

ロテイナーゼKを0.5 μl添加し、37 °Cにて10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1 μlをコンピテント細胞(DH5α)にトランスフォーメーションし、pDONR201/NMDA receptor #1を得た。

pDONR210/NMDA receptor #1の塩基配列を確認したところ、PCRによるエラーと思われる変異が数箇所存在しており、アミノ酸置換を伴う変異も存在していた。そこで、pDONR210/NMDA receptor #1をMfeIおよびAatIIで消化して変異領域を除き、pBS/NMDAr #2をMfeIおよびAatIIで消化した約3.4 kbp断片を導入して、pDONR210/NMDA receptor #2を得た。クローンfj07108由来の蛋白質翻訳領域には、GenBankにアクセッション番号NM_000843として登録されているNMDA受容体/2Bサブユニットのものと異なる塩基配列が2箇所〔開始コドンより第2664 bp番目の塩基(C T; Thr Thr)および第3499 bp目の塩基(A G; Ile Val)〕存在していたため、ヒト脳由来mRNAを用いて、下記のプライマーPr-R2B-5とPr-NMDAr-R8、Pr-R2B-7とPr-NMDAr-R12のプライマーの組み合わせを使用してRT-PCRによりサブクローニングを行った後に、pBS/NMDAr #2の塩基配列を確認した。その結果、ヒト脳由来mRNAからRT-PCRでサブクローニングして得られた塩基配列が、クローンfj07108と一致することが確認された。

10

<プライマー>

Pr-R2B-5 (配列番号14):

5' -TGAGAAGAATGAGGTCATGAGCA-3'

Pr-NMDAr-R8 (配列番号15):

5' -GTCACAGTCGTAGAGCCCTA-3'

Pr-R2B-7 (配列番号16):

5' -AGTTCCGAACAAGGAGAACTCAC-3'

Pr-NMDAr-R12 (配列番号17):

5' -GAGTTCTGACCCCGTCACCGTCGTGG-3'

次に、NMDA受容体/2BサブユニットとGSTとの融合蛋白質を発現するベクターを構築した。LRクローナーゼ反応バッファー1 μl、pDONR201/NMDA receptor #2 (50 ng/μl) 1 μl、GST発現ベクター(pDEST15:150 ng/μl) 0.5 μl、TEバッファー1.5 μlを氷上で混合し(合計4 μl)、LRクローナーゼ酵素ミックスを1 μl添加後、25 °Cで1時間反応させた。反応後、ロテイナーゼKを0.5 μl添加し、37 °Cで10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1 μlをコンピテント細胞(BL21-SI)にトランスフォーメーションし、3クローン(pDEST15/NMDA receptor #4、pDEST15/NMDA receptor #5、pDEST15/NMDA receptor #6)を得た。

40

上記3クローンについてNaClによる目的蛋白質の産生誘導について検討した。各大腸菌をLB-Amp(NaCl-) 2 mlで37 °Cにて一晩振とう培養した。この前培養液を300 μl添加したLB-Amp(NaCl-)合計3 mlを37 °Cで4時間振とう培養後、5 M NaClを180 μl添加(終濃度0.3 M)し、さらに37 °Cで2時間振とう培養した。コントロールとしてH₂Oを180 μl添加して同様に培養した。その後、培養液を遠心し(4 °Cにて15,000 rpmで10分間)、ペレットを2 % SDS/20 mM Tris(pH 7.4) 200 μlにけん濁して、超音波処理を行い、その後遠心(10 °Cにて15,000 rpmで10分間)した。遠心上清を10 % - ME

50

を含む2×サンプルバッファーと等量ずつ混合し、2分間煮沸後に5% - 20%ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行い、抗GST抗体を用いて上記同様に目的蛋白質の検出を行った。その結果、第12図に示すように、NMDA受容体/2BサブユニットとGSTとの融合蛋白質と思われる約189.2kDaのバンドが検出された。

実施例4

(新規PSD(Protein-X)のNMDA受容体における機能解析)

Protein-XをNMDA受容体と共にアフリカツメガエル卵母細胞で共発現させ、NMDA受容体に対するリガンド刺激による電流応答を測定し、NMDA受容体シグナルへのProtein-Xの作用を検討した。

本検討に、下記プラスミドを用いた。

<新規PSD遺伝子(Protein-X遺伝子)を含むプラスミドDNA>

ヒト幼若化骨髄細胞株(imature myeloid cell line)KG-1から文献〔ノムラ(Nomura, N.)ら、「ディーエヌエーリサーチ(DNA Research)」、1994年、第1巻、p.27-35〕に記載の方法で調製されたcDNAライブラリーより、実施例1で抽出したクローンhj02537に相当するものを選択して使用した(第13図)。当該クローンの配列に関する情報は、これまで開示されていない。

<NMDA受容体/2Bサブユニット遺伝子を含むプラスミドDNA>

実施例3で調製したpBS/NMDArを用いた(第14図)。

<NMDA受容体I遺伝子を含むプラスミドDNA>

ヒト脳由来mRNAをスーパースクリプトIIでオリゴ(dT)プライマーおよびランダムプライマーを用いて逆転写したcDNAを鋳型として、NMDA受容体Iの塩基配列に基づいてPCR用プライマーを設計して合成し、アドバンテージ2 PCRキットを使用して、実施例1と同様にPCRを行った。その後、得られたPCR産物を用いて、pGEM-T Easy Vector systems(Promega社)を使用してTAクローニングを行い、pGEM-TEasyベクターを得た(第15図)。当該ベクターは、EcoRIの2bp(CC)下流からSpeIの2bp(GG)上流の間に、NMDA受容体Iの翻訳領域2658bpを保持する。

<PSD-95遺伝子を含むプラスミドDNA>

上記同様にヒト脳由来mRNAから調製したcDNAを鋳型として、PSD-95遺伝子の塩基配列に基づいてPCR用プライマーを設計して合成し、アドバンテージ2 PCRキットを使用して、実施例1と同様にPCRを行った。その後、得られたPCR産物を用いて、pGEM-T Easy Vector systems(Promega社)を使用してTAクローニングを行い、pGEM-TEasyベクターを得た(第16図)。当該ベクターは、SpeIの3bp(GAG)下流からEcoRIの4bp(TTCC)上流の間に、PSD-95の翻訳領域2657bpを保持する。

まず、NMDA受容体I遺伝子を含むプラスミドDNAをSalIで、その他の遺伝子を含むプラスミドDNAをNotIでそれぞれ処理して直線化し、フェノール/クロロホルム精製を行った。得られたDNAを鋳型として用い、MEGAscriptキット(Ambion社)を使用して製品指示書に従って、RNA合成反応を行った。このとき、RNAポリメラーゼとして、PSD-95遺伝子についてはSP6を、それ以外の遺伝子についてはT7を使用した。RNA合成反応終了後、DNAase処理によって鋳型DNAを除去した。RNA合成反応産物を1%アガロースゲル電気泳動にて確認後、フェノール/クロロホルム精製を行った。精製後の合成RNAは滅菌水に溶解し、全てのRNA濃度が1µg/µLになるよう調製した。RNA濃度は吸光度法により求めた。

アフリカツメガエルは志木家田化学株式会社から購入し、数週間の肥育後、卵母細胞を摘出した。卵母細胞はコラゲナーゼで処理した後に一晚培養し、上記調製したNMDA受容体のRNAを自体公知の方法でマクロインジェクションした。このとき、NMDA受容体/2BサブユニットのRNAとNMDA受容体IのRNAとを1:2の割合で混合して細胞当たり20ngとなるように調製したものを用いた。インジェクション後の卵母細胞は

10

20

30

40

50

、培地中 (115 mM NaCl、2.5 mM KCl、1.8 mM BaCl₂、10 mM HEPES、pH 7.2) で 20 にて 48 時間インキュベーションした。

Protein-X または PSD-95 を NMDA 受容体と共発現させるときには、NMDA 受容体の RNA を上記同様にインジェクション後、24 時間目に Protein-X の RNA または PSD-95 の RNA を 1 細胞あたり 10 ng 再インジェクションした。その後、培地中で 20 にて 24 時間インキュベーションした。

卵母細胞で発現させた NMDA 受容体にリガンドを作用させ、その結果 NMDA 受容体イオンチャネルが開口して起きる陽イオン流入を、電気生理学的計測法により電流の変化として測定した。ここでは、二電極膜電位固定法により、参考論文 (「フェブス・レター (FEBS Letter) 」、1999 年、第 458 巻、p. 295 - 298) に従って計測を実施した。計測用のバッファーには BA バッファー (NaCl 115 mM、KCl 2.5 mM、BaCl₂ 1.8 mM、および HEPES 10 mM、pH 7.2) を用い、膜電位は -70 mV に固定した。

リガンドとして L-グルタミン酸 (Glu) とグリシン (Gly) の混合液を用い、卵母細胞に直接滴下して NMDA 受容体に作用させた。なお、電流の大きさを定量化するときには、リガンド刺激後の内向き電流の最大値から刺激前のリーク電流の平均値を減算した値を用いた (以下、電流変化量という) 。電流応答の測定は実験毎に 5 ~ 6 個の細胞を用いて行った。同一実験において、各細胞間で電流応答の結果生じる波形のパターンに大きな差異は認められなかった。

まず、NMDA 受容体 RNA をインジェクションした卵母細胞に、リガンドを異なる濃度 (10 μM Glu + 10 μM Gly、100 μM Glu + 10 μM Gly、または 1000 μM Glu + 10 μM Gly) で作用させてリガンドの濃度依存性を確認し、構築した実験系が NMDA 受容体シグナルの測定に妥当であることを検証した。なお、本実験ではリガンド溶液を添加した後、洗浄による除去を行わなかったため、特に高濃度刺激の場合では波形パターンが参考文献 (「フェブス・レター (FEBS Letter) 」、1999 年、第 458 巻、p. 295 - 298) とは異なり、内向き電流が一過性になりにくかった。これはリガンドと受容体が結合し続けているので、NMDA 受容体チャネルが開口したままになり、その結果陽イオン流入が続いているためと考えられる。次に、リガンドとして 1000 μM Glu と 10 μM Gly との混合液を用い、Protein-X の RNA または PSD-95 の RNA と NMDA 受容体の RNA とを共にインジェクションした卵母細胞における電流応答を測定した。その結果を第 17 図および表 1 に示す。Protein-X または PSD-95 を NMDA 受容体と共発現させることにより、NMDA 受容体単独のときと比較して、リガンド刺激に対する電流応答が大きくなる傾向が認められた。また、Protein-X を発現させたときには、PSD-95 を発現させたときと比較して約 1.5 倍の電流応答が得られた。

10

20

30

表 1

	電流変化量 (μA)		
	NMDA-R	NMDA-R	NMDA-R
		PSD-95	Protein-X
# 1	0.17	0.50	0.60
# 2	0.07	0.27	0.81
# 3	0.06	0.32	0.38
# 4	0.13	0.31	0.57
# 5	0.23	0.48	0.41
# 6	—	—	0.54
平均	0.13	0.38	0.55
標準偏差	0.07	0.11	0.15

上記電気生理学的測定の結果から、Protein-Xが、NMDA受容体/2B受容体と結合して器官 (apparatus) を形成すること、およびNMDA受容体刺激により発生するシグナル、例えば受容体イオンチャネルの開口とそれに伴う陽イオンの流入、およびその促進に関与していることが判明した。

実施例 5

(PJ01087 遺伝子 (Protein-Y 遺伝子) の単離・同定)

本発明に係る遺伝子は、かずさDNA研究所のヒト脳由来長鎖cDNA解析情報 (bioinformatics) により、ラットPSD95/SAP90-アソシエーティッドプロテイン-3 (SAPAP-3) と96%の相同性を有する遺伝子として抽出したクローンPJ01087に基づいて、単離・同定した。

まず、クローンPJ01087を保持するpBluescript SK+ベクターを、DH コンピテント細胞に遺伝子導入して増幅し、NotI/SalI切断によるインサートの長さが約3.7kbであることを確認した。これを鋳型とし、下記プライマーを用いて、PCRを行った。プライマーは、上記情報データベースから得られたPJ01087の塩基配列に基づいて設計し合成した。PCRはアドバンテージ2 PCRキット (Advantage 2 PCR kit) (Clontech社) を用いて、使用説明書に準じて実施した。

<プライマー>

フォワードプライマー (配列番号18):

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAA
TGAGGGGTTACCATGGC-3'

リバースプライマー (配列番号19):

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTAG
TACGGGTGGAGAACCG-3'

その結果、PJ01087クローンのORF全長を含む約2.9kbのPCR産物が得られた。このPCR産物を用い、ゲイトウェイシステム (Invitrogen社) を使用

して、エントリーベクター pDONRTM201へのクローニングを行った。クローニングは、同システムの使用説明書に準じて実施した。

(PJ01087 遺伝子の発現)

得られたベクター中のインサート部分の全長(約2.9kb)の塩基配列に間違いがないことを確認した。その後、大腸菌においてN末端にHis-tagを付加した蛋白質として発現可能な発現ベクター pDESTTM17、およびGST-tagを付加した蛋白質として発現可能な発現ベクター pDESTTM15への組み換えを行った。組み換えは、ゲイトウェイシステム(Invitrogen社)を用いて、使用説明書に準じて実施した。

PJ01087を組み込んだpDESTTM17またはpDESTTM15を保持する大腸菌から、PJ01087クローン蛋白質の発現誘導を行った。アンピシリンを含むLB培地中で37℃にて、OD600が0.5~1.0になるまで振とうしながら前培養した。この前培養液300μlに、NaClを終濃度0.3Mになるよう添加し〔NaCl(+)]、37℃で4時間振とう培養して蛋白質発現を誘導した。コントロールとしてNaClの代わりにH₂Oを添加して同様に培養した〔NaCl(-)]。その後、各培養液を遠心処理して菌体を回収した。この菌体をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し、10秒間の超音波処理を3回行い、再度遠心処理(10℃または4℃にて15,000rpmで10分間)して、上清(以下、可溶性画分という)とペレットに分けた。ペレットはPBSに再懸濁した(不溶性画分とよぶ)。

各画分について、His-tagおよびGST-tagに対する抗体を用いたウェスタンブロッティング法で蛋白質の検出を行った。その結果、His-tagおよびGST-tagのいずれを用いた検討においても、NaClで発現誘導した大腸菌の不溶性画分に、約115kDaの目的蛋白質と、その他にその分解産物と思われる蛋白質の発現誘導が観察された(第18図AおよびB)。無細胞蛋白質発現系の一つとして、大腸菌の蛋白質発現システムを応用したラピッド トランスレーション システム(Rapid Translation System)RTS5000(Roche Diagnostics社)を用いて蛋白質発現の検討を行ったが、目的蛋白質はやはり不溶性画分に見出された。

かくして得られたヒト蛋白質は、配列表の配列番号3に記載したように979残基のアミノ酸からなる。また、該蛋白質をコードする遺伝子は、配列表の配列番号6に記載したように3705塩基からなる。

実施例6

(PJ01087 遺伝子産物(Protein-Y 遺伝子産物)のNMDA受容体における機能解析)

PJ01087 遺伝子はSAPAP-3と96%の相同性を有する。SAPAP-3がラットPSD-95/SAP90関連蛋白質であることから、PJ01087 遺伝子産物が、ヒトPSD-95と複合体を形成すること、およびポストシナプス・デンシティーの構成に参与していることを予想した。PSD-95はNMDA受容体のシグナル伝達に關与することが報告されているため、PJ01087 遺伝子とPSD-95 遺伝子をNMDA受容体遺伝子と共にアフリカツメガエル卵母細胞で共発現させ、NMDA受容体に対するリガンド刺激による電流応答を測定し、NMDA受容体シグナルへのPJ01087蛋白質の作用を検討した。このとき、PSD-95と同様にPDZドメイン、SH3ドメイン、およびGKドメインを有し、NMDA受容体に結合してシグナル伝達に關わると推定される新規PSD蛋白質(protein-X)(配列表の配列番号1)をコードする遺伝子(配列表の配列番号4)を、PSD-95の代わりに用いて、同様に検討した。検討に用いた方法は、実施例4に記載の方法と全く同様の方法を用いた。

本検討には、下記プラスミドを使用した。

<PJ01087 遺伝子を含むプラスミドDNA>

ヒト幼若化骨髄細胞株KG-1から、文献〔ノムラ(Nomura, N.)ら、「ディーエヌエー リサーチ(DNA Research)」、1994年、第1巻、p.27-

35]に記載の方法で調製されたcDNAライブラリーより、実施例5で抽出したクローンPJ01087に相当するものを選択して使用した(第19図)。

<Protein-Xを含むプラスミドDNA>

実施例4に記載のプラスミドDNAを用いた(第13図)。

<NMDA受容体/2Bサブユニット遺伝子を含むプラスミドDNA>

実施例3で調製したプラスミドpBS/NMDAr(第14図)を用いた。

<NMDA受容体I遺伝子を含むプラスミドDNA>

実施例4で調製したプラスミドDNAを用いた(第15図)。

<PSD-95遺伝子を含むプラスミドDNA>

実施例4で調製したプラスミドDNAを用いた(第16図)

NMDA受容体シグナルに対するProtein-XおよびPJ01087蛋白質の作用は、実施例4と同様の方法で試験した。

PJ01087、PSD-95、および/またはprotein-XをNMDA受容体と共発現させるときには、NMDA受容体のRNAを実施例4と同様にアフリカツメガエル欄母細胞にインジェクション後、24時間目にPJ01087、PSD-95、および/またはprotein-XのRNAを1細胞あたり10ng再インジェクションした。その後、培地中で20にて24時間インキュベーションした。

卵母細胞で発現させたNMDA受容体にリガンドを作用させ、その結果NMDA受容体イオンチャンネルが開口して起きる陽イオン流入を、実施例4に記載の方法と同様の方法で測定した。その結果を第20図および第21図に示す。実施例4で示したように、PSD-95またはProtein-XをNMDA受容体と共発現させることにより、NMDA受容体単独のときと比較して、リガンド刺激に対する電流応答が大きくなることが認められた。また、PJ01087(Protein-Y)とPSD-95とをNMDA受容体と共発現させても、PSD-95を発現させたときに観察された電流応答と比べて変化はなかった。一方、PJ01087(Protein-Y)をProtein-Xと共発現させたときには、Protein-Xを発現させたときの約7倍~約8倍の電流応答が得られた。

上記電気生理学的測定の結果から、PJ01087はProtein-Xの共存下で、NMDA受容体のシグナル伝達を著しく増幅することが分かった。このことから、PJ01087は、PDZドメインを有しておりNMDA受容体/2Bサブユニットと結合するProtein-Xとの相互作用により、NMDA受容体刺激によって発生する細胞内シグナルを増幅すること、ひいてはNMDA受容体イオンチャンネルの開口とそれに伴う陽イオンの流入の促進に参与していることが判明した。

実施例7

(PJ01087蛋白質(Protein-Y)とProtein-Xとの結合の有無)
PJ01087蛋白質とProtein-Xとの結合を免疫沈降法で検討するために、下記蛋白質を調製した。

<PJ01087蛋白質>

His-tagとの融合蛋白質として発現させた大腸菌の2ml培養分のペレット(実施例5参照)に、1% Triton-X/20mM Tris(pH7.4)200μlを添加して超音波処理、15,000rpmで5分間遠心処理し、その上清を試料とした(His-pj01087)。

<Protein-X>

実施例1に記載したクローンhj02537を用い、実施例5と同様の方法でProtein-XとGSTとの融合蛋白質を発現させた大腸菌の2ml培養分のペレットに、1% Triton-X/20mM Tris(pH7.4)200μlを添加して超音波処理、15,000rpmで5分間遠心処理し、その上清を試料とした(GST-hj02537)。また、Protein-Xのグアニレートキナーゼドメインを欠失させた変異体をGSTとの融合蛋白質をして発現させた大腸菌を用い、当該変異体蛋白質を同様に調製した[GST-hj(GK-)]。

10

20

30

40

50

< G S T >

コントロールとしてG S Tのみを発現させ同様に試料調製した (A m e r s h a m b i o s c i e n c e s 社、 p G E X - 4 T - 3 由来)。

< 各蛋白質試料の処理 >

上記各上清に1% T r i t o n - X / 2 0 m M T r i s (p H 7 . 4) で平衡化したプロテインG - セファロース (p r o t e i n G - s e p h a r o s e) 3 0 μ l を添加し、4 で1時間攪拌した。攪拌後に遠心処理し、その上清を結合試験に用いた。

< 結合試験 >

上記各上清を 1 ~ 4 のように分注し、1% T r i t o n - X / 2 0 m M T r i s (p H 7 . 4) で200 μ l として4 で一晩攪拌した。

1 H i s - p j 0 1 0 8 7 2 5 μ l + G S T - h j 0 2 5 3 7 1 6 μ l

2 H i s - p j 0 1 0 8 7 2 5 μ l + G S T - h j (G K -) 1 0 0 μ l

3 H i s - p j 0 1 0 8 7 2 5 μ l + G S T 4 μ l

4 H i s - p j 0 1 0 8 7 2 5 μ l

G S T 抗体 (S I G M A 社) 1 μ l を添加して4 で1時間攪拌した後、さらに p r o t e i n G - s e p h a r o s e 3 0 μ l を添加し、4 で6時間攪拌した。その後、遠心処理して上清を除き、 p r o t e i n G - s e p h a r o s e を1% T r i t o n - X / 2 0 m M T r i s (p H 7 . 4) 5 0 0 μ l で3回洗浄した。洗浄後に p r o t e i n G - s e p h a r o s e に2 - メルカプトエタノールを含む2 x サンプルバッファ (2 % S D S / 5 0 m M T r i s (p H 6 . 8) / 3 0 % グリセロール / 0 . 0 1 % ブロムフェノールブルー) 3 0 μ l を加えて混合し、2分間煮沸後、5% - 2 0 % ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、P V D F 膜に転写後、抗G S T 抗体および抗H i s - t a g 抗体でウエスタンブロッティングを行った。

その結果、P r o t e i n - X (G S T - h j 0 2 5 3 7) およびP r o t e i n - X 変異体 [G S T - h j (G K -)] の p r o t e i n G - s e p h a r o s e への吸着は認められた (第22図のレーン5および6)。しかし、P J 0 1 0 8 7 蛋白質 (H i s - p j 0 1 0 8 7) とP r o t e i n - X (G S T - h j 0 2 5 3 7) またはP r o t e i n - X 変異体 [G S T - h j (G K -)] とを反応させて抗G S T 抗体で免疫沈降した後に抗H i s - t a g 抗体で検出したときに、P J 0 1 0 8 7 蛋白質のバンドは検出されず、P J 0 1 0 8 7 蛋白質とP r o t e i n - X の結合があるとの結果は得られなかった (第23図のレーン5または6)。

産業上の利用可能性

かずさDNA研究所のヒト長鎖cDNA解析情報データベースから、バイオインフォーマティクスにより、PDZドメイン、SH3ドメインおよびGKドメインを有する新規遺伝子としてh j 0 2 5 3 7 を抽出し、この遺伝子 (配列番号4) の遺伝子産物 (配列番号1) がNMDA受容体 / 2 Bサブユニットと結合する新規蛋白質 (P r o t e i n - X) であることを見出した。P r o t e i n - X は、そのアミノ酸配列の特徴から、P S D - 9 5 と同様に、細胞膜関連蛋白質であるグアニレートキナーゼファミリーの1つであると考えられる。また、P r o t e i n - X が、NMDA受容体刺激により発生するシグナルに関与し、その促進作用を有することを見出した。

また同様に、ラットP S D 9 5 / S A P 9 0 - アソシエーティッド プロテイン - 3 (S A P A P - 3) と96%の相同性を有する遺伝子としてクローンP J 0 1 0 8 7 を抽出した。そしてこの遺伝子 (配列番号6) の遺伝子産物 (配列番号3) が、p r o t e i n - X (配列番号1) との相互作用により、NMDA受容体から伝達されたシグナルを著しく増幅する作用を有することを見出した。NMDA受容体シグナル伝達は、P r o t e i n - X 単独のときよりも、p r o t e i n - X とP J 0 1 0 8 7 蛋白質の共存下のほうが、より強く増幅された。

これらから、本発明は、p r o t e i n - X およびP J 0 1 0 8 7 蛋白質、並びにそれらの遺伝子が関与する生体機能あるいは疾患の解明、例えばNMDA受容体のシグナル伝達機構の解明、記憶再生機構の解明、さらにはNMDA受容体のシグナル伝達異常や記憶再

10

20

30

40

50

生の異常に起因する疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病およびポリグルタミン病等の神経変性疾患の解明、並びにそれら疾患の防止、治療、または改善を可能にするために非常に有用なものである。

配列表フリーテキスト

配列表の配列番号 7 : 配列番号 4 に記載の配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 8 : 配列番号 4 に記載の配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 9 : 配列番号 4 に記載の配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 10 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの部分塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 11 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの部分塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 12 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 13 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 14 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 15 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 16 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 17 : NMDA 受容体 / 2 B サブユニットの塩基配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 18 : 配列番号 6 に記載の配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

配列表の配列番号 19 : 配列番号 6 に記載の配列に基づいて設計されたプライマーとして用いるポリヌクレオチド

【配列表】

10

20

30

Pro Val Pro Ile Leu His Gly Ala Ala Ala Leu Ala Asp Asp Leu Ala
65 70 75 80

Glu Glu Leu Gln Asn Lys Pro Leu Asn Ser Glu Ile Arg Glu Leu Leu
85 90 95

Lys Leu Leu Ser Lys Pro Asn Val Lys Ala Leu Leu Ser Val His Asp
100 105 110

Thr Val Ala Gln Lys Asn Tyr Asp Pro Val Leu Pro Pro Met Pro Glu
115 120 125

Asp Ile Asp Asp Glu Glu Asp Ser Val Lys Ile Ile Arg Leu Val Lys
130 135 140

Asn Arg Glu Pro Leu Gly Ala Thr Ile Lys Lys Asp Glu Gln Thr Gly
145 150 155 160

Ala Ile Ile Val Ala Arg Ile Met Arg Gly Gly Ala Ala Asp Arg Ser
165 170 175

Gly Leu Ile His Val Gly Asp Glu Leu Arg Glu Val Asn Gly Ile Pro
180 185 190

Val Glu Asp Lys Arg Pro Glu Glu Ile Ile Gln Ile Leu Ala Gln Ser
195 200 205

Gln Gly Ala Ile Thr Phe Lys Ile Ile Pro Gly Ser Lys Glu Glu Thr
210 215 220

Pro Ser Lys Glu Gly Lys Met Phe Ile Lys Ala Leu Phe Asp Tyr Asn
225 230 235 240

Pro Asn Glu Asp Lys Ala Ile Pro Cys Lys Glu Ala Gly Leu Ser Phe

245

250

255

Lys Lys Gly Asp Ile Leu Gln Ile Met Ser Gln Asp Asp Ala Thr Trp
 260 265 270

Trp Gln Ala Lys His Glu Ala Asp Ala Asn Pro Arg Ala Gly Leu Ile
 275 280 285

Pro Ser Lys His Phe Gln Glu Arg Arg Leu Ala Leu Arg Arg Pro Glu
 290 295 300

Ile Leu Val Gln Pro Leu Lys Val Ser Asn Arg Lys Ser Ser Gly Phe
 305 310 315 320

Arg Arg Ser Phe Arg Leu Ser Arg Lys Asp Lys Lys Thr Asn Lys Ser
 325 330 335

Met Tyr Glu Cys Lys Lys Ser Asp Gln Tyr Asp Thr Ala Asp Val Pro
 340 345 350

Thr Tyr Glu Glu Val Thr Pro Tyr Arg Arg Gln Thr Asn Glu Lys Tyr
 355 360 365

Arg Leu Val Val Leu Val Gly Pro Val Gly Val Gly Leu Asn Glu Leu
 370 375 380

Lys Arg Lys Leu Leu Ile Ser Asp Thr Gln His Tyr Gly Val Thr Val
 385 390 395 400

Pro His Thr Thr Arg Ala Arg Arg Ser Gln Glu Ser Asp Gly Val Glu
 405 410 415

Tyr Ile Phe Ile Ser Lys His Leu Phe Glu Thr Asp Val Gln Asn Asn
 420 425 430

Lys Phe Ile Glu Tyr Gly Glu Tyr Lys Asn Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser
 435 440 445

Ile Asp Ser Val Arg Ser Val Leu Ala Lys Asn Lys Val Cys Leu Leu
 450 455 460

Asp Val Gln Pro His Thr Val Lys His Leu Arg Thr Leu Glu Phe Lys
 465 470 475 480

Pro Tyr Val Ile Phe Ile Lys Pro Pro Ser Ile Glu Arg Leu Arg Glu
 485 490 495

Thr Arg Lys Asn Ala Lys Ile Ile Ser Ser Arg Asp Asp Gln Gly Ala
 500 505 510

Ala Lys Pro Phe Thr Glu Glu Asp Phe Gln Glu Met Ile Lys Ser Ala
 515 520 525

Gln Ile Met Glu Ser Gln Tyr Gly His Leu Phe Asp Lys Ile Ile Ile
 530 535 540

Asn Asp Asp Leu Thr Val Ala Phe Asn Glu Leu Lys Thr Thr Phe Asp
 545 550 555 560

Lys Leu Glu Thr Glu Thr His Trp Val Pro Val Ser Trp Leu His Ser
 565 570 575

<210> 2

<211> 491

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Pro Leu Asn Ser Glu Ile Arg Glu Leu Leu Lys Leu Leu Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Asn Val Lys Ala Leu Leu Ser Val His Asp Thr Val Ala Gln Lys
 20 25 30

Asn Tyr Asp Pro Val Leu Pro Pro Met Pro Glu Asp Ile Asp Asp Glu
 35 40 45

Glu Asp Ser Val Lys Ile Ile Arg Leu Val Lys Asn Arg Glu Pro Leu
 50 55 60

Gly Ala Thr Ile Lys Lys Asp Glu Gln Thr Gly Ala Ile Ile Val Ala
 65 70 75 80

Arg Ile Met Arg Gly Gly Ala Ala Asp Arg Ser Gly Leu Ile His Val
 85 90 95

Gly Asp Glu Leu Arg Glu Val Asn Gly Ile Pro Val Glu Asp Lys Arg
 100 105 110

Pro Glu Glu Ile Ile Gln Ile Leu Ala Gln Ser Gln Gly Ala Ile Thr
 115 120 125

Phe Lys Ile Ile Pro Gly Ser Lys Glu Glu Thr Pro Ser Lys Glu Gly
 130 135 140

Lys Met Phe Ile Lys Ala Leu Phe Asp Tyr Asn Pro Asn Glu Asp Lys
 145 150 155 160

Ala Ile Pro Cys Lys Glu Ala Gly Leu Ser Phe Lys Lys Gly Asp Ile
 165 170 175

Leu Gln Ile Met Ser Gln Asp Asp Ala Thr Trp Trp Gln Ala Lys His

180

185

190

Glu Ala Asp Ala Asn Pro Arg Ala Gly Leu Ile Pro Ser Lys His Phe
 195 200 205

Gln Glu Arg Arg Leu Ala Leu Arg Arg Pro Glu Ile Leu Val Gln Pro
 210 215 220

Leu Lys Val Ser Asn Arg Lys Ser Ser Gly Phe Arg Arg Ser Phe Arg
 225 230 235 240

Leu Ser Arg Lys Asp Lys Lys Thr Asn Lys Ser Met Tyr Glu Cys Lys
 245 250 255

Lys Ser Asp Gln Tyr Asp Thr Ala Asp Val Pro Thr Tyr Glu Glu Val
 260 265 270

Thr Pro Tyr Arg Arg Gln Thr Asn Glu Lys Tyr Arg Leu Val Val Leu
 275 280 285

Val Gly Pro Val Gly Val Gly Leu Asn Glu Leu Lys Arg Lys Leu Leu
 290 295 300

Ile Ser Asp Thr Gln His Tyr Gly Val Thr Val Pro His Thr Thr Arg
 305 310 315 320

Ala Arg Arg Ser Gln Glu Ser Asp Gly Val Glu Tyr Ile Phe Ile Ser
 325 330 335

Lys His Leu Phe Glu Thr Asp Val Gln Asn Asn Lys Phe Ile Glu Tyr
 340 345 350

Gly Glu Tyr Lys Asn Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser Ile Asp Ser Val Arg
 355 360 365

Ser Val Leu Ala Lys Asn Lys Val Cys Leu Leu Asp Val Gln Pro His
 370 375 380

Thr Val Lys His Leu Arg Thr Leu Glu Phe Lys Pro Tyr Val Ile Phe
 385 390 395 400

Ile Lys Pro Pro Ser Ile Glu Arg Leu Arg Glu Thr Arg Lys Asn Ala
 405 410 415

Lys Ile Ile Ser Ser Arg Asp Asp Gln Gly Ala Ala Lys Pro Phe Thr
 420 425 430

Glu Glu Asp Phe Gln Glu Met Ile Lys Ser Ala Gln Ile Met Glu Ser
 435 440 445

Gln Tyr Gly His Leu Phe Asp Lys Ile Ile Ile Asn Asp Asp Leu Thr
 450 455 460

Val Ala Phe Asn Glu Leu Lys Thr Thr Phe Asp Lys Leu Glu Thr Glu
 465 470 475 480

Thr His Trp Val Pro Val Ser Trp Leu His Ser
 485 490

<210> 3

<211> 979

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Gly Tyr His Gly Asp Arg Gly Ser His Pro Arg Pro Ala Arg
 1 5 10 15

Phe Ala Asp Gln Gln His Met Asp Val Gly Pro Ala Ala Arg Ala Pro
 20 25 30

Tyr Leu Leu Gly Ser Arg Glu Ala Phe Ser Thr Glu Pro Arg Phe Cys
 35 40 45

Ala Pro Arg Ala Gly Leu Gly His Ile Ser Pro Glu Gly Pro Leu Ser
 50 55 60

Leu Ser Glu Gly Pro Ser Val Gly Pro Glu Gly Gly Pro Ala Gly Ala
 65 70 75 80

Gly Val Gly Gly Gly Ser Ser Thr Phe Pro Arg Met Tyr Pro Gly Gln
 85 90 95

Gly Pro Phe Asp Thr Cys Glu Asp Cys Val Gly His Pro Gln Gly Lys
 100 105 110

Gly Ala Pro Arg Leu Pro Pro Thr Leu Leu Asp Gln Phe Glu Lys Gln
 115 120 125

Leu Pro Val Gln Gln Asp Gly Phe His Thr Leu Pro Tyr Gln Arg Gly
 130 135 140

Pro Ala Gly Ala Gly Pro Gly Pro Ala Pro Gly Thr Gly Thr Ala Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Arg Ser Glu Ser Pro Ser Arg Ile Arg His Leu Val His Ser
 165 170 175

Val Gln Lys Leu Phe Ala Lys Ser His Ser Leu Glu Ala Pro Gly Lys
 180 185 190

Arg Asp Tyr Asn Gly Pro Lys Ala Glu Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly

195

200

205

Asp Ser Tyr Pro Gly Pro Gly Ser Gly Gly Pro His Thr Ser His His
 210 215 220

His His His His His His His His His His Gln Ser Arg His Gly Lys
 225 230 235 240

Arg Ser Lys Ser Lys Asp Arg Lys Gly Asp Gly Arg His Gln Ala Lys
 245 250 255

Ser Thr Gly Trp Trp Ser Ser Asp Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ser Gly
 260 265 270

Phe Leu Ala Gly Gly Arg Pro Pro Gly Glu Pro Gly Gly Pro Phe Cys
 275 280 285

Leu Glu Gly Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Asp Leu Ser Phe Lys Gly Arg
 290 295 300

Ser Gly Gly Ser Glu Gly Arg Cys Leu Ala Cys Thr Gly Met Ser Met
 305 310 315 320

Ser Leu Asp Gly Gln Ser Val Lys Arg Ser Ala Trp His Thr Met Met
 325 330 335

Val Ser Gln Gly Arg Asp Gly Tyr Pro Gly Ala Gly Pro Gly Lys Gly
 340 345 350

Leu Leu Gly Pro Glu Thr Lys Ala Lys Ala Arg Thr Tyr His Tyr Leu
 355 360 365

Gln Val Pro Gln Asp Asp Trp Gly Gly Tyr Pro Thr Gly Gly Lys Asp
 370 375 380

Gly Glu Ile Pro Cys Arg Arg Met Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Lys Ala
 385 390 395 400

Met Gly Asp Glu Glu Ser Gly Asp Ser Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ser
 405 410 415

Pro Lys Ala Val Ala Arg Arg Phe Thr Thr Arg Arg Ser Ser Ser Val
 420 425 430

Asp Gln Ala Arg Ile Asn Cys Cys Val Pro Pro Arg Ile His Pro Arg
 435 440 445

Ser Ser Ile Pro Gly Tyr Ser Arg Ser Leu Thr Thr Gly Gln Leu Ser
 450 455 460

Asp Glu Leu Asn Gln Gln Leu Glu Ala Val Cys Gly Ser Val Phe Gly
 465 470 475 480

Glu Leu Glu Ser Gln Ala Val Asp Ala Leu Asp Leu Pro Gly Cys Phe
 485 490 495

Arg Met Arg Ser His Ser Tyr Leu Arg Ala Ile Gln Ala Gly Cys Ser
 500 505 510

Gln Asp Asp Asp Cys Leu Pro Leu Leu Ala Thr Pro Ala Ala Val Ser
 515 520 525

Gly Arg Pro Gly Ser Ser Phe Asn Phe Arg Lys Ala Pro Pro Pro Ile
 530 535 540

Pro Pro Gly Ser Gln Ala Pro Pro Arg Ile Ser Ile Thr Ala Gln Ser
 545 550 555 560

Ser Thr Asp Ser Ala His Glu Ser Phe Thr Ala Ala Glu Gly Pro Ala
 565 570 575

Arg Arg Cys Ser Ser Ala Asp Gly Leu Asp Gly Pro Ala Met Gly Ala
 580 585 590

Arg Thr Leu Glu Leu Ala Pro Val Pro Pro Arg Ala Ser Pro Lys Pro
 595 600 605

Pro Thr Leu Ile Ile Lys Thr Ile Pro Gly Arg Glu Glu Leu Arg Ser
 610 615 620

Leu Ala Arg Gln Arg Lys Trp Arg Pro Ser Ile Gly Val Gln Val Glu
 625 630 635 640

Thr Ile Ser Asp Ser Asp Thr Glu Asn Arg Ser Arg Arg Glu Phe His
 645 650 655

Ser Ile Gly Val Gln Val Glu Glu Asp Lys Arg Arg Ala Arg Phe Lys
 660 665 670

Arg Ser Asn Ser Val Thr Ala Gly Val Gln Ala Asp Leu Glu Leu Glu
 675 680 685

Gly Leu Ala Gly Leu Ala Thr Val Ala Thr Glu Asp Lys Ala Leu Gln
 690 695 700

Phe Gly Arg Ser Phe Gln Arg His Ala Ser Glu Pro Gln Pro Gly Pro
 705 710 715 720

Arg Ala Pro Thr Tyr Ser Val Phe Arg Thr Val His Thr Gln Gly Gln
 725 730 735

Trp Ala Tyr Arg Glu Gly Tyr Pro Leu Pro Tyr Glu Pro Pro Ala Thr
 740 745 750

Asp Gly Ser Pro Gly Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Gly Pro Gly Ala
 755 760 765

Gly Arg Arg Asp Ser Trp Ile Glu Arg Gly Ser Arg Ser Leu Pro Asp
 770 775 780

Ser Gly Arg Ala Ser Pro Cys Pro Arg Asp Gly Glu Trp Phe Ile Lys
 785 790 795 800

Met Leu Arg Ala Glu Val Glu Lys Leu Glu His Trp Cys Gln Gln Met
 805 810 815

Glu Arg Glu Ala Glu Asp Tyr Glu Leu Pro Glu Glu Ile Leu Glu Lys
 820 825 830

Ile Arg Ser Ala Val Gly Ser Thr Gln Leu Leu Leu Ser Gln Lys Val
 835 840 845

Gln Gln Phe Phe Arg Leu Cys Gln Gln Ser Met Asp Pro Thr Ala Phe
 850 855 860

Pro Val Pro Thr Phe Gln Asp Leu Ala Gly Phe Trp Asp Leu Leu Gln
 865 870 875 880

Leu Ser Ile Glu Asp Val Thr Leu Lys Phe Leu Glu Leu Gln Gln Leu
 885 890 895

Lys Ala Asn Ser Trp Lys Leu Leu Glu Pro Lys Glu Glu Lys Lys Val
 900 905 910

Pro Pro Pro Ile Pro Lys Lys Pro Leu Arg Gly Arg Gly Val Pro Val

915

920

925

Lys Glu Arg Ser Leu Asp Ser Val Asp Arg Gln Arg Gln Glu Ala Arg
 930 935 940

Lys Arg Leu Leu Ala Ala Lys Arg Ala Ala Ser Phe Arg His Ser Ser
 945 950 955 960

Ala Thr Glu Ser Ala Asp Ser Ile Glu Ile Tyr Ile Pro Glu Ala Gln
 965 970 975

Thr Arg Leu

<210> 4

<211> 4941

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gocgggctgg aggcgggggc ogggctccca ctgggctcgt gogttctgcg cccgccgcgg 60
 oggtgccgag cccgctggct cccgattgtc ctctgcggcg gtggcggtcg ctgcctcett 120
 gcctccgggc cgggggctgc aggggcccaga gcgagtggc ctctgcccg cggaccgcgc 180
 cagcccagag cagaaacggc ttacaaaata tacagatctt ggtagacaac gtggctgcag 240
 gctgttgaat tggaaattccc tgtggctgtc cgaagcaggg tgtccggaga gcggtgggct 300
 gacctgttcc tacaccttgc atcatgcoag ctttgtcaac gggatctggg agtgacactg 360
 gtctgtatga gctgttggct gctctgccag ccagctgca gccacatgtg gatagccagg 420
 aagacctgac cttoctctgg gatatgittg gtgaaaaaag cotgcattca ttggtaaaga 480
 ttcatgaaaa actacactac tatgagaagc agagtccggt gccattctc catggtgogg 540
 cggccttggc cgatgatctg gccgaagagc ttcagaacaa gccattaac agtgagatca 600

gagagctggt gaaactactg tcaaaaccca atgtgaagc tttgctctct gtacatgata 660
ctgtggctca gaagaattac gaccagtggt tgcctcctat gcotgaagat attgacgatg 720
aggaagactc agtaaaaata atocgtctgg tcaaaaatag agaaccactg ggagctacca 780
ttaagaagga tgaacagacc ggggcgatca ttgtggccag aatcatgaga ggaggagctg 840
cagatagaag tggctcttatt catgtttggtg atgaacttag ggaagtcaac gggataccag 900
tggaggataa aaggcctgag gaaataatac agatittggc tcagtctcag ggagcaatta 960
catttaagat tatacccggc agcaaaagagg agacaacatc aaaagaaggc aagatgttta 1020
tcaaagocct ctttgactat aatcctaag aggataaggc aattccatgt aaggaagctg 1080
ggctttcttt caaaaagga gatattcttc agattatgag ccaagatgat gcaacttggg 1140
ggcaagcgaa acacgaagct gatgccaac ccagggcagg ctgatccc tcaaagcatt 1200
tccaggaaag gagattggct ttgagacgac cagaaatatt gttcagccc ctgaaagttt 1260
ccaacaggaa atcatctggt tttagaagaa gttttogtct tagtagaaa gataagaaa 1320
caaataaatc catgtatgaa tgcaagaaga gtgatcagta cgacacagct gacgtacca 1380
catacgaaga agtgacaccg tatcggcgac aaactaatga aaaatacaga ctogttgtct 1440
tggttggtcc cgtgggagta gggctgaatg aactgaaac aaagctgctg atcagtgaca 1500
cccagcacta tggcgtgaca gtgcccata ccaccagagc aagaagaagc caggagagtg 1560
atggtgttga atacattttc atttccaagc atttgttga gacagatgta caaaataaca 1620
agtttattga atatggagaa tataaaaaca actactacgg cacaagtata gactcagttc 1680
ggtotgtcct tgctaaaaac aaagtttggt tgttgatgt tcagcctcat acagtgaagc 1740
atttaaggac actagaattt aagccctatg tgatatttat aaagcctcca tcaatagagc 1800
gtttgagaga aacaagaaa aatgcaaaga ttatttcaag cagagatgac caagtgctg 1860
caaaaccctt cacagaagaa gattttcaag aatgattaa atctgcacag ataatgaaa 1920
gtoaatatgg tcatcttttt gacaaaatta taataaatga tgacctcact gtggcattca 1980

atgagctcaa aacaactttt gacaaattag agacagagac ccattgggtg ccagtgagct 2040
ggttacatto ataaotaaga gaaatttcca taattgtott tttctataga gtgcatgatg 2100
aaatcaatta cagttttggg agtagggttt ttaaotctat atcactgtca tagatgtaca 2160
atcttggttc aagttgaatg ctggttttgt ttgtatcttt ttacagcctt atttcaaag 2220
ccatgtgtta gtataagatc cgaaatcaaa atatgcacag tactgtatto taagcaaaaac 2280
ctcaaacctt ctogttgtct tcaataccgc tctatctoca agatgaggct gaaattttca 2340
gagagactta gctagaggct tagtatgtat gggagttcag ogcttctgct ggtctcagg 2400
gtggctgctg ctgtogagtt tgaatgtag ctgttgaagg tatcaattca gcagccatga 2460
gcagctocag acagacaggt gagctctgct gtttctgggt ggatcatcac agatttagcc 2520
gggcaggcag taagggtgct tottactatt caaaaagtgt agactttctt acatattg 2580
aatacgttca cagtgtgtgc attttaaaat aattottaaa ggagtaactg aaattttacc 2640
ttgagtgaat ggccttcata atatagcttg agaagtcctt ttgagtacct gtcagtgact 2700
caacaacatt taataaggga aagtagactt ttaacagtta ttatatatgt aacgaaaagc 2760
ctttcctttg ggattaatat aagtaagaat ggtagccttg tggcaagaaa tgattacaaa 2820
ggatattttt atttghtaatt cctcagaaga caatttatga agtcacccaa aatgttattt 2880
tagctggttt tggatttttc caataaatta gaagaaggat ttctattcta aaacatgtaa 2940
aacctgtttt acatattact gatacaatta aagattattt ttcatctatg tgcaatagat 3000
caccctctt taaattgctc taagatttat tttagaaaac ttttcatgtg atgttatttc 3060
tttgtcatca aatgcttgt taacactgtc cagacaccat cctaacctg ccattgttaa 3120
agaagtttag gaaagactct tatattgtaa atatttagat gggttctctc acttttcttt 3180
gatactactg attttcagca agtgaattat ataattcaaa atgctagaaa tgtctatccg 3240
ttctataaga gagcatatcc tgccgttctt gcatgcagtg aagccctgcc cgtcgaaaat 3300

cattgcatct gtgactttca aagtggaaaa aaaaatgta tttttttgtt gatttgtaaa 3360
gagagtttaa atgtoatgtg aaaaaaaaaa gaatgtagta aaattctata tttttatgaa 3420
atattttaaa ggcataTTTT tttaaatata aaacggggct attcataaaa taaactgatt 3480
gtatgtcaag atgtcctaata ttaaaagagt agttttataa atcatggta acattccatg 3540
taaataattg agctttacaa agatagatoc aagtgtgca tctgtgcaact gcacatttga 3600
tagcatttatt cactggTTTT ccttcataact tgtcaagttc atattagaag cagagacaaa 3660
aaccactcca atggccttga cacatagta caccaaaaata gataatcaga otaagtatta 3720
tataacaacg tgatccagac agtgagttct aagtgtatta attaaatagc aaaaaatttt 3780
gtttttaaaa aatgaaagag ggagggttgc caacctgaag tottaagtag attgtttggg 3840
tagcataatt ccttctttga acattgtctg aaattttcta taaatcaaga cttcttgtac 3900
aaagaatgat gggacatatg taataatca ggcaatcacc tgagtaattt aggcagtcca 3960
aattctttac cctgaaatac ccacatttta aaaaaattgc agataattgc ttcagttatt 4020
tactttgggg acagagatat agtgtaaagt gggagaaact gagtcctttt ttggtggtgg 4080
taataataag atgttataaa aatataacat tttaaaaaag aaaggtccag accttaagcg 4140
cagagctaga acaatatttt ttaataaatg gggggaaaag ggggcacttt ggtaatttta 4200
gaaatcaggt agtatacttt tttttttttt tttgagacag ggtcttgcca tgttgctcag 4260
gctggtcttg aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct tggcctcca aagtgtggg 4320
attacaggca tgatccaccg tgcccagccg gtagacgtgg tottaaaaac agtgtttaca 4380
tggccatctt gatgcttaga aagataattg attaaaattt aataaggcag ggccaactcc 4440
gagagttcat tgacaacggc agcaaaaagg cctgaattc tgaactttct tccccagcc 4500
tccttctcca gcaaggagaa tagcactcct cctccagaa gccagctccc taagttggag 4560
ccactatgta agagaagagg aacgttcaact tttaaaatt catatattta aaaatcaaga 4620
ccaaaaagta aattctgtac tcctattatt gactgtagtc aatcaaacat aaaaaggta 4680

aagtaaaatt taatthttta cccttatthtt actgaccaat atggaagttc ttggtatctt 4740
taaggctgac cttcctggta ttgtglaatg attgaatgta totaaactgt aataatttga 4800
aactgacaaa cataacctc tcagacttac aaaactatgt tctttctaaa gatacagatt 4860
tttattatth tattttgact aggaaggatt tataaataaa tgtaatgaaa aatctttgat 4920
cttaataaag taccttcaaa c 4941

<210> 5

<211> 4370

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

acaagccatt aaacagtgag atcagagagc tgttgaaact actgtcaaaa cccaatgtga 60
aggctttgct ctctgtacat gatactgtgg ctcagaagaa ttacgaccca gtgttgccctc 120
ctatgcctga agatattgac gatgaggaag actcagtaaa aataatccgt ctggtcaaaa 180
atagagaacc actgggagct accattaaga aggatgaaca gaocggggcg atcattgtgg 240
ccagaatcat gagaggagga gctgcagata gaagtggctt tattcatggt ggtgatgaac 300
ttagggaagt caocgggata ccagtggagg ataaaaggcc tgaggaaata atacagattt 360
tggctcagtc tcaggagca attacattta agattatacc oggcagcaaa gaggagacac 420
catcaaaaga aggcaagatg tttatcaaag ccctctttga ctataatcct aatgaggata 480
aggcaattcc atgtaaggaa gotgggcttt ctttcaaaaa gggagatatt cttcagatta 540
tgagccaaga tgatgcaact tgggtggcaag cgaaacacga agctgatgcc aaccccaggg 600
caggottgat ccctcaaag catttccagg aaaggagatt ggctttgaga cgaccagaaa 660
tattggttca gccctgaaa gttccaaca ggaaatcato tggttttaga agaagttttc 720
gtcttagtag aaaagataag aaaacaaata aatccatgta tgaatgcaag aagagtgatc 780
agtacgacac agctgacgta cccacatacg aagaagtgac accgtatcgg cgacaaacta 840

atgaaaaata cagactcgtt gtcttggttg gtccogtggg agtagggctg aatgaaactga 900
aacgaaagct gctgatcagt gacaccocagc actatggcgt gaoagtgcc caccacca 960
gagcaagaag aagccaggag agtgatggtg ttgaatacat tticatttcc aagcatttgt 1020
ttgagacaga tgtacaaaat aacaagtta ttgaatatgg agaataaaa aacaactact 1080
acggcacaag tatagactca gttcggctcg tcttctctaa aaacaaagt tgtttgttgg 1140
atggtcagcc tcatacagtg aagcattta ggacactaga atttaagccc tatgtgatat 1200
ttataaagcc tocatcaata gagcgttga gagaacaag aaaaaatgca aagattattt 1260
caagcagaga tgaccaaggi gctgcaaac ccttcacaga agaagatttt caagaaatga 1320
ttaaatctgc acagataatg gaaagtcaat atggctctct ttttgacaaa attataataa 1380
atgatgacct cactgtggca ttcaatgagc tcaaaacaac ttttgacaaa ttagagacag 1440
agaccattg ggtgccagtg agctggttac attcataact aagagaaatt tccataattg 1500
tctttttcta tagagtgcct gatgaaatca attacagttt tggtagtagg gtttttaaat 1560
ctatatcaact gtcatagatg tacaatcttg gttcaagttg aatgctgggt ttgtttgtat 1620
ctttttacag ccttatttca aatgocatgt gttagtataa gatccgaaat caaaatatgc 1680
acagtactgt attctaagca aaacctcaaa ccttotcgtt gtottcaata ccgctctatc 1740
tccaagatga ggtgaaatt ttgagagaga cttagctaga ggcttagtat gtatgggagt 1800
tcagccttc tgcgtgtctc aggtgtggct gctgctgtcg agtttgaatg ttagctgttg 1860
aaggatcaa ttgagcagcc atgagcagct ccagacagac aggtgagctc tgctgtttct 1920
gggtggatca tcacagattt agccgggcag gcagtaaggt gtctcttac tattcaaaaa 1980
gtgtagactt tcttacatat togcaatacg ttcacagtgt gtgcatttta aaataattct 2040
taaaggagta actgaaattt taccttgagt gaatggcctt cataatatag cttgagaagt 2100
ccttttgagt acctgtcagt gactcaaca catttaataa gggaaagtag acttttaaca 2160

gttattatat atgtaacgaa aagcctttcc tttgggatta atataagtaa gaatggtagc 2220
cttgtggcaa gaaatgatta caaaggatat ttttatttgt aattcctcag aagacaatft 2280
atgaagtoac ccaaaatgft attttagctg gttttggatt ttccaataa attagaagaa 2340
ggatttctat totaaaacat gtaaaacctg ttttaacat tactgataca attaaagatt 2400
atttttcctc tatgtgcaat agatcacccc tctttaaatt gctctaagat ttattttaga 2460
aaacttttca tgtgatgta tttctttgtc atcaaaatgc ttgttaacac tgtccagaca 2520
ccatcctaac cttgccattg ttaaagaagt ttaggaaaga ctottatatt gtaaataatt 2580
agatgggttc tctcactttt ctttgatact actgattttc agoaagttaa ttatataatt 2640
caaaatgcta gaaatgtcta tccgttctat aagagagcat atcctgccgt tcttgcatgc 2700
agtgaagccc tgcocgtoga aaatcattgc atctgtgact ttcaaagtgg aaaaaaaaaat 2760
gttatttttt tgttgatttg taaagagagt ttaaagtca tgtgaaaaaa aatagaatgt 2820
agtaaaatc tatatattta tgaatattt taaaggcata tttttttaa tatcaaaccg 2880
ggctattcat aaaataaact gattgtatgt caagatgtcc taattttaa gagtagttt 2940
ataaatcatg gtcaacattc catgtaaata tttgagctt acaaagatag atccaagtgt 3000
gcatctgtg cactgcacat ttgatagcat tattcactgg ttttcttca tacttgtcaa 3060
gttcatatta gaagcagaga caaaaaccac tccaatggcc ttgacacata gtcacaccaa 3120
aatagataat cagactaagt attatataac aacgtgatcc agacagtgag ttctaagtgt 3180
attaattaaa tagcaaaaa ttttgtttt aaaaaatgaa agagggaggg ttgccaacct 3240
gaagtotta gtagattgt tgggtagcat atttcttct ttgaacattg tctgaaattt 3300
tctataaato aagacttct gtacaaagaa tgatgggaca tatgtaataa ttcaggcaat 3360
cacctgagta atttaggcag tccaaattct ttaccotgaa ataccacat tttaaaaaa 3420
ttgcagataa ttgcttcagt tatttacttt ggggacagag atatagtgt aagtgggaga 3480
aactgagfcc ttttttggtg gtgtaataa taagatgta taaaaatata acattttaa 3540

aaagaaaggt ccagacctta agcgcagagc tagaacaata ttttttaaat aatgggggga 3600
 aaagggggca ctttggtaat tttagaaatc aggtagtata cttttttttt tttttttgag 3660
 acagggtott gccatggtgc tcaggctggt cttgaaactcc tgggctcaag caatoctcct 3720
 gccttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggcatgatcc accgtgcccga gccggtagac 3780
 gtggtcttaa aaacagtgtt tacatggcca tcttgatgct tagaaagata attgattaaa 3840
 atttaataag gcagggccaa ctccgagagt tcattgacaa cggcagcaaa aaggccctga 3900
 attctgtact ttcttcccc agcctccttc tccagcaagg agaatagcac tcctccctcc 3960
 agaagccagc tccctaagtt ggagccacta tgtaagagaa gaggaacgtt cactttttaa 4020
 aattcatata tttaaaaatc aagaccaaaa agtaaattct gtactcctat tattgactgt 4080
 agtcaatcaa acataaaaag gtgaaagtaa aatttaattt tttaccctta ttttactgac 4140
 caatatggaa gttcttggta tctttaaggc tgacctcct ggtattgtgt aatgattgaa 4200
 tgtatctaaa ctgtaataat ttgaaactga caaacataac ottctcagac ttacaaaact 4260
 atgttctttc taaagataca gatTTTTatt attttattt gactaggaag gatttataaa 4320
 taaatgtaat gaaaaatctt tgatcttaat aaagtacctt caaacagaat 4370

<210> 6

<211> 3705

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

agcctaactt cagaaggctt ctgcctggtg gtgggatcc tgacatcaag gatgggacac 60
 cctggatgga ggctcctggg gcctggcccc caagactatg aagagccttt gctgaggcca 120
 tgaggggtta ccatggcgac ogaggcagcc atccccgcc agcccgcttt gctgaccaac 180
 agcatatgga cgtgggcctt gctgccaggg cccataact gctgggctcc agggaggcct 240
 tctccaccga gcccccttc tgtgccccga gagctggcct gggacacatt tctctgaag 300

ggccccctgag cctgagtgag gggccgtcgg taggcctga gggagggcca gcgggggccc 360
gggttggggg gggtagcagc accttcccc ggatgtacc tggccagggc cccttcgaca 420
octgtgaaga ctgtgtgggc caccacacagg gcaaggggtgc cccccgctg cctcctacac 480
tcctggatca gtttgaagag cagttgccag ttcaacaaga tggcttcac aactaccat 540
accagcgagg gccagcaggg gcagggccc ggcagcgcc agggacgggc actgccccag 600
agccccgcag tgagagccct agccgcctcc ggcacctggt tcattctgtg cagaagctct 660
ttccaagtc cactctctg gagcgccgg ggaagcggga ctataatgg cccaaggctg 720
aggaagagg tggctctgga ggagacagct accccggccc gggctctgga ggccccaca 780
cctccatca ccaccatcac caccaccatc accaccacca ccagtcccgg cacggcaaga 840
ggagcaagag caaggaccgc aagggggatg ggggcacca ggccaagtcc acaggctggt 900
ggagtccga tgacaacttg gacagtgata ggggttccct ggggggtggg aggccccctg 960
gggagcctgg tggcccttc tgccctggagg gtccagatgg gtccaccgg gacttgagct 1020
tcaagggcg ctggggcggg tcggaaggcc gctgccttgc ctgcactggc atgtccatgt 1080
cactggatgg acagtggtc aagcgaagt cctggcatac catgatggtc agccagggcc 1140
gggatggata cccgggggccc gggccaggca agggctcct gggctccggag accaaggcca 1200
aagccaggac ttatcactat ctgcaggtgc cgcaagatga ctgggggggt taccaccocg 1260
gtggcaagga tggggagatc ccctgccgca ggatgoggag cggcagctac atcaaagcca 1320
tgggggatga ggagagcgga gactcagacg gcagcccaa gacatctccc aaagcagtcg 1380
ccgacgctt caccaccgt cgtcctcca gctggacca ggccaggatc aactgctgtg 1440
tcccacccc gatccccc cggagctcca tcctggcta cagccgttc ctcaccactg 1500
gacagctcag cgatgagttg aaccagcagc tggaggcctg gtggggctg gtgtttggg 1560
agctggagtc ccaggccgtg gacgccctgg acctgcccgg ctgtttccgc atgaggagcc 1620

acagctacct ccgggcoate caggccggct gctctcaaga cgacgactgc ctgcccctcc 1680
tcgctacccc tgccgctgtc tcagggagge cgggctoctc cttcaacttc agaaaggccc 1740
cgcccccoat cccgcccggga agccaggccc cgccccgcat ctccatcacc gccagagca 1800
gcaccgactc cgcgcacgag agcttcacgg cggccgaggg ccccgcccgg cgctgcagct 1860
ccgcccagcg gctggacggc cccgccatgg gtgcgcgcac actggagtgt gcgcccgtgc 1920
cgccccgggc cagccccaag cccccacac tcatcatcaa gaccatccct ggcagggagg 1980
agctgoggag cctggcggc cagcggaaagt ggcggccgtc cattgggggtg caggtggaga 2040
cgatctcaga ttggacacc gagaacagga gccggaggga gttccactct attggcgtgc 2100
aggtggaaga ggacaagagg cgagcaaggt tcaagcgtc caatagtgtg acggctggcg 2160
tgcaggcaga cctggagctg gagggcctgg caggcctggc cacggtggcc acagaagaca 2220
aggccctgca gtttggacgc tccttcaga ggcacgcctc tgagcccag cctgggcccc 2280
ggccccccac ctactcagtc ttccgcacgg tccacacgca gggccagtgg goctaccgg 2340
agggctaccc actgccgtac gagccgccc ccaccgatgg gtgccccggc cctgcccccg 2400
ccccacccc cggccctggg gccggccgcc gtgactcctg gatagagcgc ggttcacgta 2460
gcctcccoga ctcaggccgc gcattcccct gccacgcga cggcgagtgg ttcatcaaga 2520
tgctgcgggc agagggtgag aagctggagc actggtgcca gcagatggag cgtgaggcgg 2580
aggactatga gctaccgag gagatcctgg agaagatccg cagtgtgtg ggcagcacac 2640
aacttctct gtcccagaag gttcagcagt tcttcggct gtgtcagcaa agcatggatc 2700
ccactgogtt ccctgtgccc accttcagg aactggcggg tttctgggac ctctacagc 2760
tctccatoga ggatgtgacc ctcaagttc tggagctaca gcaactcaag gccaacagct 2820
ggaaactcct ggagcctaag gaggagaaga aggtccctcc gccgatacca aagaagcccc 2880
tgcggggcgg gggcgtgocg gtgaaggagc gctccctgga ctccgtggac cggcagcggc 2940
aggaagocg caagoggctc ctgggggcca agcgcgccgc ttccttcgc cacagctogg 3000

ccaccgagag cgccgacagc atogagatct acatccccga ggcccagacc aggctgtgac 3060
 cggctccggcc cggccagccc ggcccgggccc cgcggttctc caccctact gtacaccag 3120
 cgtcagagtc actgtgaacg cgggcccgcc cgtcgcgccg ccccaccggc accggacgcc 3180
 ccggcccccg ggcccgtcac actctcgtgg gttttttacc ttctgatcc caccggaagg 3240
 cggccgggct gggcaggggg ccgtgcctct ccgccctgcg ccctcacct ggatcccctg 3300
 cccacctggt ccgacgcttt gtcccacct cctcccactg ggcaacctct ctgccattct 3360
 ttccccacg ggccaggccg ggccgggtcc ctcatctggg ctctgctcc ccccctccc 3420
 cccccgggg ggtgggctt cgtggggatc aagctctgtg gctttttatg aagaatcccg 3480
 aacctgctt aggagccgc cccacctcc caggggctcc atctcagcc ctctgccac 3540
 tgggccagg gaccacagtg gctggaccaa ccaggacca ggggcctgg gcctctccc 3600
 ttcccagcg gctggggagg ggagatgggg gctcccctc accacacctg tggctgtcc 3660
 cacatcccct tgaatatcc aggaaaaata aaacggcaga actgc 3705

<210> 7
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:4 for
 use as a primer

<400> 7
 gggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt aatgccagct ttgtcaacgg 50

<210> 8
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:4 for use as a primer

<400> 8

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc catcttgag atagagcgg 49

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:4 for use as a primer

<400> 9

ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctg cagcaaagag gagacacat caaa 54

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the partial base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 10

tttgottct acaaaccaag ggag 24

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the partial base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 11

tccaatcata ccattccagg ttcca 25

<210> 12
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 12

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggott aatgaagccc agagcggag

49

<210> 13
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 13

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctgttcocctc actcagac

48

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 14

tgagaagaat gaggtcatga goa

23

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 15

gtcacagtcg tagagcccta

20

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 16

agttccgaac aaaggagaac tcac

24

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of NMDA receptor/2B subunit for use as a primer

<400> 17

gagttctgac ccgtcaccgt cgtgg

25

<210> 18

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:6 for use as a primer

<400> 18

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggott aatgaggggt taccatggc

49

<210> 19
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:6 for use as a primer

<400> 19

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggct agtacgggtg gagaaccg

48

【図面の簡単な説明】

第1図は、新規 PSD (Protein - X と称する) と PSD - 95 について、アミノ酸配列の特徴を比較した模式図である。

第2図は、新規 PSD (Protein - X) と 6 x His - tag との融合蛋白質を大腸菌で 37 培養にて発現させたときの電気泳動図である。

第3図は、新規 PSD (Protein - X) と 6 x His - tag との融合蛋白質の、37 にて培養した大腸菌の可溶性画分中の発現量が少ないことを確認した電気泳動図である。

第4図は、新規 PSD (Protein - X) と 6 x His - tag との融合蛋白質が、25 にて培養した大腸菌の可溶性画分に発現することを示した電気泳動図である。

20

第5図は、新規 PSD (Protein - X) またはその PDZ ドメイン欠失変異体と 6 x His - tag との融合蛋白質の発現と発現量を確認したウェスタンブロットティングの結果を示す。

第6図は、NMDA 受容体 / 2 B サブユニットと GST との融合蛋白質の発現を確認したウェスタンブロットティングの結果を示す。

第7図は、NMDA 受容体 / 2 B サブユニットと GST との融合蛋白質および GST の発現および発現量を確認したウェスタンブロットティングの結果を示す。

第8図は、新規 PSD (Protein - X) が NMDA 受容体 / 2 B サブユニットと結合するが、新規 PSD (Protein - X) の PDZ ドメイン欠失変異体は結合しないことをオーバーレイ法で検討した結果を示す。

30

第9図は、新規 PSD (Protein - X) およびその PDZ ドメイン欠失変異体が、GST とは結合しないことを示す。

第10図は、新規 PSD (Protein - X) の PDZ ドメイン欠失変異体と 6 x His - tag との融合蛋白質を大腸菌で 37 培養にて発現させたときの電気泳動図である。

第11図は、新規 PSD (Protein - X) の PDZ ドメイン欠失変異体と 6 x His - tag との融合蛋白質が、37 にて培養した大腸菌の可溶性画分に発現することを示した電気泳動図である。

第12図は、NMDA 受容体 / 2 B サブユニットと GST との融合蛋白質の発現を確認した電気泳動図である。

40

第13図は、新規 PSD (Protein - X) 遺伝子を保持するベクターの制限酵素地図である。

第14図は、NMDA 受容体 2 B サブユニット遺伝子を保持するベクターの制限酵素地図である。

第15図は、NMDA 受容体 I 遺伝子を保持するベクターの制限酵素地図である。

第16図は、PSD - 95 遺伝子を保持するベクターの制限酵素地図である。

第17図は、新規 PSD (Protein - X) により、NMDA 受容体刺激により発生した電気応答が増強されることを示す。

50

第18図Aは、His-tagを付加したヒトPJ01087蛋白質(Protein-Yと称することもある)の大腸菌における発現誘導を、抗His抗体を用いてウェスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。図中、矢印はヒトPJ01087蛋白質(Protein-Y)を示す。

第18図Bは、GSTを付加したヒトPJ01087蛋白質(Protein-Y)の大腸菌における発現誘導を、抗GST抗体を用いてウェスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。図中、矢印はヒトPJ01087蛋白質(Protein-Y)を示す。

第19図は、ヒトPJ01087遺伝子(配列表の配列番号6)を保持するベクターの制限酵素地図である。

第20図は、ヒトPJ01087蛋白質(Protein-Y)が、NMDA受容体刺激により発生した電気応答に対する、新規PSD(protein-X)による増強効果をさらに強化するが、PSD-95による増強効果は強化しないことを示す。

第21図は、ヒトPJ01087蛋白質(Protein-Y)により、NMDA受容体刺激により発生した電流変化量の新規PSD(protein-X)による増強がさらに強化されることを示す。

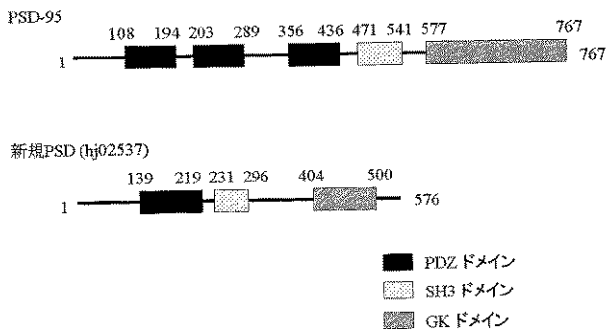
第22図は、ヒトPJ01087蛋白質(Protein-Y)とHis-tagとを融合させた蛋白質および新規PSD(protein-X)(hj02537)とGSTとを融合させた蛋白質を混合して抗GST抗体で免疫沈降し、その後抗GST抗体で免疫沈降された蛋白質を検出した結果を示す。

第23図は、ヒトPJ01087蛋白質(Protein-Y)とHis-tagとを融合させた蛋白質および新規PSD(protein-X)(hj02537)とGSTとを融合させた蛋白質を混合して抗GST抗体で免疫沈降し、その後抗His-tagで免疫沈降された蛋白質を検出した結果を示す。

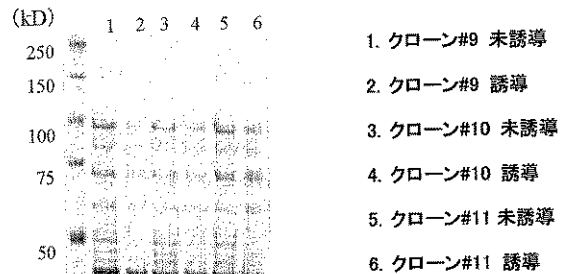
10

20

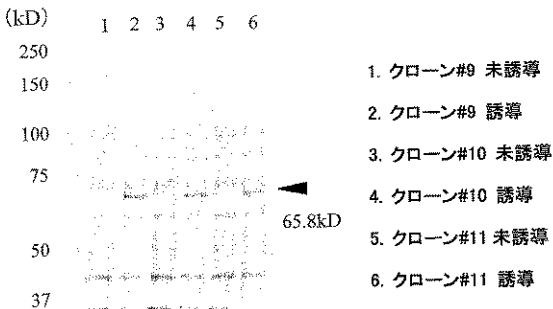
【図1】
第1図



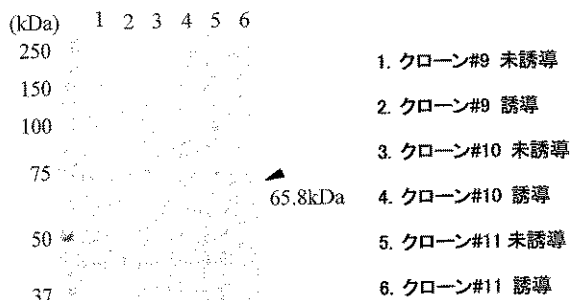
【図3】
第3図



【図2】
第2図

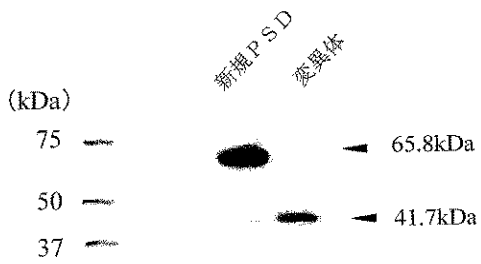


【図4】
第4図



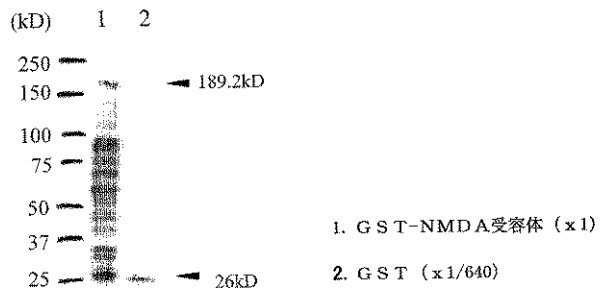
【 図 5 】

第 5 図



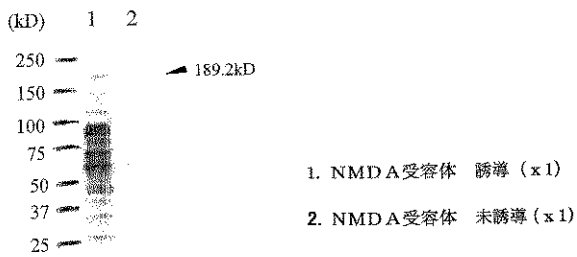
【 図 7 】

第 7 図



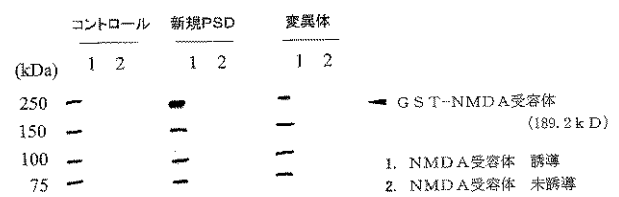
【 図 6 】

第 6 図



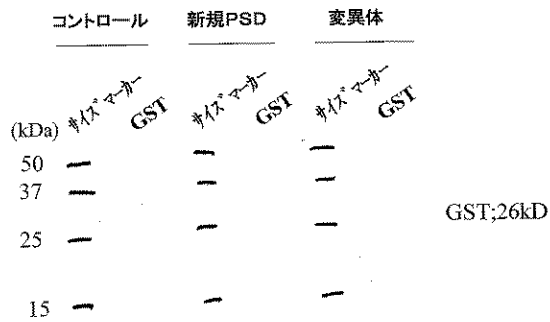
【 図 8 】

第 8 図



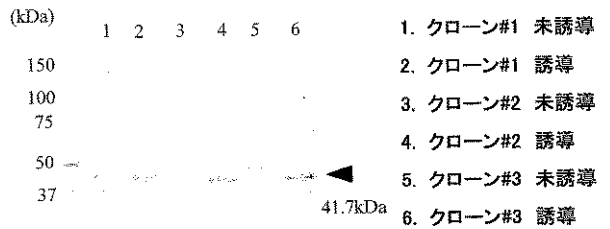
【 図 9 】

第 9 図



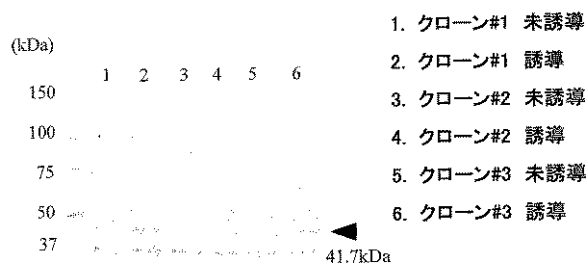
【 図 1 1 】

第 1 1 図



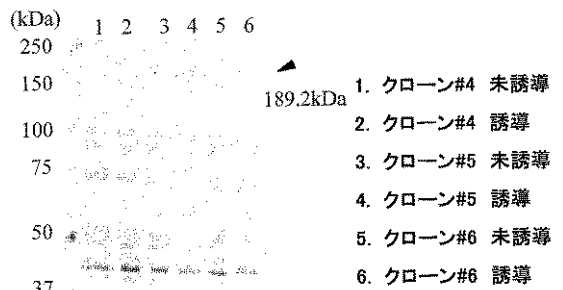
【 図 1 0 】

第 1 0 図



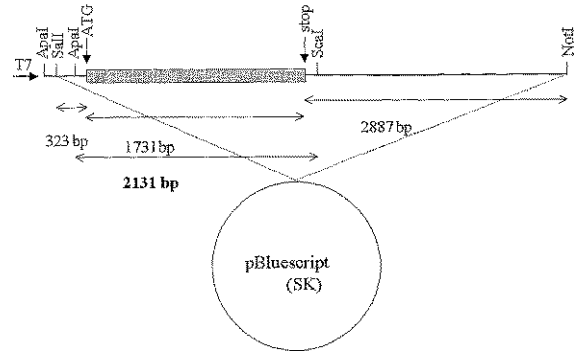
【 図 1 2 】

第 1 2 図



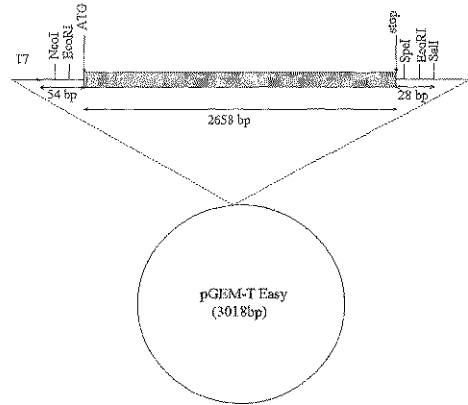
【 図 1 3 】

第 1 3 図



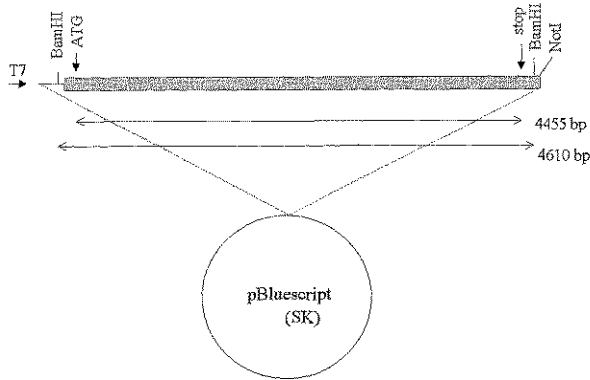
【 図 1 5 】

第 1 5 図



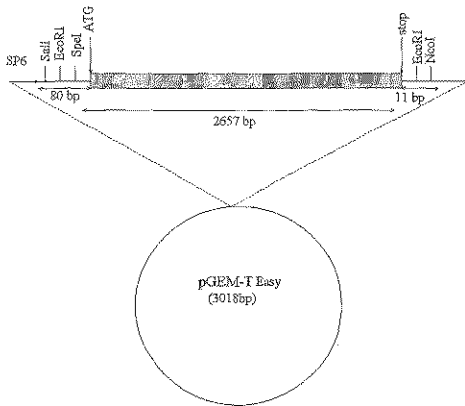
【 図 1 4 】

第 1 4 図



【 図 1 6 】

第 1 6 図

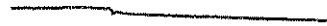


【 図 1 7 】

第 1 7 図

NMDA受容体のみ

1000 μM Glu + 10 μM Gly



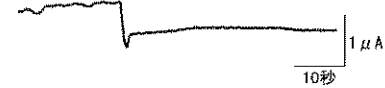
NMDA受容体+PSD-95

1000 μM Glu + 10 μM Gly



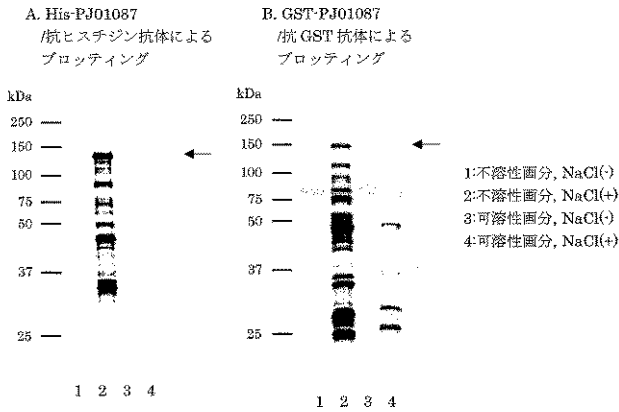
NMDA受容体+新規PSD

1000 μM Glu + 10 μM Gly



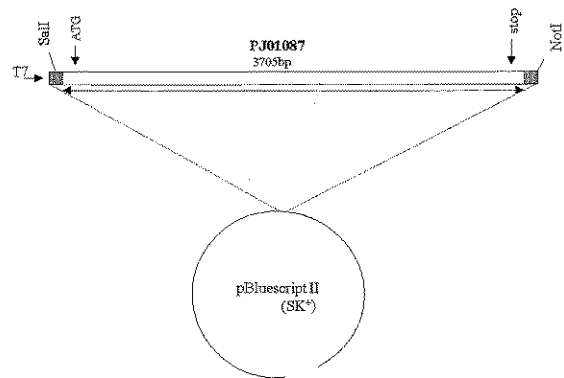
【 図 18 】

第 18 図



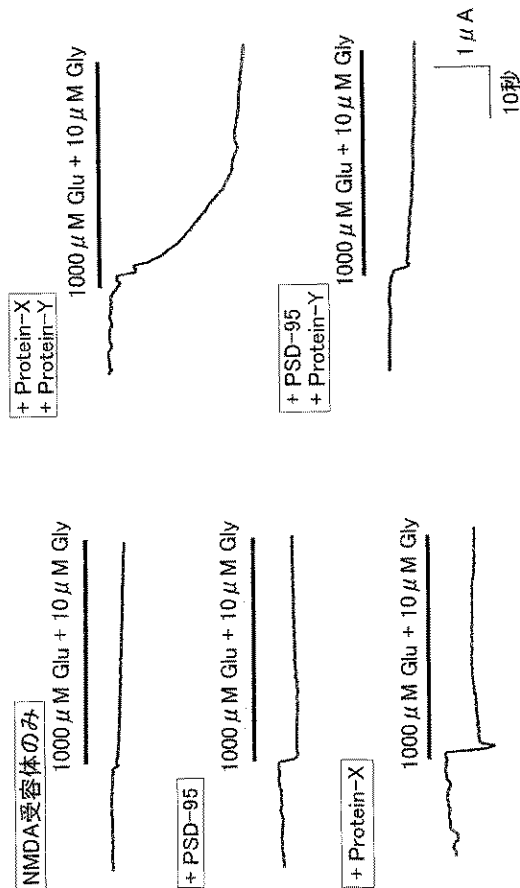
【 図 19 】

第 19 図



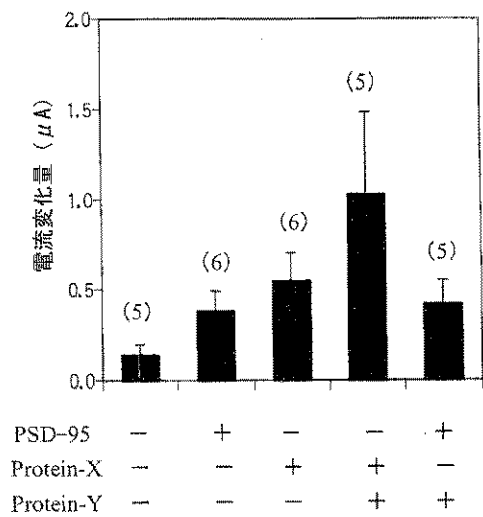
【 図 20 】

第 20 図



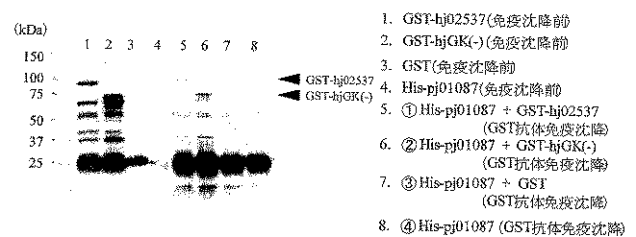
【 図 21 】

第 21 図



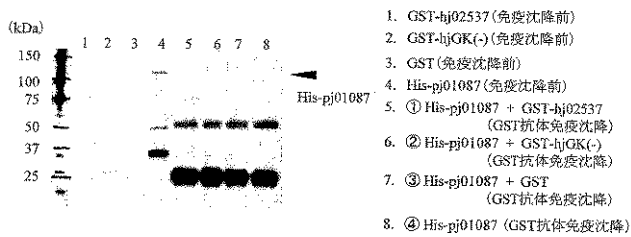
【 図 22 】

第 22 図



【 図 2 3 】

第 2 3 図



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 15 年 11 月 17 日 (2003.11.17)

【 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 】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害または促進し、および / または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害または促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の調節剤。

【 請求項 2 】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害し、および / または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の阻害剤。

【 請求項 3 】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を促進し、および / または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受

容体のシグナル伝達の促進剤。

【請求項 4】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害または促進し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害または促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の調節方法。

【請求項 5】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を阻害することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の阻害方法。

10

【請求項 6】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を促進し、および/または、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとの相互作用を促進することを特徴とする、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の促進方法。

【請求項 7】

下記の群から選ばれるポリペプチド；

- i) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有し、かつ N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 / 2 B サブユニットと結合するポリペプチド、および
- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有し、かつ N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 / 2 B サブユニットと結合するポリペプチド。

20

【請求項 8】

下記の群から選ばれるポリペプチドであって、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 / 2 B サブユニットと結合するポリペプチド：

- i) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有するポリペプチド、および
- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

30

【請求項 9】

下記の群から選ばれるポリペプチド；

- i) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド、および
- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド。

40

50

【請求項 10】

下記の群から選ばれるポリペプチドであって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド：

- i) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有するポリペプチド、

および

- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

10

【請求項 11】

下記の群から選ばれるポリペプチドであって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下で、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達を増幅するポリペプチド；

- i) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- iii) 前記 i) のポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有するポリペプチド、

および

- iv) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

20

【請求項 12】

下記のポリペプチドであって、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 / 2 B サブユニットと結合し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用しないポリペプチド；

- i) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとアミノ酸配列上少なくとも約 70% の同一性を有するポリペプチド、

または

- ii) 前記 i) のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入という変異を有するポリペプチド。

30

【請求項 13】

配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチド。

【請求項 14】

配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体と結合するペプチド。

【請求項 15】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するペプチド。

40

【請求項 16】

配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチド。

【請求項 17】

配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するペプチド。

【請求項 18】

請求の範囲第 7 項から第 17 項に記載のポリペプチドまたはペプチドから選ばれる少なく

50

とも1種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる請求の範囲第1項に記載の調節剤。

【請求項19】

請求の範囲第12項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも1種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる請求の範囲第2項に記載の阻害剤。

【請求項20】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも1種のポリペプチドまたはペプチドを有効量含んでなる請求の範囲第3項に記載の促進剤。

10

【請求項21】

請求の範囲第7項から第17項に記載のポリペプチドまたはペプチドから選ばれる少なくとも1種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、請求の範囲第4項に記載の調節方法。

【請求項22】

請求の範囲第12項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも1種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、請求の範囲第5項に記載の阻害方法。

【請求項23】

請求の範囲第7項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチドおよび請求の範囲第13項から第17項のいずれか1項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも1種のポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とする、請求の範囲第6項に記載の促進方法。

20

【請求項24】

請求の範囲第7項、第8項もしくは第12項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第13項から第15項のいずれか1項に記載のペプチドをコードする塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項25】

配列表の配列番号4または配列番号5に記載の塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列からなるポリヌクレオチド。

30

【請求項26】

請求の範囲第24項または第25項に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項27】

請求の範囲第9項から第11項のいずれか1項に記載のポリペプチド、または請求の範囲第16項もしくは第17項に記載のペプチドをコードする塩基配列、またはそれらの相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項28】

配列表の配列番号6に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチド。

40

【請求項29】

請求の範囲第27項または第28項に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項30】

請求の範囲第24項から第26項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項31】

組換えベクターが発現組換えベクターである請求の範囲第30項に記載の組換えベクター。

【請求項32】

50

請求の範囲第 2 7 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 3 3】

組換えベクターが発現組換えベクターである請求の範囲第 3 2 項に記載の組換えベクター。

【請求項 3 4】

請求の範囲第 3 0 項または第 3 1 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項 3 5】

請求の範囲第 3 2 項または第 3 3 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

10

【請求項 3 6】

請求の範囲第 3 0 項または第 3 1 項に記載の組換えベクター、および請求の範囲第 3 2 項または第 3 3 項に記載の組換えベクターのいずれか 1 つの組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項 3 7】

請求の範囲第 3 1 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または請求の範囲第 3 0 項もしくは第 3 1 項に記載の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む、請求の範囲第 7 項、第 8 項もしくは第 1 2 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 1 3 項から第 1 5 項のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。

20

【請求項 3 8】

請求の範囲第 3 3 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または請求の範囲第 3 2 項もしくは第 3 3 項に記載の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む、請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 1 6 項もしくは第 1 7 項に記載のペプチドの製造方法。

【請求項 3 9】

請求の範囲第 7 項、第 8 項もしくは第 1 2 項に記載のポリペプチドおよび/または請求の範囲第 1 3 項から第 1 5 項のいずれか 1 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項 4 0】

請求の範囲第 7 項、第 8 項もしくは第 1 2 項に記載のポリペプチドおよび/または請求の範囲第 1 3 項から第 1 5 項のいずれか 1 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体であって、該ポリペプチドの機能を阻害する抗体。

30

【請求項 4 1】

請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドおよび/または請求の範囲第 1 6 項もしくは第 1 7 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項 4 2】

請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドおよび/または請求の範囲第 1 6 項もしくは第 1 7 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体であって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害する抗体。

40

【請求項 4 3】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および/または、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする化合物の同定方法。

50

【請求項 4 4】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および/または、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ポリペプチドまたは化合物と該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ポリペプチドまたは化合物と該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、化合物が該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ポリペプチドの機能または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する化合物の同定方法。

10

【請求項 4 5】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその機能を阻害または促進する化合物、および/または、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体と化合物とを接触させ、該ポリペプチドの発現または機能の有無を検出することのできるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび/またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、該化合物が該ポリペプチドの発現または機能を阻害または促進するかどうかを決定する化合物の同定方法。

【請求項 4 6】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 7 項または第 8 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 6 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項または第 3 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 3 9 項または第 4 0 項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする化合物の同定方法。

20

【請求項 4 7】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする化合物の同定方法。

30

【請求項 4 8】

請求の範囲第 4 3 項から第 4 7 項のいずれか 1 項に記載の同定方法で同定された化合物。

【請求項 4 9】

請求の範囲第 7 項または第 8 項に記載のポリペプチドと相互作用し、その機能を阻害または促進する化合物。

40

【請求項 5 0】

請求の範囲第 2 4 項から第 2 6 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物。

【請求項 5 1】

請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用し、当該ポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害または促進する化合物。

【請求項 5 2】

請求の範囲第 9 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと相互作用し、当該

50

ポリペプチドと配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの共存下における N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の増幅を阻害または促進する化合物。

【請求項 5 3】

請求の範囲第 2 7 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物。

【請求項 5 4】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 1 3 項から第 1 7 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 4 8 項から第 5 3 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 1 8 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 1 9 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 2 0 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを有効量含んでなる医薬組成物。

10

【請求項 5 5】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 1 3 項から第 1 7 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 4 8 項から第 5 3 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 1 8 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 1 9 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 2 0 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを有効量含んでなる N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の異常に起因する疾患の防止剤、治療剤、または改善剤。

20

【請求項 5 6】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 1 3 項から第 1 7 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 4 8 項から第 5 3 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 1 8 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 1 9 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 2 0 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを有効量含んでなる記憶再生の異常に起因する疾患の防止剤、治療剤、または改善剤。

30

【請求項 5 7】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 1 3 項から第 1 7 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 4 8 項から第 5 3 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 1 8 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 1 9 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 2 0 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを有効量含んでなる神経変性疾患の防止剤、治療剤、または改善剤。

40

【請求項 5 8】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 1 3 項から第 1 7 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のい

50

ずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 48 項から第 53 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 18 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 19 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 20 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを有効量含んでなるアルツハイマー病の防止剤、治療剤、または改善剤。

【請求項 59】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 24 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 48 項から第 53 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 18 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 19 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 20 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを適用することを特徴とする N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の異常に起因する疾患の防止方法、治療方法、または改善方法。

10

【請求項 60】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 24 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 48 項から第 53 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 18 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 19 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 20 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを適用することを特徴とする記憶再生の異常に起因する疾患の防止方法、治療方法、または改善方法。

20

【請求項 61】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 24 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 48 項から第 53 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 18 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 19 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 20 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを適用することを特徴とする神経変性疾患の防止方法、治療方法、または改善方法。

30

【請求項 62】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 13 項から第 17 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 24 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 30 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 34 項から第 36 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 39 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の抗体、請求の範囲第 48 項から第 53 項のいずれか 1 項に記載の化合物、請求の範囲第 1 項または第 18 項に記載の調節剤、請求の範囲第 2 項または第 19 項に記載の阻害剤、および請求の範囲第 3 項または第 20 項に記載の促進剤のうちの少なくともいずれか 1 つを適用することを特徴とするアルツハイマー病の防止方法、治療方法、または改善方法。

40

【請求項 63】

請求の範囲第 7 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求の範囲

50

第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法。

【請求項 6 4】

請求の範囲第 7 項から第 1 1 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 1 3 項から第 1 7 項のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求の範囲第 2 4 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 3 0 項から第 3 3 項のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、請求の範囲第 3 4 項から第 3 6 項のいずれか 1 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 3 9 項から第 4 2 項のいずれか 1 項に記載の抗体を少なくとも 1 つ以上含んでなる試薬キット。

【請求項 6 5】

配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの相互作用を阻害するまたは促進することを特徴とする、ヒト N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の調節方法。

【請求項 6 6】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとヒト N - メチル - D - アスパラギン酸受容体との結合を阻害するまたは促進することを特徴とする、ヒト N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のシグナル伝達の調節方法。

【請求項 6 7】

配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 6 8】

配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなり、ヒト N - メチル - D - アスパラギン酸受容体 / 2 B サブユニットと結合するポリペプチド。

【請求項 6 9】

配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは該ポリペプチドを含有するポリペプチド。

【請求項 7 0】

配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは該ポリペプチドを含有するポリペプチドであって、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用するポリペプチド。

10

20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/12102
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/435, C07K16/18, C12Q1/68, A61K45/00, A61K38/00, A61K39/395, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15, 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) Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/435, C07K16/18, C12Q1/68, A61K45/00, A61K38/00, A61K39/395, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/61016 A2 (Lexicon Genetics Inc.), 01 August, 2001 (01.08.01), & US 2002/0038011 A1	7, 8, 13-15, 24-26, 30-40, 43-45, 54-58, 63, 64
Y		4-6, 12, 18-23, 46, 47
X	TAKEUCHI M. et al., SAPAPs. A family of PSD-95/ SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density, J.Biol.Chem., 1997, 272(18), pages 11943 to 11951	9-11, 16, 17, 27-29, 41-43, 54-58, 63, 64
Y		4-6, 12, 18-23, 47
<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 document 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 connection with the application but cited to substantiate 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 04 February, 2003 (04.02.03)		Date of mailing of the international search report 18 February, 2003 (18.02.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/12102
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Niethammer M. et al., Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases, J.Neurosci., 1996, 16(7), pages 2157 to 2163	4-6, 12, 18-23, 46
P,X	WO 01/96547 A2 (Incyte Genomics Inc.), 20 December, 2001 (20.12.01), (Family: none)	7, 8, 26, 29
P,X	WO 02/52005 A2 (Kazusa DNA Res Inst), 04 July, 2002 (04.07.02), (Family: none)	7, 8, 26, 29
P,X	WO 02/52008 A2 (Kazusa DNA Res Inst), 04 July, 2002 (04.07.02), (Family: none)	7, 8, 26, 29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/12102Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))Int. Cl.⁷ G01N33/53// (C12N1/21, C12R1:19), (C12P21/02, C12R1:19)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

it is unknown what specific substances are involved in the scopes of the "compound" and so on.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/12102
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 59-62 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: The inventions as set forth in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy as well as diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 1-3, 48-53 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Concerning the "controller", "inhibitor", "promoter" and "compound" as set forth in the above claims, the description discloses no specific compound but merely a general method of isolating such a substance with the use of the proteins according to the invention. Thus, (continued to extra sheet)
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/12102									
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl. C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/435, C07K16/16, C12Q1/68, A61K45/00, A61K39/00, A61K39/395, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/53 // (C12N1/21, C12R1:19), (C12P21/02, C12R1:19)</p>											
<p>B. 調査を行った分類</p> <p>調査を行った最小投資資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl. C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/435, C07K16/16, C12Q1/68, A61K45/00, A61K39/00, A61K39/395, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/53</p> <p>最小投資資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>											
<p>国際調査で使われた電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, MEDLINE (STM)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width: 60%;">引用文献名 及び一語の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width: 30%;">関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X/Y</td> <td>WO 01/61016 A2 (LEXICON GENETICS Inc.) 2001.08.01 & US 2002/0038011 A1</td> <td>7, 8, 13-15, 24 -26, 30-40, 43 -45, 54-58, 6 3, 64/4-6, 12, 18-23, 46, 47</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X/Y</td> <td>Takeichi M et al., SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density, J Biol Chem., 1997, 272 (18), p. 11943-11951</td> <td>9-11, 16, 17, 2 7-29, 41-43, 5 4-58, 63, 64/4 -6, 12, 18-23, 47</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一語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 請求の範囲の番号	X/Y	WO 01/61016 A2 (LEXICON GENETICS Inc.) 2001.08.01 & US 2002/0038011 A1	7, 8, 13-15, 24 -26, 30-40, 43 -45, 54-58, 6 3, 64/4-6, 12, 18-23, 46, 47	X/Y	Takeichi M et al., SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density, J Biol Chem., 1997, 272 (18), p. 11943-11951	9-11, 16, 17, 2 7-29, 41-43, 5 4-58, 63, 64/4 -6, 12, 18-23, 47
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一語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 請求の範囲の番号									
X/Y	WO 01/61016 A2 (LEXICON GENETICS Inc.) 2001.08.01 & US 2002/0038011 A1	7, 8, 13-15, 24 -26, 30-40, 43 -45, 54-58, 6 3, 64/4-6, 12, 18-23, 46, 47									
X/Y	Takeichi M et al., SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density, J Biol Chem., 1997, 272 (18), p. 11943-11951	9-11, 16, 17, 2 7-29, 41-43, 5 4-58, 63, 64/4 -6, 12, 18-23, 47									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の経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。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「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 「L」優先権主張に拠る文献又は他の文献の発行日若しくは他の特許理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口明による開示、使用、展示等に由来する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日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 「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は認められないと考慮されるもの 「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慮されるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">04.02.03</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">18.02.03</p>										
<p>国際調査機関の名称及び代表者</p> <p style="text-align: center;">日本特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区麹町三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (特許のある職員)</p> <p style="text-align: center;">光本 美奈子</p> <p style="text-align: right;">4B 9359</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>										

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/12102

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 請求の範囲の番号
Y	Niethammer W et al, Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases, J Neurosci., 1996, 16(7), p. 2157-2163	4-6, 12, 18-23, 46
PX	WO 01/96547 A2 (Incyte Genomics Inc.) 2001.12.20. ファミリーなし	7, 8, 26, 29
PX	WO 02/52005 A2 (Kazusa DNA Res Inst) 2002.07.04 ファミリーなし	7, 8, 26, 29
PX	WO 02/52008 A2 (Kazusa DNA Res Inst) 2002.07.04 ファミリーなし	7, 8, 26, 29

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/12102

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)
法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 1. 請求の範囲 59-62 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療方法による処置及び診断方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
- 2. 請求の範囲 1-3, 48-53 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、前記請求の範囲の「調節剤」、「阻害剤」、「促進剤」、「化合物」について、明細書には、本発明の蛋白質を用いて、上記のような物質を単離する一般的な方法が記載されているのみであり、具体的な化合物については何ら記載されていない。してみると、上記「化合物」等には具体的にどのような物質が含まれるのかが不明である。
- 3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

- 1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- 2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
- 4. 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	
A 6 1 P 25/28	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 長瀬 隆弘
千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
- (72)発明者 大石 道夫
千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
- (72)発明者 横田 博
東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
- (72)発明者 荒井 康子
東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)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184条の10第1項(実用新案法第48条の13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。

专利名称(译)	突触后蛋白质		
公开(公告)号	JPWO2003044196A1	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003545817	申请日	2002-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	上总DNA KENKYUSHO		
申请(专利权)人(译)	第一制药有限公司 上总DNA研究所		
[标]发明人	小原收 長瀬隆弘 大石道夫 横田博 荒井康子		
发明人	小原 收 長瀬 隆弘 大石 道夫 横田 博 荒井 康子		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/1709 A61P25/00 A61P25/28 C07K14/47 G01N33/6896		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	2001354678 2001-11-20 JP 2002046786 2002-02-22 JP 2002229863 2002-08-07 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了与N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体结合的蛋白A和与蛋白A相互作用的蛋白B.此外,基于这些蛋白质对NMDA受体介导的信号转导的显著促进,提供控制剂(抑制剂或促进剂)和这些蛋白质的表达和/或功能的控制方法使得阐明成为可能。由NMDA受体介导的信号转导或记忆回忆中的异常引起的疾病,包括诸如阿尔茨海默氏病,帕金森氏病和多谷氨酸胺疾病的神经变性疾病,并且允许其预防,改善或治疗。

	電流变化量 (μ A)		
	NMDA-R	NMDA-R	NMDA-R
		PSD-95	Protein-X
# 1	0.17	0.50	0.60
# 2	0.07	0.27	0.81
# 3	0.06	0.32	0.38
# 4	0.13	0.31	0.57
# 5	0.23	0.48	0.41
# 6	--	-	0.54
平均	0.13	0.38	0.55
標準偏差	0.07	0.11	0.15