

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-345787
(P2006-345787A)

(43) 公開日 平成18年12月28日(2006.12.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	4B024
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B064
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2005-177093 (P2005-177093)

(22) 出願日 平成17年6月17日 (2005.6.17)

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関1-3-1

(72) 発明者 小島 正己

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内

(72) 発明者 原 とも子

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内

(72) 発明者 小清水 久嗣

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内

最終頁に続く

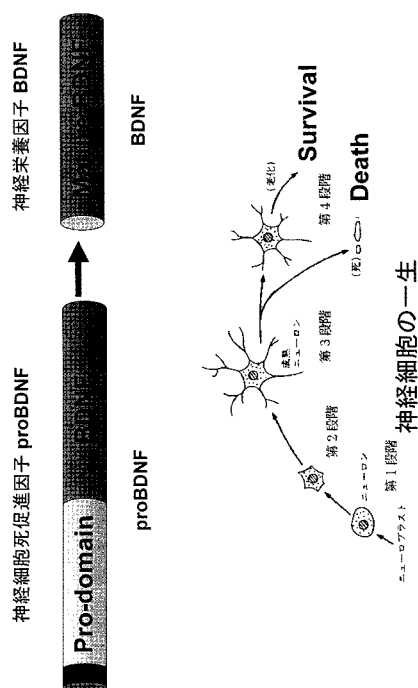
(54) 【発明の名称】 神経細胞死促進因子及び該因子を高感度に検出する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 神経細胞死促進因子或いはその誘導体、その測定法並びにその使用などの神経細胞死促進因子に関連する技術を提供する。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)の非切断性 proBDNF 誘導体：(a) 特定のアミノ酸配列からなるタンパク質、(b) 特定のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、付加、欠失又は挿入され、かつ、神経細胞死および/またはコリン作動性ニューロンのファイバー脱落の促進活性を有するタンパク質。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) の非切断性 proBDNF 誘導体：

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が置換、付加、欠失又は挿入され、かつ、神経細胞死および/またはコリン作動性ニューロンのファイバー脱落の促進活性を有するタンパク質。

【請求項 2】

請求項 3 に記載の非切断性 proBDNF 誘導体をコードする遺伝子。

【請求項 3】

proBDNF 又はその誘導体の神経変性疾患モデルの作成のための使用。

【請求項 4】

神経変性疾患がアルツハイマー病である請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

成熟 BDNF の存在下で proBDNF を選択的に測定可能な抗 proBDNF 抗体。

【請求項 6】

請求項 5 の抗体を使用する proBDNF の免疫学的測定法。

【請求項 7】

免疫学的測定法が ELISA 法である、請求項 6 に記載の免疫学的測定法。

【請求項 8】

生体サンプル中の proBDNF 量を必要に応じて BDNF 量と組み合わせて測定することを特徴とする神経変性疾患の診断法。

【請求項 9】

in vivo または *in vitro* で神経細胞に切断性又は非切断性 proBDNF 誘導体を作用させて神経変性疾患モデルを作製し、次いで該モデルに候補化合物を与えることを特徴とする神経変性疾患に対する薬物のスクリーニング方法。

【請求項 10】

in vivo または *in vitro* で神経細胞に切断性又は非切断性 proBDNF 誘導体と薬物候補化合物を組み合わせ作用させて神経変性の程度を評価ないし検出することを特徴とする神経変性疾患に対する薬物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、proBDNF 類及びその測定法並びにその使用に関し、詳しくは、proBDNF 又はその誘導体、特に非切断性 proBDNF 誘導体、これらの神経細胞ないし神経変性疾患モデル作成のための使用、proBDNF 又はその誘導体に対する抗体及び免疫学的測定法、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患の診断法に関する。

【背景技術】

【0002】

神経系には神経細胞の生存を促進する蛋白質「神経栄養因子」と神経細胞の死を促進する「神経細胞死促進因子」が存在している。前者の代表は神経栄養因子 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) であり、1990 年代から研究が進んでいる (例えば、特許文献 1 参照)。しかしながら、後者についての研究は進んでいない。

【特許文献 1】特開平 05-328974 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、神経細胞死促進因子或いはその誘導体、その測定法並びにその使用などの神経細胞死促進因子に関連する技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0004】

本発明者は神経栄養因子BDNFの一塩基多型SNPの配列に基づいた研究を通して、安定的に「神経細胞死促進因子」活性を発揮する蛋白質を調整することに成功し、さらに研究を重ねて本発明に到達した。

【0005】

本発明は、以下の発明に関する。

1. 以下の(a)又は(b)の非切断性proBDNF誘導体：
 - (a)配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、付加、欠失又は挿入され、かつ、神経細胞死および/またはコリン作動性ニューロンのファイバー脱落の促進活性を有するタンパク質。
2. 項1に記載の非切断性proBDNF誘導体をコードする遺伝子。
3. proBDNF又はその誘導体の神経変性疾患モデルの作成のための使用。
4. 神経変性疾患がアルツハイマー病である項3に記載の使用。
5. 成熟BDNFの存在下でproBDNFを選択的に測定可能な抗proBDNF抗体。
6. 項5の抗体を使用するproBDNFの免疫学的測定法。
7. 免疫学的測定法がELISA法である、項6に記載の免疫学的測定法。
8. 生体サンプル中のproBDNF量を必要に応じてBDNF量と組み合わせることで測定することを特徴とする神経変性疾患の診断法。
9. *in vivo*または*in vitro*で神経細胞に切断性又は非切断性proBDNF誘導体を作用させて神経変性疾患モデルを作製し、次いで該モデルに候補化合物を与えることを特徴とする神経変性疾患に対する薬物のスクリーニング方法。
10. *in vivo*または*in vitro*で神経細胞に切断性又は非切断性proBDNF誘導体と薬物候補化合物を組み合わせることで作用させて神経変性の程度を評価ないし検出することを特徴とする神経変性疾患に対する薬物のスクリーニング方法。

【発明の効果】

【0006】

プロセッシングによる活性化を受けない非切断性proBDNF誘導体がアルツハイマー時に脱落することが知られる前頭前野中核野のコリン作動性神経細胞のファイバーの脱落を促進すること(図8)、また、低カリウム培地による小脳顆粒神経細胞の細胞死を非切断性proBDNFが促進すること(図7)が明らかになった。これらの実施例からproBDNFによる神経疾患の原因となる神経細胞のダメージを回避するための創薬研究のスクリーニングが可能になる。

【0007】

本発明の抗体を使用した免疫学的測定法によれば、proBDNFを選択的に測定することができる。proBDNFは神経細胞死ないし神経変性疾患と密接に関係しているため、その血中濃度を測定することによって、神経系のダメージの度合い、例えば、アルツハイマー病などの神経変性疾患の兆し、症状の進行度を判定、評価ないし診断することが可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明において、天然型のヒトproBDNFは配列番号1に示され、125位のArgをMetに置換し、かつ、127位のArgをLeuで置換した非切断性proBDNF誘導体(以下、「BDNF-ML」と略することがある)を配列番号2に示す。なお、天然型のヒト成熟BDNFは、図6の下線を引いた部分である。

【0009】

配列番号2に示される非切断性proBDNF誘導体(BDNF-ML)は、コリン作動性神経細胞のファイバーの脱落の促進、低カリウム培地による小脳顆粒神経細胞の細胞死の促進などの神経細胞に対する有害作用を有することが本発明者により明らかにされた。

【0010】

本発明により提供される非切断性proBDNF誘導体は、

(a)配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の他に、

(b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、付加、欠失又は挿入され、かつ、神経細胞死および/またはコリン作動性ニューロンのファイバー脱落の促進活性を有するタンパク質を包含する。

【0011】

上記アミノ酸配列の置換、付加、欠失又は挿入は、例えばサイトスペシフィック・ミューターゲネシス〔Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); 同 100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984); 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)〕などの遺伝子工学的な手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89, 4801(1967); 同 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); 同 24, 245 (1983)〕およびそれらの組合せなどにより行うことができる。置換、付加、欠失又は挿入されるアミノ酸の個数としては、1又は複数個、好ましくは1から十数個、更に好ましくは1から数個程度が、神経細胞死および/または神経細胞のファイバー脱落の促進活性を保持する上で、好ましく例示される。また、配列番号2のタンパク質は、シグナルペプチドを含んでおり、該シグナルペプチドをさらに欠失させることもできる。

【0012】

本発明は、さらに非切断性proBDNF誘導体をコードする遺伝子にも関する。該遺伝子は、上記非切断性proBDNF誘導体タンパク質((a)および(b))をコードするDNA、及び該DNAとストリンジェントな条件下にハイブリダイズし、かつ、神経細胞死および/またはコリン作動性ニューロンのファイバー脱落の促進活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ストリンジェントな条件としては、プライマーまたはプローブとして用いられる通常の条件を挙げることができ、特に制限はされないが、例えば、0.1% SDSを含む0.2×SSC中50の条件または0.1% SDSを含む1×SSC中60の条件を例示することができる。

【0013】

天然型proBDNFの起源は特に限定されず、ヒト、ウシ、ブタ、サル、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラットなどの哺乳動物、ニワトリ、アヒルなどの鳥類、カエルなどの両生類等の動物が広く例示できる。天然型proBDNFは、非切断性proBDNF誘導体の製造原料として使用できる。

【0014】

本発明者は、非切断性proBDNF誘導体の組換え蛋白質を大腸菌の発現系を用いて作製した。組換え蛋白質を発現する宿主としては大腸菌に限られず、他の微生物、植物細胞、動物細胞などが広く使用できる。非切断性proBDNF誘導体は、proBDNFにおいて切断に関与する部分或いはその周辺(図6においての周辺部分、例えば125位、127位はこれに含まれる)に変異を導入することにより得ることができる。

【0015】

この組換え蛋白質の生物活性を脳の神経細胞の培養系を用いて測定した結果、非切断性proBDNF誘導体は運動機能の調節を行う小脳顆粒神経細胞に対して、神経細胞死を誘導すること、神経細胞の生存を促進するBDNFとは反対の機能を行うこと、アルツハイマー病脳において脱落することが知られる前脳基底野コリン作動性神経細胞の脱落を加速させる活性があることが見出された。この作用は、proBDNFに本来備わっている機能であり、天然のproBDNF及び非切断性proBDNF誘導体のいずれも該作用を有する。天然のproBDNFはプロドメインを切断して成熟BDNFになるとproBDNFと反対の神経保護作用を有するが、非切断性proBDNF誘導体は成熟BDNFにはほとんど或いは全く変換されないため、取り扱いが容易である。

【0016】

非切断性proBDNF誘導体あるいは天然proBDNFは、神経細胞死或いは神経変性ないし神経細胞の機能低下を引き起こすため、神経変性疾患(例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病など)の病態モデルの作成に有効である。例えば、培養神経細胞或

いはヒトを除くモデル動物（マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、サルなど）に非切断性proBDNF誘導体、或いは天然proBDNFを非切断/非成熟条件下（例えば酵素阻害剤を併用する等）で与えることにより、神経変性疾患のモデル系を作製可能である。

【0017】

例えば、非切断性proBDNF誘導体をアルツハイマー時に脱落することが知られる前頭前野中核野のコリン作動性神経細胞に作用させて、そのファイバーの脱落を促進することにより、アルツハイマー病の疾患モデルを作製できる。

【0018】

これらの神経変性疾患の疾患モデルに候補化合物を作用させるか、或いはproBDNF又はその非切断性誘導体と候補化合物を組み合わせることで作用させてその効果を検証することにより、神経変性疾患に対する治療薬のスクリーニングを行うことができる。

【0019】

上記のように、成熟BDNFとproBDNFは、神経細胞に対して正反対の作用を有するため、これらの存在比率は重要である。神経栄養因子BDNFの減少あるいは神経栄養因子BDNFの前駆体蛋白質proBDNFの増加は、痴呆や脳疾患の原因になりうるからである。したがって、脳疾患診断法の一つとして、神経栄養因子BDNFと神経栄養因子BDNFの前駆体蛋白質proBDNFの量比を正確に測定する技術は重要である。

【0020】

神経栄養因子BDNFの高感度な測定技術はすでに1990年代から確立されて製品化されており（例：プロメガ社）、それが神経栄養因子BDNFの酵素免疫測定法（ELISA）である。

【0021】

しかし、神経細胞死促進因子proBDNFを高感度かつ特異的に検出する酵素免疫測定法（ELISA）は開発されていなかったために、神経栄養因子BDNFと神経栄養因子BDNFの前駆体蛋白質proBDNFの量比を知ることはできなかった。

【0022】

本発明者らは、神経栄養因子BDNFの前駆体蛋白質proBDNFを高感度にかつ特異的に測定する酵素免疫測定法（ELISAを含む）を開発した。ELISAの原理は図2の直接競合ELISAであり、ELISAに使用する抗体として、proBDNFのpro-domain（図1）の領域を特異的に認識する抗体2種類を作製した（図5, RabbitとChicken）。これらの抗体を用いて測定した結果、前駆体蛋白質proBDNFをpg/mlの濃度まで高感度に測定でき、かつ、神経栄養因子BDNFはここで開発されたELISAでは検出されないことが明らかになった（図3）。このELISA法を実際に用いてラット脳スライス標本から放出された前駆体蛋白質proBDNFと神経栄養因子BDNFの量比を決定した（図4）。脳スライス標本から前駆体蛋白質proBDNFが約30 pg/mlの濃度で放出されていることがわかる。

【0023】

神経栄養因子BDNF及びその前駆体蛋白質proBDNFは、リンパ液、血液ないし脳脊髄液などの生体サンプル中に存在することが知られている。上記のようにproBDNFは神経細胞死もしくは機能低下（神経細胞変性ないし神経突起の伸長抑制・脱落を含む）に関与しており、血液（血清、血漿、血球（赤血球、白血球））や脳脊髄液などの中のproBDNF或いはBDNFとproBDNFの比（BDNF/proBDNF）を必要に応じて繰り返し測定することで、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患の罹患の可能性或いは進行の程度を予測、判定ないし診断することが可能である。

【実施例】

【0024】

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明する。

実施例1：非切断性proBDNF

NCBIのSNPデータベースに基づいて、proBDNFのプロドメインの切断部分（矢印）の近傍に存在する2個のR（Lys、太文字、125位と127位）をM（Met, 125位）とL（Leu 127位）に変異を導入するための遺伝子組換え実験を行った。

【 0 0 2 5 】

ヒトの血液から調整したDNAを用いて図6のアミノ酸配列部分(配列番号1)に相当するDNA断片をPCR反応で増幅しTAベクター(インビトロジェン)にクローニングした。2個のR(Lys、太文字、125位と127位)をMとLに変異させた遺伝子を得るために、GCAAACATGTCCATGATGGTCCTGCGCCACTCTGACCC(プライマー1,配列番号3)とGGGTCAGAGTGGCGCAGGACCATCATGGACATGTTTGC(プライマー2,配列番号4)の配列のプライマーと、Quick-change XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて目的とする非切断性proBDNF(BDNF-ML)遺伝子を得た。

【 0 0 2 6 】

大腸菌によって発現精製したproBDNFの銀染色(左)とウエスタンブロット解析(図5の左と同じ)とCDスペクトル実験方法:

His-tag付き非切断性ヒトproBDNF遺伝子(R125M、R127L)をpET19ベクターに導入し、大腸菌株BL21にトランスフォーメーションした。集菌した大腸菌ペレット(約4g)をBugBuster(Novagen)に溶かし17,000rpm、20分、4の遠心によってHis-tag付きヒトproBDNFを含むInclusion Bodyを回収し8M Urea 1mM EDTA 40mM DTT / 0.5M Tris-HCl(pH8.5)に一晩可溶化し、この溶液5mlに190mg TAPSを添加しさらに一晩4に置いた。His-tagカラム(Invitrogen)によってHis-tagつきヒトproBDNFを精製した。精製度が銀染色からわかる(図9右)。この組み換え蛋白質を2M Urea 0.1-0.2M cysteamine 5% グロセロール/50mM Tris-HCl(pH 7.4)中で巻き戻した(4一晩)。最後に0.1% BSA/0.15M NaClで透析して精製品とした。CDスペクトルから巻き戻し反応後の蛋白質の高次構造化が確認された(図9左)。

【 0 0 2 7 】

実施例2:抗体によるproBDNFおよびBDNFの検出

図2の原理に基づいてproBDNFを高感度に検出するELISA法を確立した。

【 0 0 2 8 】

抗体は図1のpro-domainを認識するchickenとrabbitの抗体(図5)をアフィニティ精製したものを使用した。検量線作成に使うproBDNFは、図9のように精製したものである。

【 0 0 2 9 】

図3(B)のプロメガ社のELISAを用いたBDNFの測定は、プロメガBDNFmaxのプロトコールに従って行った。

【 0 0 3 0 】

図3(A)のproBDNF測定の実験方法:

- (i) proBDNF(chicken Ab、アフィニティカラム精製)抗体をカーボネートコートbufferで250倍希釈しこれを100μlずつELISAプレートに一晩置く。
- (ii)抗体液を捨てwashing buffer(20mM Tris-HCl(pH7.6) 150mM NaCl 0.05% Tween 20) 280μlで5分間揺らし2回洗浄する。
- (iii)X4 Block Ace(大日本製薬) 280μlをapplyし1時間以上静置。
- (iv)液を捨てwashing buffer 280μlで1回洗い、proBDNFあるいはBDNF(プロメガBDNFmaxに添付のもの)をグラフの濃度になるように添加し、室温で2時間振とう。
- (v)液を捨てwashing buffer 280μlで5分間揺らし3回洗う。proBDNF(rabbit Ab-IgG精製)抗体をX10 Block Aceで500倍希釈して100μlずつ添加。室温で2時間振とう。
- (vi)液を捨てwashing buffer 280μlで5分間揺らし3回洗うanti-Rabbit (HRP-conjugated)抗体をX10 Block Aceで1000倍希釈し100μlずつ添加。室温で1時間振とう。
- (vii)液を捨てwashing buffer 280μlで5分間揺らし3回洗うTMB One Solution(プロメガG7431)を100μlずつ添加。発色をみながら1M-HClを100μlずつ添加し450nmで発色を測定する。

【 0 0 3 1 】

図4は、脳の海馬スライス培養系を用いて図3のproBDNF ELISAが正しく実験的に働くことを確認し、実際にproBDNF及び成熟BDNFを定量した結果である。ELISAが働くことは、

通常のマウスからのスライスでは測定できたが (+/+), BDNFのノックアウトマウスからのスライスでは (-/-) 測定できなかつたこと (ND) からわかる。このスライスの場合、実際のスライスから放出されたproBDNFおよび成熟BDNFはそれぞれ約 30 pg/mlと 10 pg/mlであった。

【0032】

実験方法：生後7日のマウス脳から切り出した200ミクロンの海馬切片を生理的バッファにおいて1週間培養した。その培養上清を回収し図3のELISA法によって各BDNFの濃度を決定した。

【0033】

ELISAを使用した抗体の特異性

図9で精製したproBDNFをproBDNF(chicken Ab、アフィニティカラム精製)抗体、proBDNF(rabbit Ab-IgG精製)抗体でウエスタンブロットを行った。ウエスタンブロットに使用した抗体濃度は、chickenが1.6 µg/ml、rabbitが2.8 µg/mlである。抗体作製に用いた抗原はchicken抗体がNNK DAD LYT SRV MLS SQの配列、rabbit抗体はプロドメイン全体である。結果を図5に示す。

【0034】

実施例3：proBDNFの神経細胞に対する影響

(1) 小脳顆粒神経細胞

BDNFのレセプターを発現している生後6日齢ラット小脳顆粒神経細胞を培養し、高濃度(26mM)カリウム含有MEM培地にて4日間成熟の後、100ng/mL成熟型BDNFまたは50ng/mL proBDNFを含む低濃度(5mM)カリウム含有MEM培地に置換、神経細胞死を誘導した。1日後、細胞の生存活性をdapiによる核染色(図7左)または乳酸脱水素酵素(LDH)活性測定(図右)により定量化した。

【0035】

dapi染色：4%パラホルムアルデヒド水溶液で固定後、dapiを含むPBSに15分間曝露し、PBSに溶液を交換した。蛍光顕微鏡下、紫外光を照射し、核に取り込まれたdapiの蛍光を観察した。アポトーシスを起こし凝縮した核(図中・矢頭)と、生存している核(図中・矢印)をカウントし、すべての核数に占める、アポトーシスを起こした核数を百分率で定量化した。

【0036】

LDHアッセイ：和光純薬工業(株)の「LDH-細胞毒性テストワコー」を用い、固定直前の低カリウム培地を10µL分取し、50µLのLDH発色試薬中に混合、室温下約15分の後560nmの吸光度を測定した。proBDNF添加群では、他群に比して優位に細胞死が促進されていることが明らかとなった。

(2) コリン作動性ニューロン

BDNFのレセプターを発現している胎生20日齢ラット中隔野を培養し、2週間のマチュレーションの後、100ng/mL成熟型BDNFまたは20ng/mL proBDNFをそれぞれ添加した。4日後アセチルコリンエステラーゼ活性染色を行い、コリン作動性ニューロンを特異的に染色し、その形態を顕微鏡下観察し(図8上)、細胞体から50µm離れたアセチルコリンエステラーゼ活性染色陽性神経突起の数を定量化した(図下)。proBDNF添加群では、有意にアセチルコリンエステラーゼ活性染色陽性神経突起の低下が顕微鏡下で観察された(図8上)。またproBDNF添加群では、細胞体から50µm離れたアセチルコリンエステラーゼ活性染色陽性神経突起の数は、他の群に比して約半分に減少していた(図8下)。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】神経細胞とproBDNF, 成熟(mature)BDNFを示す。

【図2】直接競合ELISAの模式図を示す。

【図3】図2の原理に基づいたproBDNFを高感度に検出する本発明のELISA法とBDNFを高感度に検出する従来のELISA法の結果を示す。

【図4】脳の海馬スライス培養系を用いて図3のproBDNF ELISAが正しく実験的に働くこ

10

20

30

40

50

とを確認した。

【図5】図9で精製したproBDNFをproBDNF(chicken Ab、アフィニティカラム精製)抗体、proBDNF(rabbit Ab-IgG精製)抗体でウエスタンブロットを行った結果を示す。

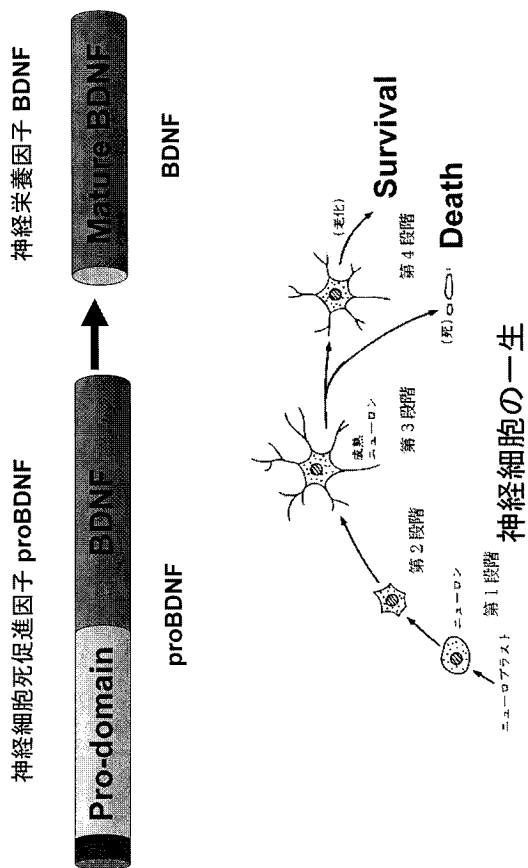
【図6】proBDNF(全配列)とmatureBDNF(下線部分)のアミノ酸配列を示す。 は切断部位を示す。

【図7】ラット小脳顆粒神経細胞に対するproBDNFの効果を示す。

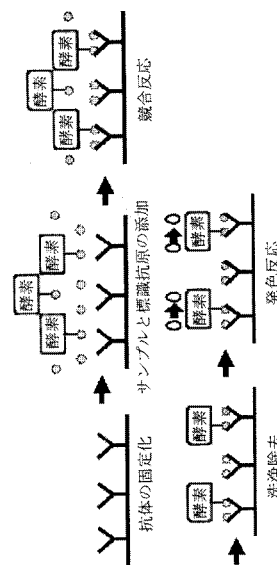
【図8】コリン作動性ニューロンに対するproBDNFの効果を示す。

【図9】大腸菌によって発現精製した非切断性proBDNFの銀染色(左)とウエスタンブロット解析(図5の左と同じ)とCDスペクトル実験の結果(右)を示す。

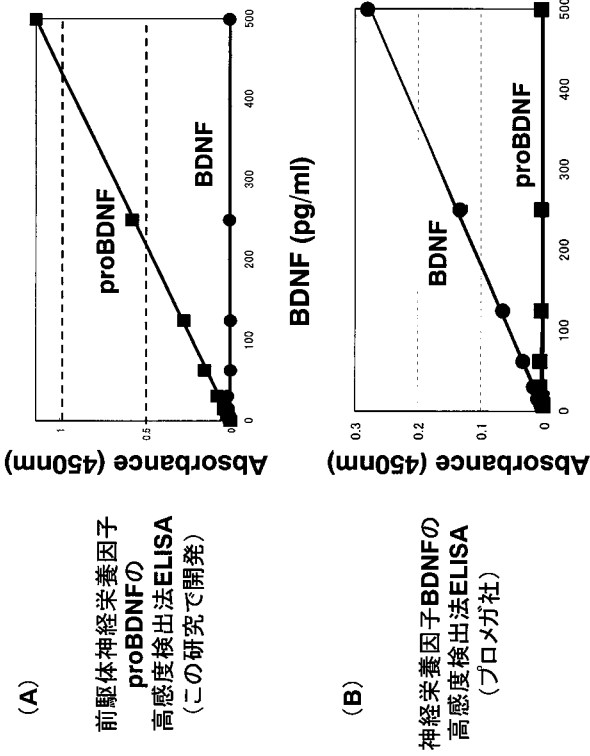
【図1】



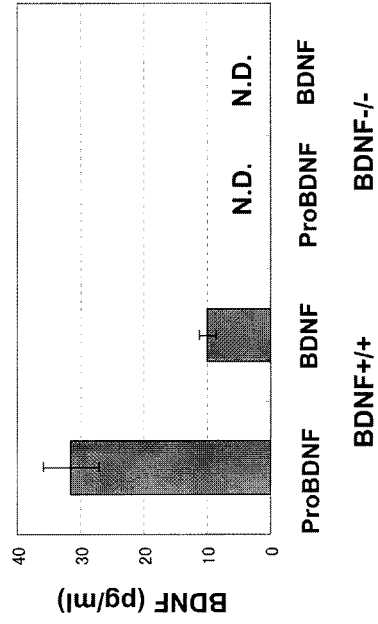
【図2】



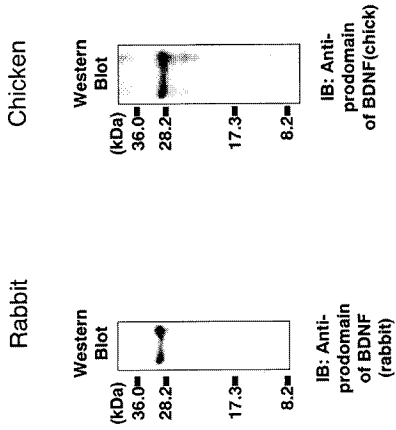
【 図 3 】



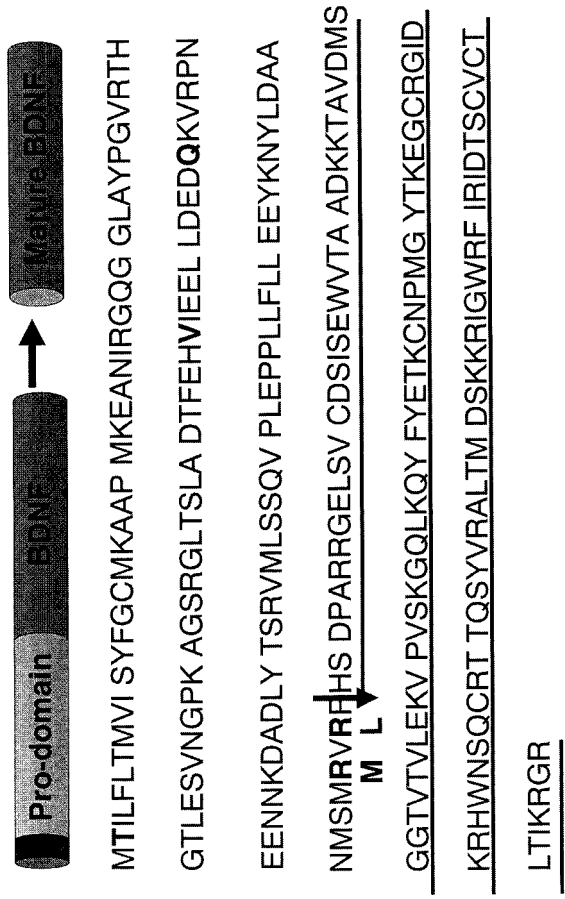
【 図 4 】



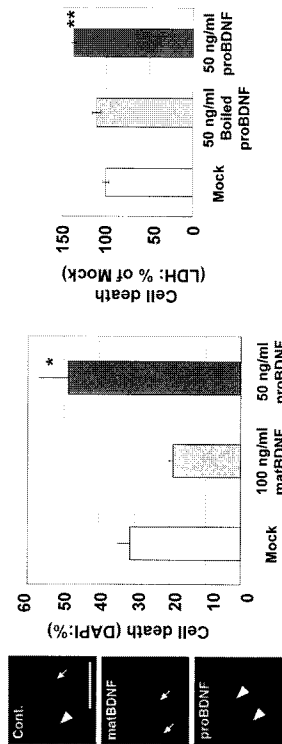
【 図 5 】



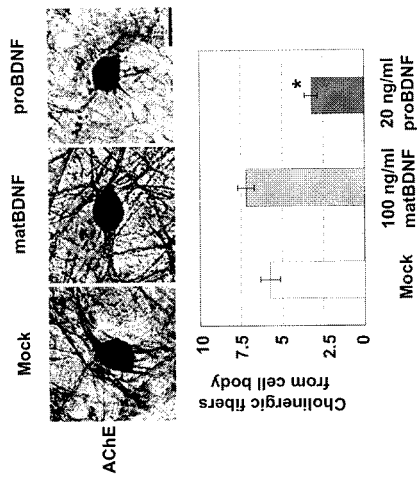
【 図 6 】



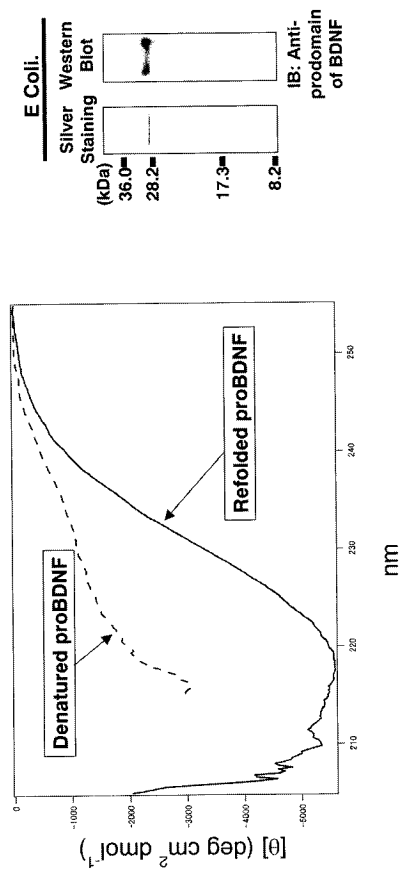
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2006345787000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年8月29日(2005.8.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明する。

実施例1：非切断性proBDNF

NCBIのSNPデータベースに基づいて、proBDNFのプロドメインの切断部分(矢印)の近傍に存在する2個のR(Arg、太文字、125位と127位)をM(Met,125位)とL(Leu 127位)に変更を導入するための遺伝子組換え実験を行った。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 上垣 浩一

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内

(72)発明者 柏原 めぐみ

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA43 CA02 DA06 EA04 GA11 HA03 HA14

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QR48 QR69 QR77 QS24 QX01

4B064 AG27 CA10 CA20 DA01 DA13

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 FA72 FA74 GA15

GA26

专利名称(译)	神经元死亡促进因子和高灵敏度检测因子的方法		
公开(公告)号	JP2006345787A	公开(公告)日	2006-12-28
申请号	JP2005177093	申请日	2005-06-17
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	小島正己 原とも子 小清水久嗣 上垣浩一 柏原めぐみ		
发明人	小島 正己 原 とも子 小清水 久嗣 上垣 浩一 柏原 めぐみ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12P21/08		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12P21/08 A01K67/027 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26		
其他公开文献	JP4457216B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供与神经细胞死亡促进因子例如神经细胞死亡促进因子或其衍生物有关的技术，其测量方法及其用途。 解决方案：以下不可切割的proBDNF衍生物 (a) 或 (b)：(a) 由特定氨基酸序列组成的蛋白质 (b) 其中一个或多个氨基酸被取代，添加或缺失的特定氨基酸序列 一种已经丢失或插入的蛋白，具有促进神经细胞死亡和/或胆碱能神经元纤维丢失的活性。 [选型图]图1

