

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 517313

(P2003 - 517313A)

(43)公表日 平成15年5月27日(2003.5.27)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5
1/21		C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全115数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 545853(P2001 - 545853)

(86)(22)出願日 平成12年12月15日(2000.12.15)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月17日(2002.6.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/34375

(87)国際公開番号 W001/044816

(87)国際公開日 平成13年6月21日(2001.6.21)

(31)優先権主張番号 60/171,012

(32)優先日 平成11年12月15日(1999.12.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/172,350

(32)優先日 平成11年12月16日(1999.12.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ リ-ジェンツ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国 94607 - 5200 カリフォル
ニア州 オークランド トウエルフス フ
ロア フランクリン ストリート 1111

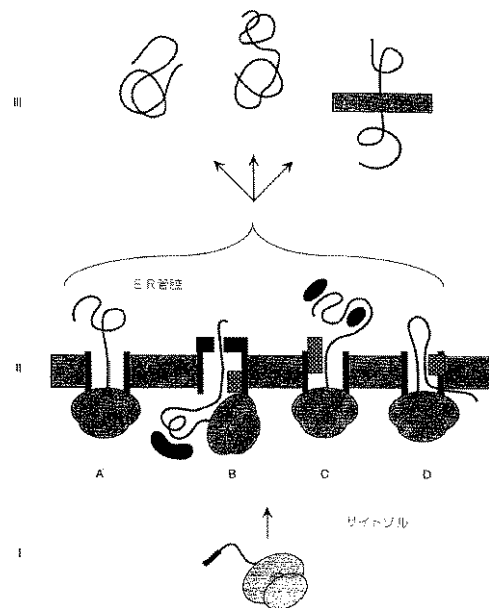
(72)発明者 リンガッパ, ビシュワナス アール .
アメリカ合衆国,カリフォルニア 94143 -
0444,サンフランシスコ,パルナサス アベ
ニユ 513,デパートメンツ オブ フィシ
オロジー アンド メディスン,ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア,サンフランシ
スコ

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コンフォメーションおよびトポロジータンパク質の調節

(57)【要約】

異なる配座異性体として存在することが知られていないタンパク質の新規な配座異性体を同定する方法および組成物が提供される。配座異性体を産生する異なるシグナル配列で天然シグナル配列を置換するキメラ遺伝子を使用することによって、天然タンパク質をキメラ遺伝子の産物と比較することができる。コンフォメーションが異なる場合、抗体の産生、天然および異なる配座異性体のタンパク質に関連するメカニズムの解明、生理学的試料中の異なる配座異性体の存在についてのアッセイ、配座異性体に特異的に結合する化合物、特に薬剤およびその他の同定に異なるタンパク質を使用することができる。配座異性体の形成が疾患状態に関連する場合、化合物を薬剤候補として同定するスクリーンにおいて配座異性体を使用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然タンパク質をコードするオープンリーディングフレームと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するキメラ遺伝子の発現により得られたタンパク質のトポグラフィーを比較することを含み、ここで前記天然タンパク質はシグナル配列を有する遺伝子によりコードされ、そして前記キメラ遺伝子は異なるシグナル配列を有し、ここで前記天然遺伝子の発現産物に比較して前記キメラ遺伝子の発現産物のトポグラフィーの変更は前記タンパク質が前記天然タンパク質の配座異性体であることを示す、少なくとも2つの異なるトポグラフィカル形態を有するタンパク質分子の配座異性体を同定する方法。

【請求項2】 前記発現がライゼイトである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記ライゼイトが分画したライゼイトである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記発現が分画し、再構成したミクロソーム膜を補充した系である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記発現が無傷の細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記キメラ遺伝子および天然遺伝子の発現から生ずる成熟タンパク質が同一である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 天然タンパク質をコードするオープンリーディングフレームと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するキメラ遺伝子の発現により得られたタンパク質で哺乳動物宿主を免疫化することを含み、ここで前記天然タンパク質はシグナル配列を有する遺伝子によりコードされ、そして前記キメラ遺伝子は異なるシグナル配列を有するので抗体が産生される条件下に配座異性体が産生され、前記抗体は前記天然タンパク質に対する前記抗体のアフィニティーと異なるアフィニティーで前記配座異性体に結合する、主要な正常野生型タンパク質の配座異性体以外の配座異性体に対する抗体を調製する方法。

【請求項8】 免疫化後、前記哺乳動物宿主からのBリンパ球を永久分裂能化して、永久分裂能化Bリンパ球スクリーニング抗体を形成し、

主要な正常野生型タンパク質の配座異性体と異なる配座異性体に対する異なるアルギン酸塩について前記抗体をスクリーニングして、異なる配座異性体特異的抗体を同定し、そして

前記異なる配座異性体特異的抗体を分泌する前記永久分裂能化Bリンパ球を単離する、ことをさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記哺乳動物宿主がマウスであり、前記Bリンパ球が脾細胞であり、そして前記永久分裂能化が腫瘍形成細胞を使用するハイブリドーマの産生である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 天然タンパク質をコードするオープンリーディングフレームと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するキメラ遺伝子の発現により得られた非変性タンパク質を、配座異性体および前記天然タンパク質と共通のアミノ酸のアクセス可能な側基を検出可能に修飾する因子と接触させて、配座異性体と、修飾された側基を含んでなる天然タンパク質とを産生し、ここで前記天然タンパク質はシグナル配列を有する遺伝子によりコードされ、そして前記キメラ遺伝子は異なるシグナル配列を有するので配座異性体が産生され、そして

前記配座異性体と前記天然タンパク質との間のコンフォメーションの差の指示として、前記配座異性体と前記天然タンパク質との間の前記修飾された側基における差を検出する、ことを含む、タンパク質におけるコンフォメーションの差を検出する方法。

【請求項11】 前記因子が架橋剤または化学的修飾剤である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記化学的修飾剤がN-スルホビオチンまたはトリニトロベンゼンスルホン酸である、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 プロテアーゼに対する前記問題のタンパク質の反応性を評価することをさらに含み、ここで前記天然タンパク質に比較して、変更された反応性は前記タンパク質におけるコンフォメーションの差を示す、請求項10に記載の方法。

【請求項14】 天然タンパク質をコードするオープンリーディングフレー

ムと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するキメラ遺伝子の発現により得られた非変性タンパク質を、高圧液体クロマトグラフィーにより分析することを含み、ここで前記天然タンパク質はシグナル配列を有する遺伝子によりコードされ、そして前記キメラ遺伝子は異なるシグナル配列を有するので配座異性体が産生され、ここで天然タンパク質に比較して前記問題のタンパク質のクロマトグラフプロファイルの変更はコンフォメーションの差を示す、問題のタンパク質におけるコンフォメーションの差を検出する方法。

【請求項15】 疎水性吸着カラムを使用して、前記高圧液体クロマトグラフィーを実行する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 主要な野生型タンパク質と異なる配座異性体が細胞宿主において発現により産生される、配座異性体が同定されなかったタンパク質からの、少なくとも2つの異なる配座異性体が存在する、試料中の配座異性体の産物を同定する方法であって、

前記野生型配座異性体に比較して前記異なる配座異性体に対して変更されたアフィニティーを有する実在物と、前記試料を組合わせ、そして

前記異なる配座異性体の存在の指示として前記実在物の結合を検出する、ことを含む前記方法。

【請求項17】 前記実在物が抗体である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記実在物が5kDaより小さい標識化分子である、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 非自然シグナル配列に結合されたPrPタンパク質のDNA配列を含んでなるDNA構築物。

【請求項20】 前記シグナル配列がCtm - PrPの形成を生ずる、請求項19に記載のDNA構築物。

【請求項21】 請求項19に記載のDNA構築物を含んでなる非ヒト哺乳動物。

【請求項22】 疾患状態に関連する環境的变化に個体からのリンパ球を暴露させ、そして

環境的变化に対する個体の応答の指示として、前記リンパ球におけるCtm - PrP

の発現変化を測定する、ことを含む、疾患状態に関連する環境的变化に対する個体の応答を評価する方法。

【請求項23】 対照の細胞、組織、器官または体液におけるCtm - PrPのレベルに関して、Ctm - PrPに関連する疾患により影響を受けた細胞、組織または器官におけるCtm - PrPのレベル、あるいは個体のCtm - PrPに関連する疾患により影響を受けた細胞、組織または器官に関連する細胞、組織または器官に関連する体液におけるCtm - PrPのレベルについてアッセイするか、あるいは

Ctm - PrPに関連する疾患に対する感受性の指示として、正常細胞による外部因子に応答するCtm - PrPのレベルに比較して、疾患に関係する細胞における外部因子に対するCtm - PrPのレベルの変化についてアッセイする、ことを含む、Ctm - PrPに関連する疾患に対する感受性について個体をスクリーニングする方法。

【請求項24】 前記疾患が神経変性疾患または筋障害である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記組織が脳組織または筋組織であり、前記細胞がリンパ球であり、そして前記体液が脳脊髄液である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】 タンパク質および任意の異なるそれらの配座異性体の形成に十分な時間の間、細胞を化合物と組合わせ、そして

前記化合物の非存在下に前記異なる配座異性体の量に比較して前記異なる配座異性体の変更量についてアッセイする、ことを含む、タンパク質の異なる配座異性体の相対量に対する効果について化合物をスクリーニングする方法。

【請求項27】 哺乳動物に化合物を供給し、そして

前記哺乳動物の体液または組織中の前記化合物の非存在下にタンパク質の配座異性体の相対量に比較して、タンパク質の配座異性体の相対量の変化を測定する、ことを含む、哺乳動物において産生されるタンパク質の異なる配座異性体の相対量に対する効果について化合物をスクリーニングする方法。

【請求項28】 前記タンパク質がPrPである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 キメラ宿主を因子と接触させ、ここで前記キメラ宿主は、異なる種からの前記タンパク質をコードする外来遺伝子、あるいは前記タンパク質をコードする前記遺伝子と同一の転位メカニズムによりプロセッシングされる内

因性遺伝子以外の外来遺伝子を有するにより特徴づけられ、そして

前記内因性遺伝子の代理として前記外来遺伝子に対する前記因子の効果を決定する、ことを含む、内因性タンパク質の配座異性体の相対量に対する因子の効果を決定する方法。

【請求項30】 分画されたライゼイト中で、天然タンパク質をコードするオープンリーディングフレームと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するキメラ遺伝子を発現させ、ここで前記天然タンパク質はシグナル配列を有する遺伝子によりコードされ、そして前記キメラ遺伝子は異なるシグナル配列を有し、ここで前記タンパク質はCtm - PrP以外であり、これにより変更されたコンフォメーションを有する1またはそれ以上のタンパク質を産生させる、ことを含む方法により産生された、変更されたコンフォメーションを有する1またはそれ以上のタンパク質。

【請求項31】 分画され、再構成された膜を使用して、天然タンパク質をコードするオープンリーディングフレームと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するキメラ遺伝子を発現させ、ここで前記天然タンパク質はシグナル配列を有する遺伝子によりコードされ、そして前記キメラ遺伝子は異なるシグナル配列を有し、ここで前記タンパク質はCtm - PrP以外であり、これにより変更されたコンフォメーションを有する1またはそれ以上のタンパク質を産生させる、ことを含む方法により産生された、変更されたコンフォメーションを有する1またはそれ以上のタンパク質。

【請求項32】 天然タンパク質をコードするオープンリーディングフレームと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するキメラ遺伝子を発現させ、ここで前記天然タンパク質はシグナル配列を有する遺伝子によりコードされ、そして前記キメラ遺伝子は異なるシグナル配列を有し、ここで前記タンパク質はCtm - PrP以外であり、これにより前記天然タンパク質に比較して変更されたコンフォメーションを有する少なくとも1つのタンパク質を産生させる、ことを含む、タンパク質のコンフォメーションを変更させる方法。

【請求項33】 前記発現は全ライゼイトまたは分画ライゼイト中で行われ、前記ライゼイトは前記天然タンパク質の発現に関連するシグナル配列、新生鎖

または転位機構が相互作用する1またはそれ以上のタンパク質をコードする変更された遺伝子を欠如するかまたは有する1またはそれ以上の生物からの全膜または分画され、再構成された膜が補充されている、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記生物が天然に存在する、請求項32に記載の方法。

【請求項35】 前記生物が欠如する遺伝子がトランス作用性因子をコードする、請求項32に記載の方法。

【請求項36】 前記生物がウニ胚である、請求項32に記載の方法。

【請求項37】 請求項31に記載の方法により産生され、Ctm - PrP以外である、変更されたコンフォメーションを有する1またはそれ以上の突然変異体またはキメラタンパク質。

【請求項38】 前記異なるシグナル配列が調節可能なシグナル配列である、請求項32に記載の方法。

【請求項39】 前記調節可能なシグナル配列が1またはそれ以上のトランス作用性因子により調節される、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 少なくとも2つの条件下に、各キメラ遺伝子が異なるシグナル配列を有する、各々がと少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を有する同義キメラ遺伝子を発現させ、これにより変更されたコンフォメーションを有する1またはそれ以上のタンパク質を産生させ、ここで前記条件は、

- a. 分画したライゼイト、
- b. 分画され、再構成された膜、および
- c. 前記天然タンパク質の発現に関連するシグナル配列、新生鎖または転位機構が相互作用する1またはそれ以上のタンパク質のための変更された遺伝子を欠如するかまたは有するか、あるいは前記タンパク質のためのミッシング遺伝子を供給する、哺乳動物からの全膜または再構成膜が補充された分画ライゼイト、
- d. 前記天然タンパク質の発現に関連するシグナル配列、新生鎖または転位機構が相互作用する1またはそれ以上のタンパク質のための変更された遺伝子を欠如するかまたは有するか、あるいは前記タンパク質のためのミッシング遺伝子を供給する、非哺乳動物からの全膜または再構成膜が補充された分画ライゼイト

e. 細胞質ゾル混合物、を包含し、

各前記異なるシグナル配列の分類の指示として、前記少なくとも2つの条件下に前記同義キメラ遺伝子から得られた発現産物を評価する、ことを含む、シグナル配列を分類する方法。

【請求項41】 プロラクチンのコンフォメーション変化のリポーターとして操作されたグリコシル化アクセプター部位を含んでなるPrPまたはプロラクチンを前記DNA配列がコードする、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 プロテアーゼ処理に対する反応性、高圧液体クロマトグラフィー、側基の修飾から成る群から選択される方法により、前記発現産物を評価する、請求項40に記載の方法。

【請求項43】 動物から得られた複数のバイオプシー試料中のタンパク質のコンフォメーション分布を比較し、そして

配座異性体の定量分布の変化の指示として、前記複数のバイオプシー試料において発現される各コンフォメーションの量を測定する、少なくとも2つの異なる形態を有するタンパク質分子の配座異性体の定量分布の変化を同定する方法。

【請求項44】 前記複数のバイオプシー試料を前記動物中の異なる組織から採取する、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 前記複数のバイオプシー試料を異なる時間間隔で採取する、請求項43に記載の方法。

【請求項46】 疾患関連タンパク質の1またはそれ以上の配座異性体を含んでなり、ここで前記疾患関連タンパク質の前記配座異性体はC_{tm}-PrP以外である、単離された細胞または組換え非ヒト細胞。

【請求項47】 前記疾患が神経変性疾患または筋障害である、請求項46に記載の単離された細胞または組換え非ヒト細胞。

【請求項48】 疾患関連タンパク質の配座異性体がC_{tm}-PrP以外である、疾患関連タンパク質の単離されたまたは精製された配座異性体。

【請求項49】 請求項1に記載の方法により配座異性体が同定される、疾患関連タンパク質の単離されたまたは精製された配座異性体。

【請求項50】 疾患関連タンパク質をコードするオープンリーディングフレームと、前記タンパク質に対して自然であるシグナル配列以外のシグナル配列とを含んでなる、キメラ遺伝子。

【請求項51】 前記疾患関連タンパク質がプリオンタンパク質である、請求項50に記載のキメラ遺伝子。

【請求項52】 トランス作用性因子に結合した疾患関連タンパク質の新生鎖を含んでなる、単離された細胞または組換え非ヒト細胞。

【請求項53】 疾患関連タンパク質をコードする遺伝子を含んでなり、ここで前記遺伝子のシグナル配列がトランス作用性因子に結合されている、単離された細胞または組換え非ヒト細胞。

【請求項54】 前記トランス作用性因子が前記疾患関連タンパク質の配座異性体を変更することができる、請求項52または53に記載の単離された細胞または組換え非ヒト細胞。

【請求項55】 前記トランス作用性因子がプリオンタンパク質である、請求項52または53に記載の単離された細胞または組換え非ヒト細胞。

【発明の詳細な説明】**【0001】****序論****技術分野**

本発明の分野は生物学的モデルおよび療法である。

背景

従来、高等真核生物における遺伝子発現は、一般に、ゲノムの中にコードされた情報を、転写プロセス、RNAスプライシングおよび輸出、および翻訳により、タンパク質に変換することを含むと考えられる。新しく合成されたタンパク質の正しい細胞内区画への局在化、および正しい三次構造へのフォールディングは、原理的に、遺伝子発現を調節できる、2つの追加のプロセスである。しかしながら、現在まで、前者は忠実度 (Song他、Cell (2000) 100 : 333 - 343)、分解 (Wiertz他、Nature (1966) 384 : 432 - 438)、または他の区画に対するシグナリング (Sidrauski他、Trends Cell Biol. (1998) 8 : 245 - 249) に関してのみ調節されるが、発現された遺伝子の情報量に関して調節されないと理解されてきている。同様に、フォールディングはまた遺伝子発現の基本的調節点と見られてきていない。一般に、適切にフォールディングされたタンパク質とミスフォールディングされたタンパク質との間の二分法が受け入れられた (Ellgaard他、Science (1999) 286 : 1882 - 1888)。タンパク質が2以上の適切にフォールディングされた状態を有することができかつ細胞が特定の環境または条件下に他のフォールディングされた状態に対して1つを選択することができる可能性は、慎重に考慮されてきていない。これらの可能性のいずれかが真実である場合、ゲノムの情報量は大きく増加されるであろう。ある発明が1つの情報を他に対して選択可能とする場合、このような発明は従来不可能であった方法でゲノムの情報量を決定しかつアクセスするためのプラットフォームであろう。

【0002】

タンパク質フォールディングに関して、現代的生物学の基本的定説は一次構造が二次構造を決定することであり、二次構造は関係する翻訳後修飾、例えば、グリコシル化と一緒にタンパク質の三次構造を決定する (Anfinsen、Science (197

3) 181 : 223 - 230)。分子シャペロンが不適切な相互作用を防止し、これにより適切な最後のフォールディングされた状態を達成するプロセスを促進することによって、タンパク質フォールディングの忠実度の増強においてきわめて重要な役割を演ずるという認識により、前記見解は修正された (EllisおよびHartl、Faseb J. (1996) 10 : 20 - 26)。フォールディングが分子の多数の部分において同時に開始され、この道に沿ったすべての可能性をサンプリングしないで最小のエネルギー状態に連鎖を向かわせるようであるという認識は、タンパク質フォールディングの一般的に受け入れられた見解の第2修正を構成した (DillおよびChan、Nature Struct. Biol. (1997) 4 : 10)。これらの見解のいずれも、1つ対他の組のタンパク質 - タンパク質の相互作用に依存的な1つ対他の経路を進行するという意味において、フォールディングを調節できるという可能性を考慮していない。これが真相である場合、診断または療法的利益を与えることができる方法でタンパク質フォールディングを操作することができる。

【0003】

細胞から分泌される運命にあるタンパク質は一般にアミノ末端にシグナル配列を含有し、このシグナル配列は成長する鎖を小胞体 (ER) 膜に向け、転位チャンネルを通してER内腔の中に入れる、1系列のタンパク質 - タンパク質の相互作用を開始する (Blobel、PNAS (1980) 77 : 1496 - 1500)。これらのプロセスにおけるシグナル認識粒子およびそのレセプター (WalterおよびJohnson、1996) およびヘテロトリマーSec61複合体 (GorlichおよびRapoport、Cell (1993) 75 : 615 - 630) および他のタンパク質 (JungnickelおよびRapoport、Cell (1996) 82 : 261 - 270) の役割が解明された。

【0004】

内在性膜タンパク質のER膜へのアセンブリーはこの一般的主題に対する複雑な変形であり、内部のシグナル配列および膜透過停止配列およびハイブリッドシグナルアンカー配列により指令され、種々のERタンパク質とのそれらの相互作用はポリペプチドの最終膜貫通配向を指令し、鎖がトランスロケーションチャンネルから脂質二重層の中へ解放された後、二重層中のタンパク質の定着において引き続き役割をしばしば演ずる (SkachおよびLingappa、J. Biol. Chem. (1993) 2

68 : 23552 - 23561 ; BorelおよびSimon、Cell (1996) 85 : 379 - 389 ; Heinrich他、Cell (2000) 102 : 233 - 244 ; Moss他、Mol. Biol. Cell (1998) 9 : 2681 - 2697)。

【0005】

分泌タンパク質の場合において、シグナル配列は通常成長する鎖からER膜関連シグナルペプチダーゼ複合体により切断され、ER内腔の中に新生鎖を捕捉し (Matlack他、J. Cell. Biol. (1999) 270 : 6170 - 6180)、切断されたシグナルペプチドは細胞質ゾルに戻され、分解されるであろう (Lyko他、J. Biol. Chem. (1995) 270 : 19873 - 19878)。細菌および原始真核生物、例えば、酵母において、合成が完結した後、実質的な量のトランスロケーションが起こる (Rapport他、J. Biol. Chem. (1999) 380 : 1143 - 1150)。このような翻訳後トランスロケーションにおいて、変性状態を維持するための分子シャペロンとしてのシグナル配列の役割が提案された (Liu他、PNAS (1986) 86 : 9213 - 9217)。しかしながら、高等真核生物において、ER膜を横切る大部分のトランスロケーションが共翻訳的に、すなわち、鎖がまだつくられている間に、起こり、新生鎖はER内腔に直接的に転移し、ここでフォールディングが開始されることが一般に仮定された (ChenおよびHelenius、Mol. Biol. Cell (2000) 11 : 765 - 772)。

【0006】

総合すると、ここに提示する研究は、タンパク質フォールディングの現在のパラダイムにおいていくつかの修正が必要であることを示唆する：

第1に、適切にフォールドされたタンパク質と、ミスフォールドされたタンパク質との間の簡単な二分法を捨てなくてはならない。タンパク質フォールディングは多数の適切にフォールドされた状態を生ずることができ、これらの状態は異なる機能を潜在的に促進することができることを認識することが必要である。ほとんどの場合において、これらの検出することが極めて困難である。なぜなら、タンパク質のコンフォメーション変異型を容易に区別するツールは制限され、容易適用されないばかりでなく、かつまた細胞が所定の時点において望まない変異型を分解することによって仕事を複雑化するからである。

【0007】

第2に、細胞は1つのフォールドされた状態（したがって、1つの機能）を1つの時間に選択する（分解メカニズムに生き残り、細胞の表面に輸送されるかまたは細胞の中から外に輸送され）が、他のフォールドされた状態（および他の機能）を他の時間に選択できるメカニズムを有することを認識しなくてはならない。

【0008】

第3に、ER膜を横切るトランスロケーションに関係する機構および決定因子は、新しく合成されたタンパク質が進行するフォールディングファンネル（folding funnel）の選択において重要な役割を演じ、そして鎖が細胞質ゾル、膜またはER内腔中で相互作用するシグナル配列または機構の操作は、選択したフォールディングファンネルを変化させ、したがって、タンパク質のコンフォメーションまたはコンフォメーションの組み合わせを変化させる方法であることが明らかである。

【0009】

タンパク質フォールディングのパラダイムの最初の2つの修正の主要な関係は、ゲノムの情報量を非常に増加させることである。第3の主要な関係は、診断および療法的利点を得るために、この増加したゲノムの情報量をアクセスする手段を明らかにして、本発明を発生させることである。

【0010】

背景のこれらの点を解明するほかに、タンパク質の最終一次構造を変化させない方法で任意の所定のタンパク質についてフォールディングファンネルの選択を変更することができるが、タンパク質の最終のフォールドされたコンフォメーションまたは形状を劇的に変化させることができる、本発明を我々の研究により証明する。シグナル配列は成長するポリペプチド鎖が利用するフォールディングファンネルに影響を及ぼすことができ、これにより、生ずる新しく合成されたタンパク質の最終のフォールドされたコンフォメーションに影響を及ぼすことができることを我々は証明する。さらに、細胞はシグナル配列仲介調節を通して他の最終コンフォメーションに対して1つの最終コンフォメーションを選択することができる。異なる方法における線形ポリペプチド配列のフォールディングは実質的に異なる形状を有することができるので、この新しいレベルの調節はゲノムの情

報量および細胞に対して有効な遺伝子発現の調節の可能性を大きく増加させる。

【0011】

発明の要約

トポグラフィーおよび/またはトポロジータンパク質を製造し、キメラタンパク質を提供し、トポグラフィー的および/またはトポロジータンパク質の形成に関する特異的因子を同定する方法および組成物、in vitroおよびin vivo系のモデル、およびトポグラフィー的および/またはトポロジータンパク質を同定する方法が提供される。組成が変化するタンパク質は、シグナル配列を変化させ、野生型シグナル配列を既知のメカニズムの配列と置換し、in vitroトランスロケーションモデル系の中にトランスロコン関連タンパク質を選択的に添加し、コンフォメーション的に明確なタンパク質を研究し、産生するために、ターゲットタンパク質のトポグラフィー的産生をモジュレートする、ノックアウトおよび突然変異の小さい実験室哺乳動物を産生し、使用し、生理学的メカニズムを解明するために、ミクロソームとともに修飾されたライゼイトを使用することによって、コンフォメーションが変化するタンパク質は製造される。

【0012】

特定の態様の説明

タンパク質転位系の因子を含む方法および組成物は、この系の成分およびそれらの機能を解明し、非天然シグナル配列を用いるキメラ遺伝子を使用するタンパク質のフォールディングをモジュレートして「配座異性体」（少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列を有するが、異なる物理的トポロジータンパク質を有するタンパク質）を形成するために使用される。トポロジータンパク質とは、タンパク質の異なる配置、例えば、N-細胞質ゾルに比較してC-細胞質ゾルを意図し、そしてトポグラフィーは、配座異性体を同定し、これらの目的のためにin vitroおよびin vivo系を提供し、そしてトランスロケーション間のタンパク質のコンフォメーションをモジュレートする組成物を同定するときの、外部のコンフォメーションまたは形状の変化を意図する。トポグラフィーは、本明細書において使用するとき、実質的に同一であるか、あるいは類似するアミノ酸配列を有するが、フォールディング/コンフォメーションが異なるために異なる三次元形状を

有するタンパク質を意味する。本明細書において使用するとき、実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、タンパク質のコンフォメーションまたはトポロジーを変更しない、保存的アミノ酸置換（すなわち、それぞれ、小さいまたは大きい側鎖について小さいまたは大きい側鎖；またはそれぞれ、酸性、塩基性、極性または疎水性の側鎖について酸性、塩基性、極性または疎水性の側鎖）を有するポリペプチドである。網状赤血球ライゼイト分画スキームを使用して、タンパク質生合成間のフォールディングファンネルのシグナル配列仲介選択を調節する、同義遺伝子産物を同定する方法が提供される。翻訳抽出物を分画し、そして特定のトランス作用活性を含有するか、あるいは欠如するサブフラクションを再構成する可溶化膜を分画する方法は、現存する系を越えたいくつかの利点を提供する。このプロセスは容易に大規模化することができる；分画に必要な材料は安価である（普通の化学物質）であるか、あるいは再使用可能である（遠心管、イオン交換樹脂）；そして最終生成物は、適当に貯蔵するとき、長い貯蔵寿命を有する。

【0013】

分画系は現在入手可能なRRLを越えたいくつかの利点を提供し、これらの利点は下記のを包含する：アフリカツメガエル（Xenopus）卵母細胞からのS-100画分にRRLリボソームを単に補充すると、以前の卵母細胞翻訳系（2）よりも1桁より大きい翻訳効率を得られることを我々は証明した。このような卵母細胞系を使用して特異的事象、例えば、発生的調節された因子の翻訳抑制を研究することができる；そして、また、イヌ臍臓からの粗面ミクロソーム調製物の中に含有されるリボソームは、DEAE画分に対する翻訳を回復するとき高度に活性であるように思われる。こうして、イヌ臍臓リボソームがタンパク質を翻訳し、イヌ臍臓膜を横切ってタンパク質を転位させる、本質的に均質な系において、トランスロケーション事象を研究することができる。リボソームとトランスロコンタンパク質との間の微妙な、調節された相互作用は、異種系に対して相同的系において、いっそう正確に再現することができる。

【0014】

この系は他の翻訳系、例えば、コムギ胚芽翻訳系、またはアフリカツメガエル

卵母細胞翻訳系に容易に適合させることができる。ある場合において、分画された系は翻訳効率を非常に増加させる（上を参照）。さらに、複数のこのような分画された系からの成分を混合し、合致させることができるので、ある種のタンパク質の生合成に関係する組織特異的事象を研究することができる。これは、相補性により、このような組織特異的事象に関係する因子を同定するとき、潜在的に有効である。このような組織特異的差の例は記載された（WolinおよびWalter、J. Cell. Biol. (1989) 109 : 2617 - 2622 ; Lopez他、Science (1990) 248 : 226 - 229）。

【0015】

問題のタンパク質は、シグナル配列を有し、小胞体中でプロセシングされるタンパク質である。多数のシグナル配列が異なるタンパク質から同定され、広い範囲の非天然タンパク質に対する複合化に操作可能であるように思われる。シグナル配列は通常N末端であるが、タンパク質またはC末端に対して内部であることができる。シグナル配列は産物のコンフォメーションに影響を与えるトランスロケーションのための特異的メカニズムを有することが知られているか、あるいは合成することができるタンパク質から選択され、ここでトランスロケーションの効果は既知であるか、あるいは測定される。シグナル配列はトランスロコンと組み合わせて翻訳されるタンパク質のコンフォメーションに影響を与えることは、現在知られている。理論により拘束されないで、シグナル配列はリボソームが小胞体（ER）と堅固な、弛い、または中間の連結を形成するかどうかを指令し、そして翻訳されたタンパク質が転位またはプロセシングされるチャンネルおよび付随するプロセシングタンパク質の選択を指令する。例えば、あるタンパク質のシグナル配列をプレプロラクチンからのシグナル配列で置換すると、堅固な連結が生ずるが、プレ - - ラクタマーゼからのシグナル配列は弛い連結を提供する。堅固な連結を提供するタンパク質は成長ホルモンを包含し；そして弛い連結は免疫学的重鎖および酵母アルファ - 因子を包含し；そして中間の連結はズクチン、カルレチクリン、PrP、アンギオテンシノゲンおよびMDR - 1を包含し、ここで異なる配座異性体間の分割は種々のメカニズムに帰することができる。（リボソーム - 膜連結の効果の説明について、例えば、下記の文献を参照のこと：Hedgeおよ

びLigappa、(1996) Cell 85:217-228)。トランスロケーションのメカニズムの一般的説明について、例えば、下記の文献を参照のこと：Ellgaard他、(1999) Science 286:1882-1888；Wickner他、(1999) Science 286:1888-1893；およびIbbaおよびSoll、(1999) Science 286:1893-1897。

【0016】

シグナル配列は、発現について競合的なライゼイト、ミクロソームおよびプロテイナーゼKを使用することによって等級づけることができる。異なるシグナル配列および普通の遺伝子を使用して発生するタンパク質分解の程度は、リボソームと小胞体との連結の特質を示す。異なる程度の連結の堅固さを有するシグナル配列を使用することによって、生ずるタンパク質のコンフォメーションを変更することができる。これらの異なる配座異性体は多数の方法において使用することができる。配座異性体は抗体、抗血清または好ましくはモノクローナル抗体の産生に使用することができる。慣用法において異なるタンパク質配座異性体をアジュバントの存在または非存在下に使用して、宿主、通常モノクローナル抗体の場合においてマウスを免疫化し、次いで2週またはより長い間隔でタンパク質を追加的に注射し、抗血清を残すをモニターすることによって、抗血清および抗体を調製する。モノクローナル抗体について、脾細胞を単離し、永久分裂能化し、スクリーニングすることができる。配座異性体間を区別することができる抗血清を産生するハイブリドーマを拡張する。2つの配座異性体を区別する抗体のライブラリーを産生する。次いで抗体を使用して配座異性体の各々を単離し、タンパク質の特質に対して適当な生理学的試料を使用して、宿主における異なる配座異性体についてアッセイすることができる。

【0017】

また、問題の真性コーディング領域の5'末端におけるシグナル配列をコードするトランケートド転写物を無細胞翻訳により発現させ、化学的に架橋させるとき、発生した架橋パターンの解析により、シグナル配列を等級づけることができる。化学的架橋はリシンおよびシステイン特異的切断可能および切断不可能な架橋を包含するが、これらに限定されない。免疫沈降およびドデシル硫酸ナトリウム中のポリアクリルアミドゲルの電気泳動および引き続くオートラジオグラフィ

ーにより、架橋パターンを解析することができる。

【0018】

異なるオリゴペプチドおよび/またはオリゴヌクレオチドのマトリックスを使用することによって、異なる配座異性体をスクリーニングすることができる。例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第5,631,734号、米国特許第5,856,102号および米国特許第5,919,523号。これらのマトリックスは商業的に入手可能であり、そして特定の結合パターンに関して調製することができる。このようにして、生理学的試料を添加し、どの配座異性体が存在するかを決定し、各々の量を推定することができる。また、マトリックスを使用して、マトリックスに対する結合アフィニティーにより特定の配座異性体を単離することができる。マトリックスおよび抗体を組合わせて使用して、他のアッセイを確認し、配座異性体を単離し、同一アッセイにおいて一緒に使用することができる。アッセイそれら自体または他のアフィニティー結合アッセイと組合わせたアッセイにおいて、抗体を検出可能な標識、例えば、蛍光体、発光体、リン光体、酵素、放射性同位体、およびその他で標識化することができる。配座異性体を区別できる、特異的エピトープを定める多数のプロトコルが入手可能である。ある場合において、2またはそれ以上の抗体を使用することが望ましいことがあり、ここで配座異性体を結合の立体的阻害、異なるアフィニティー定数、またはその他により定めることができる。

【0019】

配座異性体をオリゴマー、特にオリゴペプチドにより区別できるという事実により、これらのオリゴペプチドを異なる配座異性体の同定に使用できる。配座異性体に結合する部位または他の化合物、特に小さい天然または合成の有機化合物、5kDaより小さい、通常約2.5kDaより小さい化合物について競合する、他のオリゴペプチドを同定する競合アッセイにおいて、オリゴペプチドを使用することができる。次いでこれらの化合物を使用して、その部位に対してより大きいアフィニティーを有する他の化合物を同定することができる。このようにして、他の配座異性体に比較して、1つの配座異性体に対して特異的である薬剤を同定することができる。種々の結合性実在物をアッセイにおいて使用することができ、こ

ここで実在物を標識化して配座異性体に対して結合を同定することができる。

【0020】

所望ならば、野生型および/またはキメラ遺伝子のランダム突然変異を使用して、生ずる遺伝子を発現させることができる。タンパク質を親遺伝子との類似性および差について分析することができる。ここで突然変異体の作用は配座異性体を1つのコンフォメーションから他のコンフォメーションに変化させること、または抗体結合により測定して、エピトープを変化させることである。あるいは、非変性条件下に化学的修飾因子に対する反応性の変更により決定して、架橋パターンまたはコンフォメーションの差を発生させることである。修飾因子はN-スルホピオチン、トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)、N-エチルマレイミド(NEM)を包含するが、これらに限定されない。遺伝子またはタンパク質はヒト患者または動物から発現し、ここで突然変異は自然に発生するか、あるいは遺伝子の突然変異の結果であり、遺伝子またはタンパク質をランダムに突然変異した遺伝子および哺乳動物宿主におけるその発現産物と比較することができる。このようにして、異なる配座異性体に導く突然変異から生ずる疾患状態を診断し、治療を開発することができる。

【0021】

配座異性体は患者の診断および治療を促進する生化学的目的に使用することができる。配座異性体は、常態でまたは異なる環境下に異なる比で配座異性体を産生する、個々の宿主を区別する働きをする。環境の1つは化合物、特に薬剤の存在、およびターゲットの生理学的に活性な化合物、通常タンパク質、例えば、膜レセプター、チャンネル、酵素、転写因子、ハウスキーピングタンパク質、細胞骨格タンパク質、膜、およびその他の結合アフィニティーおよび/または活性のモジュレーションの存在である。配座異性体は移動性または非移動性タンパク質であり、膜に結合するか、あるいは溶液中で遊離であることができる。化合物を異なる配座異性体と、同一または異なる容器中で混合し、配座異性体に対する化合物の結合を測定する。測定は種々の方法で、競合的または非競合的に実施することができる。溶液の中に残留する化合物の量を測定することができ、ここで量の減少は配座異性体に対する化合物の結合を示すであろう。選択的に、タンパク

質の特定の領域に関する結合が重要である場合、例えば、酵素およびレセプター、ならびに特定の部位が生物学的活性に関係づけられる他のタンパク質、例えば、G-タンパク質、転写因子、DNA結合性タンパク質、およびその他の場合において、配座異性体に結合する標識化合物を使用することができる。

【0022】

また、生理学的活性に関する活性の差を測定するとき、配座異性体は有効である。均質または不均質である、アッセイにおいて結合相手に対する結合アフィニティーを測定することができる。これにより、2つの配座異性体の比率に関して哺乳動物宿主の活性レベルを評価することができる。再び、リガンドとレセプターとの間、または複合体形成に関係する2またはそれ以上のタンパク質の間の結合を検出するために、多数のプロトコルが利用可能である。2つのタンパク質の結合が一緒に蛍光体の波長における放射レベルを減少しかつエネルギーアクセプターのレベルにおける放射を増加するように、2つのタンパク質を蛍光体またはエネルギーレセプターで標識化することができる。選択的に、タンパク質の一方を表面に結合させ、結合したタンパク質に対する他方のタンパク質の結合レベルを標識化した第2タンパク質により測定することができる。選択的に、タンパク質の各々を異なる粒子に結合させることができ、ここで一方の粒子は化合物を産生し、この化合物は他方の粒子、例えば、LOCIを活性化する。標識化実在物が小さく、例えば、オリゴマーまたは小さい有機化合物である場合、蛍光体を標識として使用し、そして蛍光の偏光を検出に使用することができる。アッセイの例示は米国特許第5,989,921号、米国特許第4,806,488号、米国特許第4,318,707号、米国特許第4,255,329号、米国特許第4,233,402号、および米国特許第4,199,559号に記載されているアッセイである。

【0023】

生理学的試料のスクリーニングにおいて配座異性体の存在を決定するとき、試料は血液、細胞、csf、唾液、尿、毛、およびその他であることができる。試料を前処理する、例えば、クエン酸塩を血液に添加し、赤血球を凝固し、分離し、希釈し、抽出し、およびその他を実施することができる。こうして、配座異性体は特定の適用に関連して同定することができ、適用は疾患、薬剤に対する応答、

物理的性能、細胞変性、アポトーシス、およびその他にすることができる。

【0024】

本発明の力の例示はプリオンの研究である。シグナル配列を変化させることによって、天然のコンフォメーション^{s[°]c}PrP、および他の2つのコンフォメーション、^{N^un}Prpおよび神経変性^{C^un}PrPを変化量で得ることができることが発見された。これは野生型の形態に比較して神経変性形態の形成比率が変化するメカニズムの決定を促進する。類似する方法で、シグナル配列を有する他のタンパク質についてのシグナル配列を変化させることができ、ここでタンパク質は疾患状態または能力の低下に関連することが推測される。次いで、タンパク質を変化するコンフォメーションで産生することができるかどうかを決定することができる。前述したように、異なる配座異性体が見出される場合、疾患を有するか、あるいは能力が低下した患者に比較して、異なる配座異性体の存在は健康な正常の患者において確立される。次いで、前述したように、薬剤を望ましくない配座異性体に対してスクリーニングすることができる。

【0025】

さらに、異なるシグナル配列を使用することによって、所望の配座異性体と望ましくない配座異性体との間の比率の変化についての基準を研究することができる。それと組み合わせて、それに加えてまたはその代わりに、配座異性体を形成するER関連患者の役割を研究するために、in vitroライゼイトを使用することができる。トランスロケーションのために必須なタンパク質を除いてすべてのタンパク質を欠如するミクロソームを調製する。次いで個々のタンパク質を個々にまたは組合わせて置換して、配座異性体の形成に対する1またはそれ以上のタンパク質の存在の効果を決定することができる。いったん配座異性体の形成に関係する1またはそれ以上のタンパク質が決定されると、健康な患者および異常な患者を配座異性体の形成に関係する1またはそれ以上のタンパク質の存在についてスクリーニングし、突然変異または異なる配座異性体の存在を決定することができる。このようにして、トランスロコン中でタンパク質がフォールディングするメカニズムを解明するばかりでなく、かつまた療法の新しいターゲットを確立する。

【0026】

無細胞タンパク質翻訳混合物について、種々の系を使用することができる (EricksonおよびBlobel、Methods Enzymol. 96:38-50 (1983) ; Merrick、Methods Enzymol. 101:606-615 (1983))。例示は商業的供給会社、例えば、プロメガ (Promega、ウイスコンシン州マディソン) から入手可能であるコムギ胚芽抽出物およびウサギ網状赤血球抽出物、ならびにそれらの高速度上清である。他の参考文献は次の通りである：米国特許第5,998,163号、米国特許第5,998,136号および米国特許第5,989,833号。このような系は、翻訳機構 (tRNA、リボソーム、およびその他) を含有する無細胞抽出物に加えて、エネルギー源 (ATP、GTP)、およびアミノ酸の完全な補体を含む。この分野において知られている方法を使用して、例えば、反応間にアミノ末端方向ヌクレオチドエネルギー源を添加するか、または選択的エネルギー源、例えば、リン酸クレアチン/クレアチンホスホキナーゼを添加することによって、タンパク質合成を維持するために十分なエネルギーレベルを維持する。標準翻訳混合物の中に存在するATPおよびGTPは一般に約0.1~10mM、より通常0.5~2mMの範囲の濃度であろう。一般に、ヌクレオチドの量は、少なくとも約5ピコモルの生成物、好ましくは少なくとも約10ピコモルの生成物を提供するために十分であろう。

【0027】

また、リンパ球はPrPを形成し、物質、例えば、化合物を候補の薬剤の作用のためのスクリーンとして、または環境変化または物理的障害に対する個体の応答のためのスクリーンとして使用することができる。リンパ球を環境変化に対して暴露される。環境変化は化学的变化、例えば、化合物の添加、物理的变化、例えば、pH、およびその他の変化であることができ、ここで変化に対する特定の細胞の感受性はPrPの特質を変化させることによって環境変化に対して応答する個体の性向の測度として測定されるであろう。汚染物質、農薬、およびその他を含むことがある、環境変化に対する応答を測定することによって、化合物が一般的脅威であるか、あるいは特異体質の人にのみ影響を与えるかどうかを決定することができる。また、細胞を使用して、正常の個体に比較してリンパ球中のC_{tm}-PrPの存在および/またはレベルを測定することによって、神経変性疾患に対して症候

性である患者がCtm - PrP関係疾患を有するかどうかを決定することができる。本明細書に記載するように多数のアッセイを使用して、Ctm - PrPのみ存在およびレベルを測定することができる。神経変性疾患の性向を検出することによって、神経変性疾患の確率を増加させることがある化合物の活性または暴露から離れる方向に患者を向けることができる。さらに、類似する方法で応答する他の疾患に対する活性に関する代替作用として、Ctm - PrPに対する化合物の作用を使用することができる。また、細胞を個々の患者について使用して、種々の薬剤に対する個体の応答を評価し、Ctm - PrPの産生に対する薬剤の作用を決定することができる。

【0028】

前述したように、多数のタンパク質は異なるトランスロケーションの結果を有する。トランスロケーション経路において代替物を有することが知られているタンパク質、例えば、2つの異なる配座異性体の中に存在するもの、f - Metとして選択することができる異なるメチオニンの存在、鎖の中に約15~20アミノ酸の疎水性領域を有し、推定上のトランスメンブラン配列であることができるが、分泌されたタンパク質として利用可能であるか、あるいは分泌されるトランスメンブランである、異なるシグナル配列を生ずる、タンパク質をトランスロケーションの結果に対する化合物の作用のマーカースとして使用することができる。例示的タンパク質は、ズクチン、カルレチクリン、MDR - 1、およびPrPを包含する。

【0029】

多数のタンパク質はトランスロケーションプロセスにおいてERに関連し、しばしばER一部分であり、そして新生タンパク質がER内腔に輸送されるチャンネルに関連する。これらのタンパク質は、リボソーム、シグナル認識粒子 (SRP) のタンパク質、 、 、および - サブユニットとのヘテロトリマーSec61複合体、転位鎖関連膜タンパク質 (TRAM)、シグナルペプチド (5つのタンパク質の複合体)、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (3 - タンパク質複合体)、ER内腔タンパク質、例えば、BiP、GRP94、カイネキシン (CNX)、ERGIC - 53、タンパク質ジサルファイドイソメラーゼ (PDI)、Erp57、Erp72、シャペロン、例えば、Hsp90、hsp47、Hsp60またはGroELファミリー、Hsp70またはDnakファミリー、Hsp1

00またはClpファミリー、および熱ショック同族体70、タパシン、マイクロソームトリグリセリド転移タンパク質、保護的タンパク質/カテプシンA、 - カテニン、エガシン、コシャペロン、例えば、DnaJファミリーからのタンパク質、酵素、例えば、ウリジン5' - ジホスフェート (UDP) - グルコース : 糖タンパク質グリコシルトランスフェラーゼ (GT)、グルコシダーゼII、プロリル - ヒドロキシラーゼおよびカルボキシエステラーゼを包含する。

【0030】

ERおよびトランスロケーション産物のトランスロケーションに関連する補助的タンパク質は、文献に記載されている方法によりライゼイトから除去することができる。(Gorlich他、(1992) Nature 357 : 47 - 52 ; GorlichおよびRapoport、(1993) Cell 75 : 615 - 630 ; およびHanein他、(1996) Cell 87 : 721 - 732。

【0031】

問題のタンパク質中のシグナル配列を変化させることによって、哺乳動物宿主における発現のための遺伝子を調製することができる。今日、DNA配列を置換してキメラ遺伝子を形成する多数の方法が存在する。例えば、下記の文献を参照のこと : Sambrook他、(1989)、A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Press。簡単に述べると、アミノ酸配列を知り、デジェネレートプローブを使用して、遺伝子のDNAを単離する。プローブに結合するDNA配列を単離し、配列決定して、問題のタンパク質をコードする配列の存在を知る。イントロンの存在を回避しようとする場合、mRNAを単離し、逆転写し、PCRにより増幅することができる。1対のプライマーを使用する増幅により、いずれの状況におけるシグナル配列も異なるシグナル配列で置換することができる。ここで一方のプライマーはその5'末端においてシグナル配列を有し、このシグナル配列は天然シグナル配列と隣接する遺伝子の配列に対して相補的である配列に結合されており、他方のプライマーは第1プライマーに対して相補的である。第2組のプライマーはDNA配列の他方の末端を提供するであろう。遺伝子のサイズに依存して、修飾された5'末端のDNAをコーディング配列の残部に結合するために、好都合な制限部位を選択することができる。種々の技術を利用することができ、そして特定の合成

に対する各遺伝子の有効性を増強するためのプロトコルの選択は当業者にとって明らかであろう。

【0032】

いったん遺伝子が産生されると、それを多数の商業的に入手可能なベクターの上の中に導入し、クローニングし、および/またはセンス鎖の5'に転写調節領域を有する発現ベクターを使用して発現を達成することができる。哺乳動物細胞を使用することによって、前述したように異なる構築物から配座異性体を産生し、単離し、アッセイすることができる。このようにして、有意な量の異なる配座異性体を単離することができる。

【0033】

初期段階において、異なる分離技術、例えば、HPLC、毛管電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、およびその他により、配座異性体を濃縮することができる。初期分離は特定の画分における配座異性体の濃度を増大する働きのみをするか、あるいは配座異性体を分離することができる。前者の場合において、前述の技術を使用して、配座異性体をさらに分離することができる。異なる配座異性体を分離および単離する異なる溶離液とともに、種々の分離媒質、例えば、イオン交換、篩媒質、およびその他を使用することができる。種々の手順が開発されてきており、そして変性を最小にして分離を最適化するプロトコルを各組の配座異性体について使用する。タンパク質精製分野における当業者はこれらのプロトコルを容易に決定することができる。次いで、精製された配座異性体をアッセイ、例えば、X線結晶学において使用して、構造、異なるエピトープに関連するアミノ酸、野生型タンパク質が関連するタンパク質との相互作用、ならびに配座異性体が結合する他のタンパク質、およびその他を同定することができる。

【0034】

キメラタンパク質の遺伝子がいったん得られると、遺伝子は遺伝子治療、実験動物の突然変異化、フォールディングに対する突然変異の効果を決定するランダム突然変異化、発現構築物およびタンパク質の大規模生産のための単細胞または生物、およびその他において使用することができる。実験動物は、齧歯類、ウサギ、鳥類、イヌ、ネコ、ブタ、およびその他を包含する。

【0035】

ある場合において、ウイルス構築物をつくることができ、ここでキメラ遺伝子をウイルスキャリアーの中に導入して細胞の中にランダムに導入するか、あるいはウイルスが屈性を有する場合、ウイルスが向性である細胞の中に導入することができる。他の配座異性体が存在してさえ、遺伝子が有益な効果を有する場合、構築物の存在は天然配座異性体から生ずる症状を軽減する働きをすることができる。選択的に、非自然配座異性体の導入は、細胞、組織、器官および宿主の生理学に対する非自然配座異性体の効果の評価を可能とする。

【0036】

野生型構造と、異なる配座異性体を生ずることが知られている異なるシグナル配列とを含んでなるキメラ構築物を導入すること、特に野生型遺伝子をそのキメラ構築物で置換することは特に重要である。生殖細胞を使用するか、または引き続いて生殖細胞に転移される核を使用する相同的組換えにより、1またはそれ以上の所望の配座異性体を発現させることができる。ヘテロ接合性が関係する場合、キメラ遺伝子を有する子孫を交配させてホモ接合性子孫を得ることができる。このようにして、1またはそれ以上の配座異性体の役割、タンパク質が輸送される1またはそれ以上の位置が変化するかどうか、このような位置変動の効果、タンパク質機能に対する異なるエピトープまたはトポグラフィーの効果、およびその他を研究することができる。さらに、キメラ哺乳動物を使用して配座異性体に対する生物学的作用について化合物をスクリーニングし、こうして直接的に、または配座異性体が経路の中に存在する結果として、特定の適用に向けられる配座異性体を包含する薬剤を評価することができる。動物モデルを使用して、野生型配座異性体および形成することがある他の配座異性体に対する効果を識別することができる。

【0037】

非自然配座異性体が優性の陰性アレルである状況において、活性の喪失を宿主の生理学に対する効果に関してモニターすることができる。宿主に対する効果を、類似する適用が観測される、疾患状態に対して比較することができる。次いで、適用に関連する既知の機能を有する薬剤、野生型アレルに結合することが知ら

れている化合物または他の治療を使用することによって、治療を評価して、治療の有効性を評価することができる。非自然配座異性体を有する細胞を、他のタンパク質の発現に対する非自然配座異性体の効果についてスクリーニングすることができる。このような細胞のmRNAをcDNAに変換することによって、非天然遺伝子をもたない細胞と非天然遺伝子をもつ細胞と間において、この分野において知られている種々の減法技術により、他のタンパク質に対する非天然遺伝子の作用を決定することができる。選択的に、種々のタンパク質を発現させ、電気泳動、質量分析またはHPLCのパターンを比較して、異なる配座異性体が宿主の発現パターンに影響を与えるかどうかを決定することができる。

【0038】

上の説明および実験の節に記載する手順、または他の機能的に同等の手順に従い、本発明は、プリオンタンパク質に関連する疾患および同様な疾患、特にアルツハイマー病のようなトポロジック的修飾に関連する疾患の研究を可能とする。示すように、天然PrP、Ntm - PrPおよびCtm - Prpを発現する発現構築物を調製することによって、異なる形態のタンパク質を産生するように細胞および動物を修飾することができる。このようにして、種々の候補物質の添加の効果を培養およびin vivoにおいて研究し、培養およびin vivoにおける候補物質の存在下の異なる配座異性体の形成の変化を決定することができる。同一および異なる細胞における発現および宿主の生理学に対する異なる配座異性体の効果の発現分析により、本発明のタンパク質は、異なる配座異性体のコントロールした存在および疾患の病因学の研究、疾患の病因学に関係する他の実在物を可能とする。天然PrP遺伝子の存在または非存在下に構築を使用してマウスのモデルを開発することができる。なぜなら、宿主遺伝子をノックアウトし、キメラ遺伝子で置換することができるからである。選択的に、突然変異をPrP遺伝子の中に導入し、これによりフォールディングの修飾、およびトランスロケーションに関連するタンパク質に依存するか、またはそれと相互作用する修飾を発生させることができる。こうして、遺伝子に対して天然またはキメラである、シグナル配列を突然変異させ、トランスロケーションに関連するタンパク質に対する効果を決定することができる。

。

本発明の使用

本発明は、分子、細胞および生物レベルにおける（すなわち、疾患の解明、診断または治療における）使用を見出す。特定の用途次の通りである。

【0039】

1. 記載する本発明を使用すると、抗体の機能および使用を増強するように抗体を操作することができるであろう。無細胞翻訳系においてシグナル配列を単独で、または分画・再構成されたまたは変異型膜および細胞質ゾルと組み合わせて置換することによって、微妙なまたは深遠な方法で、最終生成物それ自体のアミノ酸配列を実際に変化させないで、免疫グロブリンのフォールディング経路を変更することができる。こうして、結合性構築物が増分的に増加または減少された、変異型免疫グロブリン、およびエフェクター機能（例えば、Fc領域の結合特異性）が変化した免疫グロブリンを達成することができる。これらの目的を達成する現在のアプローチ（例えば、真性免疫グロブリン鎖の部位特異的またはランダム突然変異誘発により）は、フォールディング経路ばかりでなく、かつまた分子それ自体の一次構造を変化させるという欠点を有する。我々のアプローチは、実際に、この2つの型の変化を解離し、他の欠点なしに、診断および/または療法的実用性を提供する。また、シグナル配列の変動をトランスフェクトした哺乳動物細胞に適用し、培地を収集し、コンフォメーションおよび機能の差についてスクリーニングすることができる。

【0040】

2. その上、サイトカイン、および増殖因子は広い範囲の機能的挙動、ある場合において、複数のシグナリング経路の活性化に関係づけられた。例えば、シグナルが満足するホルモンとして最初に発見されたレプチンは、骨密度の独立的中枢レギュレーターとして働き、そして創傷治癒および血圧の調節に関係づけられることが発見された。これらの機能のいくつかは他の非存在下に起こることが明らかであり、そして大部分の肥満の個体はレプチン耐性であり、骨密度の障害をもたらす、それらがつくるレプチンは満腹促進機能を働かせることができないが、骨密度を維持する機能をするということが示唆される。この種類の不均質作用がレセプターまたはレセプター機能的の多様性により達成されることが

、従来の仮説であった。しかしながら、リガンドのコンフォメーションの多様性は、ここで示すPrPおよびプロラクチンからの例において証明されるように、レプチンの場合において、結果の不均質性的一部分またはすべてを説明することができるであろう。

【0041】

個々の配座異性体の同定、および個々の配座異性体の発現を増減するか、または1つまたは他の配座異性体の作用をブロックする薬剤の開発を可能とすることによって、ホルモンの機能のあるものを他のものよりも促進する方法で遺伝子発現を実施することができる。また、特定の遺伝子型および表現型を発現する配座異性体の混合物をベースとするサブセットに患者を分割することができる。これにより、引き続き、特定の時点において発現されている配座異性体混合物を考慮して、特定の配座異性体または他の配座異性体ならびにサブセットに対して最も有効であるように設計され、または有効であることが示された異なる薬剤を使用して、異なる治療を異なる個体に投与することができる。

【0042】

こうして、シグナル配列の交換、および分画細胞質ゾルおよび分画・再構成されたまたは変異型膜を含有する翻訳系の種々の組み合わせにおける合成、および引き続きスクリーニングプログラムは、満腹感または創傷治癒に影響を与えないで骨密度を促進または阻害する形態のレプチンの発生を可能とする。同様に、食欲の抑制においていっそう活性であり、これによりレプチン耐性を克服する形態のレプチン、肥満のヒトにおいて最も普通に観測される表現型を発生させることができる。逆に、レプチン配座異性体の個々のサブセットに対する作用について、または分泌されるレプチン配座異性体の混合物の変更における作用についてスクリーニングすることによって、小さい分子の薬剤を開発することができる。こうして、配座異性体特異的または選択的作用を有し、これにより配座異性体の作用をブロックまたは増強し、または配座異性体の特定の混合物をつくる能力をブロックまたは増強する薬剤を開発することができる。いかなる方法においても成熟、真性タンパク質の配列を変更しないで、シグナル配列の操作により変更することができる特定のレセプターに対するアフィニティーに加えて、他の分子に関連

する半減期、分泌反応速度はパラメーターである。このアプローチは、また、レセプターのアフィニティーよりむしろ、基質の代謝回転が関係する機能的一次である、分泌および内在性膜酵素に適用されるであろう。

【0043】

3. このアプローチをトランスジェニック技術と組合わせて、シグナル配列が異なる変異型遺伝子を野生型およびノックアウトマウス（内因性遺伝子を欠如する）の中に導入することができる。この方法において、現在未知である複雑な分泌および内在性膜タンパク質の機能についてスクリーニングすることができる。こうして、野生型嚢胞性繊維症膜貫通レギュレーター（CFTR）の50%は合成されると直ちに分解されることが知られている。これは生合成における「エラー」を表すということが従来の仮説である。本発明が実用性を有する別の解釈は、これらの95%が1つの特定の時間に細胞が必要としないが、発生における特定の時間において分解からレスキューされることができ多数の選択的コンフォメーションの合計を表すということである。CFTRのシグナル配列は切断されないので、突然変異を導入しないでフォールディングを変更するという目標をシスよりもトランスの調節によりもっぱら進行させなくてはならない。こうして、分画・再構成されたまたは変異型膜および分画・再構成された細胞質ゾルを使用して意図される翻訳系におけるCFTRの発現は、主張するように、他の配座異性体に対して1つの配座異性体を増強し、引き続いてこれらをモノクローナル抗体の反応性、化学的修飾、架橋および他の性質により記録し、分類し、次いでトランスジェニック動物の中に導入し、新規な表現型および障害についてスクリーニングする。ERおよび/または他の内部および/または原形質膜に関する単一および多スパンニングの両方を包含する、チャンネル形成およびレセプター形成膜タンパク質の各々について、同様にアプローチを使用することができる。

【0044】

4. ヒトにおける疾患を治療することが最も困難であるものは、典型的にはホルモン、増殖因子、サイトカインおよびレセプター耐性により発現されるシグナリングの障害（また、脱感作またはダウンレギュレーションとして知られている）である。大部分の疾患の大部分の症例が同定されたメカニズムのためまたは決

定すべき未知のメカニズムのためであるかどうかにかかわらず、多数の異なる耐性メカニズムが同定されてきている。我々の発表したまたは未発表の研究において要約されるようにPrPを使用する我々の研究に基づいて、コンフォメーションの調節困不良（配座異性体の不適切な混合物がつくられるか、またはERから出ることができる）は疾患の病原性の中核のメカニズムであると考えられる。これは分泌タンパク質に対してモノクローナル抗体を発生させ、そして疾患状態においてまたは疾患状態を有する患者のサブセットにおいて分泌タンパク質の個々のサブセットが不釣り合いの方法で存在する（かまたは存在しない）ことを証明することによって証明することができる。ヒトを苦しめる主要な疾患の主要な遺伝子は、病態生理学におけるコンフォメーション調節不良の掛かり合いについてスクリーニングすることができる、多数の分泌および膜タンパク質を包含する。糖尿病、高血圧症、肥満、骨粗鬆症、変性関節疾患、癌、アルツハイマー病、および精神疾患は、この方法に既に関係づけられた、わずかの例である。

疾患の研究および治療に対する本発明の適用

上に列挙したように、多数の重要医学的状态は、コンフォメーションの調節が生理学的および病態生理学的機能の重要な次元であると思われる遺伝子を包含する。ここで、特定の疾患をよりよく理解するために本発明を適用する方法を説明する。

【0045】

第1に、分泌および内在性膜タンパク質である、主要な疾患に関係する遺伝子を受細胞系およびトランスフェクトされた哺乳動物細胞において分析して、それらのシグナル配列が入るクラスを特性決定する。マウスおよびヒト（例えば、血液）からの試料を包含する、*in vitro*および*in vivo*において、コンフォメーションのスコアリング手段として、分類されモノクローナル抗体、化学的修飾および細胞の内部および培地中の他のタンパク質との共関連を使用して、天然タンパク質のコンフォメーションの不均質性を分類する。

【0046】

第2に、コンフォメーション混合物を合成し、小さい、一時的配座異性体を拡大し、安定化し、したがって容易に検出し、特性決定し、こうして配座異性体を

通常優性の配座異性体から区別できるようにする。これは2つの一般的方法で実施することができる。すなわち、切断されるシグナル配列を交換するか、またはトランス作用（または作用の非存在）を通して天然配座異性体混合物を修飾する分画・再構成された系中でタンパク質を発現させる。

【0047】

第3に、主要な疾患関係タンパク質を定める座異性体混合物がいったん特性決定されると、問題の疾患の自然の病歴および表現型のクラスの多様性を表す患者からの試料を、観測されるこれらのタンパク質の配座異性体の不均質性に関して、スクリーニングし、カテゴリー化する。この分析から、i) 疾患に関係する配座異性体、ii) 疾患の実際の発生に先行する座異性体混合物の変化、iii) 疾患の進行、合併症および自然の病歴の他の面、例えば、薬剤効能の危険の増加または減少、副作用および他の反応に関して個体を分割する座異性体混合物の変化を同定することができる。これらはこれらのプログラムにより見落とされる慣用のプロテオミックス (proteomics) プログラムのすべての目標であることに注意すべきである。なぜなら、タンパク質のコンフォメーションの不均質性について、本発明を支持するために提出された証拠について気づいていないからである。それゆえ、プログラムは問題のタンパク質の選択的配座異性体を見ていない。さらに、本発明の非存在において、特定の疾患の危険にあるか、あるいは苦しめられている個体において配座異性体の分布または意味を決定できると同時に、配座異性体のこれらの変化を系統的に同定し、拡大し、そして特性決定する手段は現在存在しない。

【0048】

第4に、上記1～3からの支配下にある配座異性体の疾患関連性に関して種々の価値のある情報が得られると、上に概説したアッセイを開発して、望ましくない配座異性体を最小しかつ保護的であるか、あるいは疾患の進行、薬剤毒性、およびその他に関連しない配座異性体を最大とする方法で、座異性体混合物を修飾する因子についてスクリーニングすることができる。同様に、化合物の大きいライブラリーの高い処理量のスクリーン、ならびに配座異性体特異的な合理的薬剤設計により、望ましくない配座異性体を選択的にブロックするか、あるいは所望の

配座異性体の作用を増強する因子を探求することができる。

【0049】

いくつかの主要な疾患に対する特定の適用を下に概説する。

【0050】

真性糖尿病： インスリンの主要な遺伝子、インスリンレセプターおよびグルコーストランスポーターのファミリーの多数のメンバーのすべては、それらをこの分析に適用可能とする切断または非切断のシグナル配列を有する。さらに、患者のケアに衝撃を与える主要な病態生理学的プロセスはインスリン耐性と命名する症候群である。通常、これはレセプター機能において障害に帰するが、多くの場合において、障害の基礎は未知であり、そして障害がレセプターよりむしろリガンドに由来する可能性を除外することができない。この場合において、リガンドはインスリンであり、インスリン仲介シグナリングを障害する異常なコンフォメーションはインスリンまたはインスリンレセプターまたはグルコーストランスポーターのファミリーの個々のメンバーの特性することがあり、これらは記載する方法で同定することができる。最後に、任意の所定の時間において、そして自然の経時的病歴において、慣用のゲノムおよびプロテオミク分析に対して向けられた多数の研究的努力にかかわらず確認しにくいままであった、個々の表現型の莫大な不均質性は、本発明に適用可能な、障害された配座異性を強く示唆する。

【0051】

高血圧症： 血圧の調節における多数の主要な遺伝子は、分泌および内在性膜タンパク質、例えば、なかでも、上皮ナトリウムチャンネル(EnaC)、アンギオテンシノゲン、アンギオテンシンレセプター、レニン、アルドステロンおよび他のステロイドの合成に関するステロイド生合成の酵素、およびアルファおよびベータアンドロゲンレセプターをコードする。高血圧症の病態生理学は大部分が不明のままであり、それゆえ配座異性体の調節不良がその病因学および病原性においてある役割を演ずる可能性はいかなる方法においても排除することができない。臨床的疫学的および観測的研究は、患者が高血圧症誘導状態(例えば、塩感受性/塩不感受性;病徴的活性、およびその他)の特質に関してばかりでなく、

かつまた薬剤の個々のクラスに対する感受性、それらの薬剤の副作用、および薬剤に耐える能力に関して不均質性であることを明瞭に示す。

【0052】

肥満症： 肥満症の調節に関係する主要な遺伝子、例えば、レプチンおよびそのレセプター、および今日までに同定された種々の肥満症に関係する遺伝子、例えば、メラノコルチンおよびマホガニーレセプター、アゴウチレセプター、およびその他のすべては、切断または非切断のシグナル配列を含有する。さらに、大部分の肥満の個体はレプチン耐性であり、レプチンの配座異性体の差がその多様な生理学的機能（例えば、満腹感、骨密度の維持、創傷治癒の促進、および血圧の調節）を仲介するという仮説と一致する。

【0053】

癌： 概念的に、癌は多数の多様なアポトーシス誘発および抗アポトーシス因子を包含する、細胞の成長および増殖およびこれらのプロセスの生理学的コントロールに関係するシグナリング経路の障害である。これらのうちの多数は、切断または非切断のシグナル配列を有する分泌または膜タンパク質である。多くの場合において、また、一般にシグナル配列を有する、多数の分泌された増殖因子およびサイトカインにより、癌は積極的および消極的に影響を受けることがある。多数のデータは、これらの因子の多数が多機能的であるか、あるいはより正確には、特定のシグナリング経路の促進および阻害の両方に関連するという見解を支持する。この分野における現在の難問は、1つの因子が1時点においてほぼ1つの作用を発生し、しかも他の時間に非常に異なる作用を発生できる方法を理解することである。レセプターの相互作用、シグナルトランスダクション、半減期、アソシエーション、およびその他を変更させる1つの配座異性体から他の配座異性体への切り換えは、癌の発生、免疫監視機構、提示および進行、またはその治療に対する応答において、癌発生および表現型の変動の1またはそれ以上の経路に対して重要である。

【0054】

骨粗鬆症： 骨密度の調節に関係するホルモン、例えば、前述のレプチン、および他のもの、例えば、副甲状腺ホルモン、オステオプロテゲニン（osteoprote

genin)、およびレセプターのすべては、シグナル配列、いくつかの切断されたシグナル配列、いくつかの非切断のシグナル配列を有し、本発明の分析により表面可能である。骨密度の生理学は複雑であり、十分に理解されておらず、種々の混同するパラドックスに付される - ある環境下に骨密度を促進する同一因子は他の環境下に骨を喪失させることがある。シグナリング変化に応答するコンフォメーションの不均質性は、これらの観測に対する潜在的基礎であり、診断および治療に対して広い可能性を有する。

【0055】

神経変性： プリオンおよびアルツハイマー病を包含して、脊髄損傷、およびストロークは、多分配座異性を含む診断および治療について最大の可能性を有する領域である。プリオンタンパク質は、プリオン疾患に関係する遺伝子産物であり、コンフォメーション調節が証明された最初のタンパク質であった。この場合において、コンフォメーション調節はトポロジー調節として発現する - 3つの検出可能な配座異性体はトランスメンブラントポロギーが異なり、比較的生ずるに同定し、区別することができる。アミロイド前駆体タンパク質は、その異常な代謝物質がアルツハイマー病に関係づけられた遺伝子産物であり、切断可能なシグナル配列を含む、プリオンタンパク質と共通の特徴を有する内在性膜タンパク質である。軸索誘導に関係する（したがって脊髄損傷からの回復に対して重要である）ネトリン、セミホリンおよび他の遺伝子は、多数の配座異性体の仮説と一致するパラドックス的活性を有する。

【0056】

冠状動脈の疾患： アポリタンパク質Bは低密度リポタンパク質代謝に関係する複雑な多機能分泌タンパク質であり、そしてコンフォメーションの不均質性の主要な候補である。体における本質的にすべての内在性膜チャンネルおよびレセプタータンパク質は、前述したように分画可能な非切断シグナル配列を有する。

【0057】

慢性閉塞性肺性疾患： 野生型嚢胞性繊維症膜貫通レギュレーター（CFTR）は前述の多スパンニング内在性膜タンパク質であり、その生合成は一般に受け入れられているいっそう複雑な運命を示唆する。CFTRの分解した鎖が、真のミスフォー

ルド鎖よりむしろ、細胞によりその点において不必要である選択的コンフォメーションを表すという仮説を受け入れることが困難である1つの理由は、配座異性の利益となるような我々の証拠の大部分が未発表のままであることである。それらの選択的機能は現時点において未知のままであるが、塩化物チャンネルとしてのCFTRの既知の機能は、病原性微生物に対する先天性免疫性に必要な、抗微生物ペプチド、例えば、デフェンシンに必要な塩環境に影響を与えることが推測された。こうして、塩化物チャンネルが喪失されたコンフォメーション調節不良は、広い範囲の肺および他の障害において観測されるように、肺および他の組織における感染に対する感受性を増加させることがある。本発明において記載するように、分画無細胞翻訳および転位系を入手可能なスコアリング系、例えば、モノクローナル抗体、化学的修飾フィンガープリント、架橋および関連分析、例えば、スクロース勾配の研究と組み合わせて使用することによって、CFTR、MDR遺伝子、および他の関係するトランスポーターの選択的コンフォメーションを分類し、そして感染および他の障害を有する患者の特定のサブセットにおいて、これらの選択的コンフォメーションが大きいまたは小さい程度に利用されるかどうかを決定することができる。

【0058】

精神障害： 神経変性のように、脳の機能的障害はシグナリングおよび/またはシグナルトランスダクションにおける混乱を含むようである。細胞表面上のレセプター、例えば、Gタンパク質カップルドレセプターのファミリーは一般に細胞対細胞のシグナリングに関係し、そして一般に切断されたまたは他のシグナル配列を有するので、これらのクラスのタンパク質はコンフォメーション調節のための候補である可能性は高い。

【0059】

総合すると、前述の例は本発明の広い特質およびシグナル配列を含有するタンパク質またはレセプターが関係する広い範囲の障害に対する適用可能性を証明する。

【0060】

この出願を伴う関係する原稿は前の出願60/171,012および60/172,350の一部

分として提出され、そしてそれらに特別に記載されているように、引用することによって本明細書の一部とされる。これらの原稿はそれらの題名および最初の著者により識別される：Rutkowski他、A New Role for the Signal Sequence in Translocational Regulation；Hegde他、Transmissible and Genetic Prion Diseases Share a Common Pathway of Neurodegeneration（発表：Nature（1999）402：822 - 826）；およびLingappa他、Conformational Control Through Translocational Regulation：A New View of Secretory and Membrane Protein Folding。

【0061】

下記の実施例は本発明の例示であるが、本発明を限定するものと解釈すべきではない。

【0062】

実施例

材料

ウサギ網状赤血球ライゼイト（RRL）およびイヌ腓臓粗面ミクロソームを記載されているように（HedgeおよびLingappa、Cell（1996）85：217 - 228、およびその中の参考文献）調製し、使用した。イヌミクロソームと同一の方法で、マウス脳ミクロソームを調製した。また、PKを記載されているように（Hedge他、Cell（1998）92：621 - 631）調製した。抗プロラクチン抗体をUBS（オハイオ州クレブランド）から購入し、そして3F4モノクローナル抗PrP抗体をプルシナー（Prusiner）研究所から提供された。抗PDIをストレスゲン（StressGen）（Victoria、BC）から購入した。ジスクイニミジルスベレート（DSS）をピアース（Pierce、イリノイ州ロックフォード）から購入した。サポニンをカルビオケム（Calbiochem、カリフォルニア州ラジョラ）から購入し、水中の20%w/v源溶液として溶解し、10mMのHepes、pH7.2に調節し、1.5mlのカラム（10mlのサポニン当たり）のSP-セファローズファーストフロー（Amersham Pharmacia；ニュージャージー州ピスカタウェイ）および2mlのカラムのQ-セファローズファーストフロー上に通過させることによって汚染物質を除去した。酵母プレプロ-アルファ因子をコードするクローンはトム・ラポポート（Tom Rapoport）から提供された。

【0063】

網状赤血球ライゼイトの分画

本明細書に記載する方法は、現在入手可能なウサギ網状赤血球ライゼイト (RRL) 翻訳系に由来する修飾された *in vitro* 翻訳系を調製する方法である。RRL 翻訳系は、本来 Jackson および Hunt (Methods Enzymol. (1983) 96: 50 - 74) により開発され、メッセンジャーRNA (合成または天然) の翻訳のための哺乳動物をベースとする抽出競合を提供する。さらに、ミクロソーム膜を補充するとき、分泌および膜タンパク質の生合成を再構成することができる。RRL を定められた成分に分画することによって、*in vitro* 翻訳系の柔軟性および潜在的な使用を拡張した。これらの進歩は、生物学的現象を扱うためのいくつかの利点を有する (下文参照)。簡単に述べると、RRL を天然リボソーム、および可溶性タンパク質画分 (S-100) に分離する。S-100 を DEAE セファローズ上のアニオン交換クロマトグラフィーによりさらに分画する。貫流成分 (グロビンのすべてを含有する) を廃棄し、300mM の KCl で細胞を段階的に溶離する。溶出液 (関係する翻訳因子を含有する) を硫酸アンモニウム沈殿および引き続く透析により濃縮する。この DEAE 画分を、リボソームと一緒に、出発 RRL と本質的に等しい効率で翻訳を再構成することができる。1ml の RRL から画分を調製するプロトコルを下に詳述する。それは必要に応じて容易に大規模化することができる。カラム緩衝液は 20mM の Tris - 酢酸塩、pH 7.5、20mM の KCl、0.1mM の EDTA、1mM の DTT (新しく添加する)、10% v/v のグリセロールである。溶離緩衝液はカラム緩衝液と同一であるが、300mM の KCl である。透析緩衝液は 20mM の HEPES - KOH、pH 7.5、100mM の KOAc、0.5mM の MgOAc、0.1mM の EDTA、1mM の DTT (新しく添加する)、10% v/v のグリセロールである。分画プロトコル: i) RRL を以前に発表されたプロトコル (Jackson および Hunt、前掲) に従うが、ただしそれを脱塩しない。簡単に述べると、貧血ウサギからの血球を数回洗浄し、細胞質ゾルを低張溶解により解放する。非溶解細胞およびゴースト (溶解し、細胞質ゾルを解放した細胞) を遠心により除去する。上清はこの分画において使用した RRL である。ii) RRL を 1mM の CaCl_2 に調節し、150U/ml のマイクロコッカスヌクレアーゼで 25°C において 10 分間消化し、EGTA を 2mM に添加することによって、反応を停止させる。RRL を氷上で 0°C に冷却し、すべての引き

続く手順を4（冷い室）においてまたは氷上で実施した。iii)ヌクレアーゼ処理したRRLを厚い壁のポリカーボネート管（1mlの容量）中で4、100,000RPMにおいてTL-100.2回転器により20分間遠心する。上清（S-100）を氷上で前もって冷却した2mlのエッペンドルフ管に取出す。ペレットを透析緩衝液中で1回リンスし、100 μ lの透析緩衝液の中に再懸濁させる。次いでリボソームをアリコートで凍結させ、-80において貯蔵する。リボソームは活性を喪失しないで少なくとも1年間安定である。過剰の凍結/融解を回避するが、問題なく少なくとも2~3回の使用に対して安定であるように見える。iv) S-100を等しい体積（1ml）のカラム緩衝液で希釈し、3mlのDEAEセファローズカラムに適用する。最後の微量の鮮やかな赤色のグロビンが貫流するまで、カラムを追加のカラム緩衝液で洗浄する。次いでカラムを10mlの溶離緩衝液で段階的に溶離し、溶出液を収集する。10mlの溶出液に、5.6gの固体硫酸アンモニウムを絶えず攪拌しながらゆっくり添加する（約80%の飽和にする）。硫酸アンモニウムの添加後、4において（または氷上で）さらに20~30分間攪拌する。遠心（10,000 \times g、15分間）により沈殿を沈降させ、除去し、上清を廃棄し、ペレットを最大1mlの、好ましくは0.5mlの透析緩衝液中に溶解する。500mlの透析緩衝液に対して4において8~12時間透析して残留硫酸アンモニウムを除去する（必要に応じて緩衝液を1回交換する）。試料を透析管から回収し、アリコートを凍結し、-80において貯蔵する。それは活性を喪失しないで少なくとも1年間安定である。過剰の凍結/融解を回避するが、問題なく少なくとも2~3回の使用に対して安定であるように見える。

【0064】

実施例1

プリオンタンパク質

複雑な、高度に調節されたトランスロケーションを有する基質の劇的な例は、プリオンタンパク質（PrP）、すなわち、いくつかの神経変性疾患の病原性に関係する35kDの脳糖タンパク質である（Prusiner（1997）Science 278：241-251）。PrPを3つの選択的トポロジ-的形態でERにおいて同時に合成する（Hegde他、（1998）Science 279：827-834）。これらの形態の1つ、^{33°}PrPと命名する、はER膜を横切って完全に転位し、in vivoにおいて観測される優勢を占める

形態である。対照的に、反対の向きでNまたはC末端をもつ単一にスパニングする膜タンパク質として2つの他の形態のPrPをER内腔中につくる（それぞれ、^{C^{un}}PrPおよび^{C^{un}}PrPと命名する）。PrP生合成は少なくとも3つの明確な、アッセイ可能な終点に導く複数の工程を含むように思われるので、それをN末端のシグナル配列の潜在的基質特異的作用のための感受性プローブとして使用した。下記の実験において、PrPの天然シグナル配列を分泌タンパク質プレプロラクチンおよびブレ-ラクタマーゼの十分に研究されたシグナル配列と置換した（第1図A）。c m f タンパク質（それぞれ、PrI - PrPおよび L - PrP）を天然PrPと、PrPの特徴を示すトポロジ-的形態の各々でターゲッティングされ、転位し、そして合成される能力について比較した（第1図B）。

プラスミドの構築

すべてのプラスミド構築物の構築において、標準技術を使用した（Sambrook他、1989）。HindIII部位に挿入されたアフリカツメガエルグロビンの5'UTRを含有するpSP64（Promega、ウイスコンシン州マディソン）中で、すべての構築物を調製した。プレプロラクチンのアミノ酸1~30およびPrPのアミノ酸23~28をコードする領域をPCR増幅することによって、PrI - PrPを構築した。生ずるクローンがPrPの成熟領域に対するプレプロラクチンのシグナル配列の正確な融合物を含有するように、PCR生成物をBglII - PflmI消化した野生型PrPを含有するベクター（PrP SV12）の中に結合した。すべての他のPrP、AV3、およびG123Pシグナル配列の置換体を同様に構築したが、ただしPrI - PrP_(AV3)を除外して、融合物の部位をLシグナル切断部位から3アミノ酸下流で操作した。このクローンは完全な融合物として構築したPrI - PrP_(AV3)と最終トポロジ-が同一であった。μLシグナル配列は位置2にSerよりむしろAspを含有することが見出された。この置換はL - PrPトポロジ-に対して有意な作用をもたなかった。まずPrP SV12のコドン8にサイレントNdeI部位を導入し、次いでこれらの突然変異をコードするアニーリングしたオリゴをBglII - NdeIフラグメントとして結合することによって、PrP_(R2, 3) ; PrP_(R4, 5) ; PrP_(D2, 3) ; およびPrP_(D4, 5) を構築した。これらのシグナル配列をプロラクチン成熟領域に融合するために、プロラクチン成熟領域（アミノ酸34で開始する）をPCR増幅し、NcoIで消化した。NcoIにおいて消化し、プロラ

クチンの最初の33アミノ酸を効果的に欠失させた野生型プレプロラクチンベクター (pSP BPI) の中に、このフラグメントを結合した。Thr - Argをコードする、XbaI部位をアミノ酸34の直ぐ上流において操作し、PrP、プレプロラクチン、ブレ - - ラクタマーゼ、およびプレプロ - アルファ因子のシグナル配列を増幅し、HindIII - SpeIフラグメントとして挿入した。Pri - Lを同一スキームに従い構築した。すべてのクローンをジデオキシ配列決定により確認した。

無細胞翻訳およびタンパク質分解

SP6 RNAポリメラーゼを使用するin vitro転写、RRLを使用する翻訳、およびイヌ粗面ミクロソームの中へのトランスロケーションは記載された (Hedge他、(1998) Cell 92 : 621 - 631およびその中の参考文献)。トランスロケーションを32 (または第4図Cにおいて26) において20~45分間実施した。記載されているように (HedgeおよびLingappa、(1996) Cell 85 : 217 - 228)、示した膜を沈降により単離し、生理学的塩緩衝液 (PBS) の中に再懸濁させた。0.5mg/mlのPKを使用して0 において45~90分間、タンパク質分解を実施した。12.5mMのPMSEで反応を停止させ、10体積の1%SDSの中に100 において移した。

ターゲティング研究

第2図Bにおいて、膜の非存在下の翻訳を32 において開始し、次いで転写物の非存在下に30秒間前インキュベートした。32 に移動後5分に、アウリントリカルボン酸 (ATA - Sigma) を75 μ Mに添加した。アリコートスタガード間隔で氷に取出した。最後の試料を収集したとき、1つのアリコートを除外したすべてに膜を添加した。次いで試料を32 に30分間戻し、次いでタンパク質分解し、3F4で免疫沈降させた。第2図Cにおいて、SfuIにおいてトランケートしたPrPをミクロソームの存在または非存在下に32 において翻訳した。5分間インキュベートした後、ATAを前述したように添加した。翻訳後30分に、試料を氷に取出し、膜を欠如する試料に膜を添加し、32 において30分間インキュベートした。翻訳が完了した後、10mMのEDTAで26 において10分間鎖を解放させた。次いでタンパク質分解および免疫沈降を実施した。

架橋

架橋すべき試料について、前述したように、翻訳産物を沈降させ、再懸濁させ

、等しいアリコートに分割した。1つのアリコートを取って置き、他のアリコートにDSSを1mMに添加し、試料を室温において30分間インキュベートした。50mMのTris (pH8.0)、10mMのEDTA、および10 µg/mlのRNアーゼ (Sigma、ミズリー州セントルイス) の添加により、反応を停止させた。内腔架橋物の単離を望む場合、0.5%のサポニンをその上添加し、次いでTLA100中で75,000rpm、4 において10分間沈降させた。架橋した物質を免疫沈降するために、前述したようにサポニンを添加し、冷却した架橋反応に抗体を直接添加した。

ミクロソーム膜の分画

簡単に述べると、粗面ミクロソーム膜 (RMs) を以前に記載されているように調製した (WalterおよびBlobel、Methods Enzymol. (1983) 96:84-93)。内腔および周辺膜タンパク質を抽出した後、内在性膜タンパク質のサブセットを洗浄剤で安定化し、ラクトンアフィニティーおよびイオン交換クロマトグラフィーの組み合わせにより分画した。脂質の存在下に洗浄剤を除去することによって、個々の画分を再構成し、形成するプロテオリポソームを収集し、基質特異的活性のアッセイに使用した。関係する原理を証明する、画分の最初の組を調製し、特性決定するプロトコルを下に詳述する。下の節 [d] に詳述するように、この最初の手順をいくつかの方法で変更することができる。

【0065】

分画プロトコル: i) 以前に発表されたプロトコルに従い、RMsを調製する (WalterおよびBlobel、(1983) 前掲)。簡単に述べると、最近死亡したイヌ (またはブタ) からの臍臓組織を均質化し、遠心して破片、核および大きい細胞下構造物を除去した後、残りの物質を高速遠心する。沈降した物質を再懸濁させ、-80 において凍結貯蔵した。特記しない限り、すべての引き続く手順は氷上でまたは冷い室中で4 において実施する。ii) 50mMのHepes、pH7.4、250mMのスクロースを含有する緩衝液で、RMs (50mMのトリエタノールアミン - 酢酸塩、pH7.4、250mMのスクロース、1mMのDTT中で) を0.5当量 / µlの最終濃度に希釈する。サポニンを20%の源溶液から0.5%の最終濃度に添加する。溶液をおだやかであるが、十分に混合した後、TLA100.3回転器 (Beckman instruments) 中で100,000rpmにおいて10分間遠心することによって、ミクロソームを単離する。500mMのK - 酢

酸塩、50mMのHepes、10mMのEDTA、125mMのスクロースを含有する緩衝液中で、ペレットを0.5当量/μlの濃度で再懸濁させる。ミクロソームを再び遠心（TLA100.3回転器中で100,000rpmにおいて20分間）により単離し、抽出緩衝液 [350mMのK - 酢酸塩、50mMのHepes、pH7.4、5mMのMgCl₂、15%w/vのグリセロール、5mMの2 - メルカプトエタノール、EDTA不含プロテアーゼインヒビター（Roche Molecular Biochemicals）および0.8%のデオキシ - BigCHAP（Calbiochem）] 中で1当量/μlにおいて再懸濁させる。氷上で10分間抽出した後、不溶性物質をTLA100.3回転器中で100,000rpmにおいて30分間沈降させる。上清をDBC抽出物と命名し、引き続く工程において使用する。iii) DBC抽出物を1/5~1/7体積の固定化ConA（Pharmacia）と一定にかつおだやかに混合しながら4 において10~15分間インキュベートする。上清（ConA消耗DBC抽出物）を別の管に取出し、氷上で貯蔵する（12時間まで）または延長時間貯蔵し、液体窒素中で凍結させ、-80 に保持する。ConAビーズを5~7体積の洗浄緩衝液 [500mMのK - 酢酸塩、50mMのHepes、pH7.4、5mMのMgCl₂、15%w/vのグリセロール、および0.8%のデオキシ - BigCHAP] 中で5回洗浄し、結合したタンパク質を5体積の抽出緩衝液 [500mMのK - 酢酸塩、50mMのHepes、pH7.4、20mMのEDTA、15%w/vのグリセロール、5mMの2 - メチル - アルファ - D - マンノピラノシド、2mMの2 - メルカプトエタノールおよび0.5%のデオキシ - BigCHAP] で25 において一定に混合しながら2時間インキュベートすることによって溶離する。溶離した物質（ConA抽出物）を引き続く操作のために氷上で冷却する。iv) ConAを1.5体積の希釈緩衝液 [50mMのHepes、pH7.4、15%w/vのグリセロール] で希釈し、イオン交換樹脂とのインキュベーションのために分割する。希釈したConA抽出物を1/20体積のQ - セファローズ - ファストフローまたはS - セファローズ - ファストフロー（両方はPharmaciaから）に添加し、一定に混合しながら1時間インキュベートする。Q - セファローズ - ファストフローおよびS - セファローズ - ファストフローのインキュベーションの非結合画分を1/20体積のS - セファローズ - ファストフローまたはQ - セファローズ - ファストフローに添加し、4 において一定に混合しながら1時間インキュベートする。このインキュベーションの非結合物質を取って置く（Q/S - 貫流およびS/Q - 貫流）。第2インキュベーション（S - セファローズおよびQ - セファロー

ズからの樹脂を10体積の [200mMのK - 酢酸塩、50mMのHepes、pH7.4、15%w/vのグリセロール、0.5%のデオキシ - BigCHAP] を含有する緩衝液中で洗浄し、引き続いて4体積の1000mMのK - 酢酸塩を含有する同一緩衝液中で溶離する。これらの画分を、それぞれ、Q - FTおよびS - FTと命名する。第1イオン交換インキュベーション (Q - セファローズおよびS - セファローズとの) からの樹脂を10体積の [200mMのK - 酢酸塩、50mMのHepes、pH7.4、15%w/vのグリセロール、0.5%のデオキシ - BigCHAP] を含有する緩衝液中で洗浄し、引き続いて4体積の500mMのK - 酢酸塩を含有する同一緩衝液中で溶離する。樹脂を第2回目に4体積の1000mMのK - 酢酸塩を含有する同一緩衝液中で溶離する。これらの画分を、それぞれ、Q - 500、S - 500、Q - 1000、およびS - 1000と命名する。v) 画分を次のようにして再構成する。第1に、8mgのホスファチジルコリン (PC、10mg/mlの源溶液から)、2mgのホスファチジリエタノールアミン (PE、10mg/mlの源溶液から)、10mgのデオキシ - BigCHAP (DBC、100mg/mlの源溶液から) を混合することによって、脂質を調製し、DTTを1Mの源溶液から10mMに添加する。試料を真空下に (ne heat) 乾燥し、500 μ lの緩衝液 [50mMのHepes、pH7.4、15%のグリセロール] の中に再懸濁させる。DBCを100mg/mlの源溶液から添加して、最終濃度をほぼ20mg/ml (約2%w/v) にする。脂質混合物を液体窒素中で凍結させ、必要となるまで - 80 において貯蔵する。再構成のために、100 μ lのDBC抽出物またはConA消耗消耗を100 μ lのConA溶離緩衝液、ConA溶出液、S - FT、Q - FT、S - 500、Q - 500、S - 1000、またはQ - 1000画分を前述したように調製する。さらに、5 μ lの脂質混合物を添加し、試料を十分に混合した後、個々の試料を160mgのバイオビーズ (BioBeads) SM2 (Biorad) に添加する。混合物を4 において一定に混合しながら12~18時間インキュベートする。vi) プロテオリポソームを回収するために、工程 (v) からの脂質相をバイオビーズから分離し、新鮮な管に移す。これらの試料を5体積の氷冷蒸留水で希釈し、混合し、氷上の1.3mlの遠心管に移す。試料をTLA100.3回転器 (1.3mlの管のためのアダプターを有する) 中で70,000rpmにおいて20分間遠心する。上清を廃棄し、30 μ lの100mMのK - 酢酸塩、50mMのHepes、pH7.4、250mMのスクロースを含有する緩衝液の中にペレットのプロテオリポソームを再懸濁させる。これらを液体窒素中の凍結させ、トランスロケーションアッ

セイにおいて使用するために - 80 において貯蔵する。vii) 前述したように (参照) 1 μ l の工程 (vi) からのプロテオリポソーム / 10 μ l の翻訳反応を使用し、トランスロケーションアッセイを実行する。

PDlpの精製

20,000当量 (定義については、WalterおよびBlobel、1983参照) のイヌ臍臓粗面ミクロソーム膜を、50mMのトリエタノールアミン、250mMのスクロース、0.2mMのPMSF、5 μ g/mlのアプロチニン、10 μ g/mlのキモスタチン、1 μ g/mlのE64、5 μ g/mlのアンチペイン、1mMのDTT中で80mlに調節した。一定に混合しながら、精製されたサポニンをゆっくり1%w/vの最終濃度に添加し、4 において15分間インキュベートした後、70.1Ti回転器 (Beckman) 中で70,000rpmにおいて2時間遠心することによって、膜を沈降させた。上清をプールし、5mlのConAセファローズカラムに6.2ml/時の流速で適用した。25mlの100mMのKAcを含有する上記緩衝液で15ml/時で洗浄し、追加の25mlのKAcを含有しない緩衝液で洗浄した。カラムを室温において20mlの1Mの - メチル - マンノピラノシドを含有する上記緩衝液で3ml/時で溶離した。溶出液を氷上に収集し、4 において1mlのQ - セファローズ - ファストフロー細胞に適用した。カラムを4mlの50mMのHepes、pH7.4、2mMのMgAc、1mMのCaCl₂、1mMのDTTで洗浄し、2mlの1MのKAcを含有するこの同一緩衝液で溶離した。溶出液をさらにセファデックス (Sephadex) PG 16 / 16カラム (Pharmacia) 上で分画し、80 \times 1.5mlの画分を収集した。15 μ lの画分31 ~ 56の各々をSDS - PAGEおよびクーマッシー染色により分析する (第4図b)。gp65を含有するピーク画分をプールし、アリコートを引き続く配列分析のために使用する (ProSeq、マサチューセッツ州サレム、による)。

TRAM再構成膜の調製

記載されているように (Hegde他、1998c)、糖タンパク質消耗膜を調製した。記載されているように (GorlichおよびRapoport、1993) 調製した、精製されたTRAMを出発膜の中に存在するレベルの4 \times (イムノプロットングにより判定して) で糖タンパク質消耗抽出物に添加した。

その他

15%のゲルまたは12.5%または15%のTris / Tricineゲルを使用して、SDS - PA

GEを実行した。バンドをオートラジオグラフィーにより直接的に、またはTransScreen増強スクリーン（Kodak、ニューヨーク州ロチェスター）の助けにより可視化した。AGFA ArcusIIフラットベッドスキャナー上の走査およびアドベ・フォトショップ（Adobe Photoshop）ソフトウェアを使用するデンシトメトリーにより、定量を実行した。記載されているように（ChuckおよびLingappa、1992）、免疫沈降を実施した。

【0066】

すべての3つのタンパク質は効率よくターゲティングされ、ERを横切って転位されたが、それらはトポロジーの結果が劇的に異なっていた。以前の発見と一致して、PrPは^{sec}PrPおよび^{un}Prpのトポロジー的形態で主として合成され、tmPrPは少量であるが有意な量（約7%；第1図C）で合成された。対照的に、PrI - PrPは主として^{sec}PrPの形態で合成され、次いで^{un}Prpはより少ない量で合成され、tmPrPは本質的に検出不可能であった（<2%）。逆に、L - PrPのトポロジーは大きく^{sec}PrPを犠牲にして^{un}Prp（約34%）に劇的にシフトした。これらの結果が示唆するように、異なるシグナル配列は情報をコードし、これは引き続きトポロジー的事象に劇的に影響を与える。この情報はすべての3つのシグナル配列に対して追加的でありかつそれらのシグナル配列に共通な基本的ターゲティング特徴に依存するようと思われる。こうして、成熟PrPに融合した細胞質ゾルタンパク質グロビンのN末端の20アミノ酸から成るキメラタンパク質は、トポロジー的形態のいずれにおいても転位することができない（データは示されていない）。総合すると、第1図における実験はPrPのシグナル配列がトポロジー調節においてある役割を演ずることを証明する。

【0067】

原理的には、前述のトポロジーに対するシグナル配列の影響は、ターゲティングにおけるシグナル配列の十分に確立された役割に帰することができる。異なるシグナル配列が異なる速度でERにターゲティングされた場合、リボソーム - 新生鎖複合体がトランスロコンと相互作用する時間までに、成熟基質のN末端は変化する長さで合成されるであろう。ターゲティング工程間の増加する量の合成の1つの結果は、PrPのトポロジー的形態の1つの合成に好適であることがある

(多分^{CtmPrP}、そのN末端ドメインは転位されない)。この仮説は、PrPターゲッティングの反応速度論の操作がシグナル配列の置換により見られるトポロジーのシフトを繰り返すことを意味する。この可能性を3つの方法で試験した。

【0068】

第1に、翻訳反応において存在するER由来イヌ睪臓ミクロソームの量を滴定し、PrPトポロジーに対する効果を検査した。トランスロケーション機構の全濃度が減少するとき、合成の開始と、トランスロコンとの相互作用との間の時間は増加し、ターゲッティング前に合成される新生鎖の量を増加させる。10倍の範囲にわたってミクロソームの濃度が変化するとき、PrPの異なるトポロジー的形態の相対比は衝撃を受けないことを我々は発見した(第2図A)。ミクロソーム濃度の減に伴うトランスロケーション効率の減少は、シグナル切断効率の減少により反映され、「転位能力」の喪失のためであるように思われる。この「転位能力」は、リボソーム-新生鎖複合体がトランスロケーション機構と産生的に相互作用することができることにおける、新生鎖成長における比較的短い期間である(Perara他、Science(1986)232:348-352)。トランスロケーション効率の同様な喪失は他の基質で観測された(データは示されていない)。

【0069】

第2アプローチにおいて、5分後開始を阻害することによって翻訳反応を同期化し、そして後の時間ミクロソームを連続的に添加した。ミクロソーム添加前に翻訳を起こさせる期間に無関係に、合成される^{CtmPrP}の百分率は一定に止まることを我々は発見した(第2図B)。再び、転位能力を喪失したと推定される新生鎖の百分率が増加したために、シグナル切断の効率は後の時点において減少した。

【0070】

最後に、ターゲッティング工程それ自体を同期化した。これらの実験において、PrP mRNAを規定した長さでトランケートし、ミクロソーム膜の非存在下に翻訳した。生ずるリボソーム関連新生鎖はそれ以上の翻訳の非存在下にトランスロケーションに対してコンピテントに止まり、そして引き続くミクロソームの添加により同期的にターゲッティングすることができる(Perara他、1986、前掲)。ターゲッティング後、リボソームを解体し、PrPのC末端の小さい部分のみを欠如

するトランケートドPrP鎖により達成されたトポロジを、共翻訳的にターゲットティングされた同一トランケートド産物と比較した。PrPのこの223マーのターゲットティングの同期化は観測されるトポロジ的形態の相対比に影響を与えないことを我々は発見した(第2図C)。その上180マーについて、同様な結果が得られた(データは示されていない)。総合すると、これらの実験が集合的に示すように、PrPのターゲットティング工程の反応速度論の操作は達成される最終トポロジを変更するために不十分である。これらの発見から、シグナル配列内にコード化されたトポロジ特異的情報はターゲットティングを越えた段階において作用することを我々は推定する。

【0071】

ターゲットティングの反応速度論の差はPrPトポロジに対するシグナル配列の影響を説明することができないので、シグナル配列の作用の他の部位、ER膜に我々は転向した。ER膜におけるシグナル配列の認識事象はトランスロケーション間に初期に起こるように思われ、堅固なリボソーム-膜連結の確立に先行する。プレプロラクチンおよびプレ- -ラクタマーゼのシグナル配列がトランスロケーション機構によるそれらの認識メカニズムの先天的差をコードする場合、これらの差は連結の状態において発現されるであろう。

【0072】

プレプロラクチンおよびプレ- -ラクタマーゼの短いトランスロケーション中間体を、プロテイナーゼK(PK)、すなわち、リボソーム-膜連結の状態のプローブに対する感受性について分析した。以前の報告(Connolly他、J. Cell. Biol. (1989) 108: 299 - 307; JungnickelおよびRapoport、Cell (1995) 82: 261 - 270)と一致して、連結の堅固なシールはプレプロラクチン86マーをタンパク質分解的攻撃から遮断した。対照的に、プレ- -ラクタマーゼ84マーは消化に対して非常に感受性であり、開いたリボソーム-膜連結を示した(第3図A)。この差がシグナル配列の機能に帰するかどうかを決定するために、プレプロラクチンおよびプレ- -ラクタマーゼのシグナル配列を交換した(構築物 L-PrP およびPrI - L)。L-PrIの81マーはプロテアーゼ消化に対してアクセス可能であるが、PrI - Lの93マーはそうでないことを我々は発見した(第3図A)。ほ

ば30アミノ酸より長いトランスロケーション中間体を使用して、同様な結果が得られた(データは示されていない)。これらのデータが示すように、シグナル配列は分泌タンパク質の初期の生合成間のリボソーム - 膜連結の状態に異なるように影響を及ぼすことができる。

【0073】

上記結果が与えられると、シグナル配列によるリボソーム - 膜連結のモジュレーションは、PrPトポロジーの調節についてもっともらしいメカニズムであるように思われた。そのような場合において、細胞質ゾルにおけるN末端を有するPrPのトポロジー的形態(^{Ctm}PrP)は、トランスロケーションにおける初期に堅固なリボソーム - 膜連結を確立しなかった鎖から発生することを期待することができる。この仮説を試験するために、PrP、PrI - PrP、および L - PrPの長さが増加するトランスロケーション中間体をERにおいて組立て、沈降により非ターゲット鎖から分離し、そしてリボソーム - 膜連結の状態をPK消化により分析した(第3図B)。

【0074】

61マーの野生型PrPに対応する点においてトランケートするとき、すべての3つの基質はプロテアーゼに対して完全にアクセス可能であり、こうして堅固な連結を確立することができなかった。しかしながら、トランスメンブランドメインの合成前においてさえ、3つの構築物はわずかに52アミノ酸長さのトランスロケーション中間体において異なるプロテアーゼアクセス可能性を示す。PrI - PrPは、非常にわずかの^{Ctm}PrPをつくり、この点において消化から非常に遮断されるが、L - PrP鎖のより大きい百分率はプロテアーゼに対してアクセス可能である。このトランケート点において、すべての3つの構築物は高濃度の塩を使用する膜からの抽出に対して抵抗性であり(0.5Mの酢酸カリウム; データは示されていない)、リボソームがトランスロケーションチャンネルに安定に関連することが示唆される。さらに、L - PrP新生鎖は生合成を通じてPrI - PrP鎖よりもいっそうPKに対してアクセス可能に止まる。保護されない鎖の大部分は、多分開いた連結の結果として、それらのシグナル配列を保持する。鎖長さが増加するすべての3つの基質におけるプロテアーゼ保護の観測される減少は、^{N^{un}}Prpの合成間に連

結が開いていることを反映することが推測される。総合すると、これらの結果が示すように、リボソーム - 膜連結のシグナル配列仲介調節は、引き続きトランスロケーション事象について劇的な結果を有することができる。

【0075】

最終のトポロジを支配するリボソーム - 膜連結の推定上の役割は、連結を調節するトランス作用性因子がPrP生成に影響を及ぼすことができることを示唆する。TRAM糖タンパク質はシグナル配列と相互作用して、リボソーム - 新生鎖複合体とトランスロコンとの間の開始アソシエーションを促進するとことが考えられる (Voigt他、J. Cell. Biol. (1996) 134 : 25 - 35)。いくつかの基質 (例えば、プレプロラクチン) のシグナル配列はトランスロケーションについてTRAMに依存しないが、大部分 (プレ - - ラクタマーゼを包含する) はTRAM依存性である (Gorlich他、Nature (1992) 357 : 47 - 52 ; GorlichおよびRapoport、Cell (1993) 75 : 615 - 630 ; Voigt他、1996、前掲)。TRAMは他の基質のトランスロケーション間のリボソーム - 膜連結の調節にさらに関係づけられた (Hegdeら、Cell (1998) 92 : 621 - 631) が、こうして機能の研究はPrPトポロジにおけるTRAMについての直接的または決定的役割を証明することができなかった (Hegdeら、Mol. Cell (1998) 2 : 85 - 91)。こうして、シグナル配列のTRAM依存的特徴をPrPトポロジにおけるその役割から解離することが可能であることを我々は理由づけた。

【0076】

トポロジを示差的に修飾するが、TRAMに対して依存的でないPrPシグナル配列内の突然変異を同定することを我々は探求した。シグナル - アンカータンパク質のトポロジに対する電荷の効果の類似性 (例えば、Siposおよびvon Heijne、Eur. J. Biochem. (1993) 213 : 1333 - 1340 ; Spiess、FEBS Lett. (1995) 369 : 76 - 79) により、PrPシグナル配列中の非保存的突然変異がPrP生成に影響を与えることを我々は理由づけた。シグナル配列の疎水性コアを無傷のままに残して効率よいターゲティングを可能として、コドン2および3またはコドン4および5をアルギニンまたはアスパラギン酸のコドンと置換した (それぞれ、PrP_(R2,3)、PrP_(D2,3)、PrP_(R4,5) およびPrP_(D4,5) ; 第4図A参照)。PrP_(R2,3)

、およびPrP_(R4,5)のトポロジーの分析は^{Ctm}PrP合成の減少を明らかにしたが、PrP_(D2,3)およびPrP_(D4,5)の両方は^{Ctm}PrP合成の増加を示した(第4図B)。

【0077】

これらの突然変異シグナル配列のTRAM依存性を評価するために、それらの各々をプレプロラクチンに天然プレプロラクチンシグナル配列の代わりに融合した。精製したTRAMを含有するか、あるいは欠如する糖タンパク質消耗プロテオリポソームの中に転位するこれらの構築物の能力を測定した。TRAMを転位させることを必要とする鎖の百分率として、TRAM依存性を定義した。すべての4つの突然変異したシグナル配列は、PrPトポロジーに対する分岐した効果を有するにかかわらず、野生型PrPシグナル配列よりもTRAM依存性が低いことを我々は発見した(第4図C)。こうして、PrPシグナル配列のTRAM依存性はトポロジーの調節におけるシグナル配列の役割から解離することができ、シグナル配列がトポロジーに影響を及ぼす従来未知のメカニズムを示す。

【0078】

膜スパニングドメインにおける突然変異はPrPのトポロジーに影響を及ぼすことができる(Hegde他、Science(1998)279:827-834)。トランスメンブラン(TM)ドメインは、シグナル配列と同様に、リボソーム-膜連結の変化を誘発することができる(Liao他、Cell(1997)90:31-41)ので、これらの2つのドメインがトポロジーを調節するメカニズムが関係づけられることはもっともらしい。ちょうどある種のシグナル配列がリボソーム-膜連結を開くように、PrPのTMドメインは連結の開口を誘発することができる。このシナリオにおいて、^{Ctm}PrPに好適なTMドメインの突然変異は野生型PrPよりも連結のより大きい開口を誘発するが、^{S^{sc}}PrPに好適な突然変異は閉じた連結を維持する作用をするであろう。我々はシグナル配列およびTMドメインの両方における変化の種々の組合わせを含有するPrP構築物を分析することによって、この仮説を試験した。

【0079】

TMドメインにおいて保存されたアラニンをバリンと置換すると、^{Ctm}PrPトポロジーで作られたPrPの比率を著しく増加させる(Hegde他、Science(1998)279:827-834)。これらの突然変異の1つ[分子のほぼ40%を^{C^{un}}PrP形態で発生させ

るPrP_(AV3)]を、プレプロラクチンまたはプレ - - ラクタマーゼのシグナル配列 [PrI - PrP_(AV3) および L - PrP_(AV3)] で操作した。AV3突然変異がシグナル配列に対して独立にリボソーム - 膜連結の開口を引き起こす場合、PrP_(AV3) 構築物はPrP_(AV3) とほぼ同程度に^{C^{un}}PrPを合成するであろう。驚くべきことには、PrI - PrP_(AV3) は^{Ctm}PrP合成をほとんど検出不可能なレベルに減少させることを我々は観測した(第5図A、中央のパネル)。逆に、L - PrP_(AV3) はほとんどもっぱら^{C^{un}}PrPをつくる(第5図A、右のパネル)。

【0080】

同様に、前述の仮説によれば、^{s^{ec}}PrP合成に好適なTM突然変異はリボソーム - 膜連結を閉じさせるであろう。^{s^{ec}}PrPのみをつくるTM突然変異PrP_(G123P)のシグナル配列をプレプロラクチンまたはプレ - - ラクタマーゼのシグナル配列 [PrI - PrP_(G123P) および L - PrP_(G123P)] で置換したとき、すべての3つの基質は^{s^{ec}}PrPとしてのみ合成されることを我々は発見した。しかしながら、リボソーム - 膜連結の閉鎖は全体のトランスロケーション効率を刺激するであろう。なぜなら、閉じた連結を使用して合成された鎖は、リボソームからの出口の唯一のオプションとして、ER内腔を有するからである。その代わりに、L - PrP_(G123P)の転位はPrP_(G123P) およびPrI - PrP_(G123P) に比較して比較的劣っていることを我々は発見した。この結果が示すように、G123P突然変異はそうでなければ^{Ctm}PrPとなる鎖のトランスロケーションを防止するよりむしろ、リボソーム - 膜連結を閉鎖することによって^{s^{ec}}PrPの産生を必要としない。

【0081】

上記発見が示唆するように、シグナル配列に対して独立に作用するよりむしろ、TMドメインはシグナル配列の先行する作用により拘束される。TMドメインがシグナル配列により支配されるリボソーム - 膜連結の状態を担持するかどうか直接的に試験するために、TMドメインの出現後のある点においてPrI - PrP_(AV3) および L - PrP_(AV3) についての連結の状態を分析した。TMドメインの同一性に無関係に、連結はL - PrP_(G123P) について開口し、そしてPrI - PrP_(AV3) について閉鎖して止まることを我々は発見した。これらの結果が示唆するように、リボソーム - 膜連結に対するシグナル配列の初期作用は、TMドメイン合成前においてさえ

、引き続きトポロジーの測定に対して決定的である。

【0082】

TMドメイン合成前にPrP鎖がトランスメンブラントポロジに付されるという観測は予期せざることであった。主要な調節工程を合成のこのような初期時点に配置することがなぜ重要であるか？ 1つの可能な理由は、TMドメインが合成されたとき、生合成における後の時点においてPrPのフォールディングにおけるある初期事象が容易には可逆的でないことである。こうして、これらの初期のフォールディング事象を一時的にかつ空間的に制限された方法で開始することが重要であることがある（N末端が2つの環境的に異なる区画の1つの中に究極的に存在できることが与えられると）。この可能性を検査するために、トポロジーが形式化されてしまう前の時間にトポロジー特異的方法で開始される、PrPとタンパク質フォールディングの機構との間の相互作用を同定することを我々は探求した。

【0083】

初期実験において、PrP_(G123P)またはPrP_(AV3)との優先的アソシエーションを表示するタンパク質を同定するために架橋を使用した。いくつかのタンパク質は両方の基質と比較できるほどに相互作用するが、65kDaのタンパク質（p65）はPrP_(AV3)よりもPrP_(G123P)により強く架橋する（第6図A）。次いで同一位置においてトランケートしたPrI - PrPおよび L - PrPを同様に分析し、p65はPrI - PrPに架橋することが見出され、⁵⁰PrPトポロジーで作られるプロセスにおける新生PrP鎖がこの因子と特異的にアソシエートすることを示唆する（第6図B）。PrP生合成間にこの相互作用が開始されるときを決定するために、PrI - PrPおよび L - PrPの初期トランスロケーション中間体をこの架橋の異なる存在について検査した。顕著には、p65およびわずかにより小さいタンパク質は、野生型PrPのコドン113においてトランケートされたPrI - PrPトランスロケーション中間体に優先的に架橋することを我々は発見した（第6図C）。こうして、生合成の非常に初期における新生PrP鎖とのp65のアソシエーションは、究極的に⁵⁰PrPトポロジーで作られたという基質の性向と相関する。

【0084】

p65架橋付加物の生化学的性質を利用して、このタンパク質を精製し、同定し

た。この付加物はサポニンにより抽出可能であり、p65の内腔局在化を意味した；それはスクロース勾配分析により4Sタンパク質として移動し、それがモノマーであることを示唆した；それはConA - セファローズコロニー上に保持され、p65がグリコシル化されていることを示した；そしてそれはまたQ - セファローズカラム上に保持され、そうでなければ純陽性PrP分子上のp65により付与される純陰性電荷を示唆した。これらの性質がイヌ粗面ミクロソームの段階的分画において組合わされたとき、単一の主要な65kDaのタンパク質が精製された（第6図D）。このタンパク質の臭化シアン切断により発生したペプチドフラグメントを配列決定すると、それはシャペロンのタンパク質ジサルファイドイソメラーゼ（PDI）の隣臓特異的メンバーであるPDIpとして同定された（Desilva他、Cell Biol. (1996) 15 : 9 - 16 ; Elliott他、Eur. J. Biochem. (1998) 252 : 372 - 377）。

PDIpとしてのp65の同一性は、PDIpに対して発生させた抗体を使用する免疫沈降により確認された（第6図E）。さらに、わずかにより小さい架橋相手は偏在的PDIに対する抗体により免疫沈降され、PrPとタンパク質のこのファミリーとの間の特異的相互作用が示された。免疫沈降の研究により、PDIおよびPDIpの両方はL - PrPよりもPrI - PrPに強く架橋することが確認された（第6図E）。また、PDIに対する ^{35}S -PrPを好む構築物の示差的架橋は、PrPを優先的に発現する組織である脳から単離されたミクロソームにおいて観測された。この場合において、偏在的PDIに対する架橋のみが観測され、PDIpが脳組織において発現されないという以前の観測と一致した（Desilva他、1996、前掲）。

【 0 0 8 5 】

次に、 ^{35}S -PrPが生合成間の初期に任意の他の内腔タンパク質と相互作用するかどうかを決定することを探求した。サポニン抽出可能な架橋物を検査すると、 ^{35}S -PrPを好む構築物 [PrP_(R2, 3) および PrP_(R4, 5)] とほぼ30kDa、60kDa、および65kDaのタンパク質との間の顕著な相互作用が明らかにされた（第6図F）。 ^{35}S -PrPを好む突然変異体 [PrP_(D2, 3) および PrP_(D4, 5)] に対する同様な架橋は顕著に減少した。期待されるように、60kDaおよび65kDaの架橋物は免疫沈降によりPDIおよびPDIpとして同定された（データは示されていない）。30kDaの架橋相手の同一性は未知のままである。これらの架橋物は、単に ^{35}S -PrPの内腔局在化の偶発

的结果として観測されない。なぜなら、プレプロラクチンの初期中間体を使用して内腔タンパク質に対する顕著な架橋物は観測されなかったからである。総合すると、架橋データが示すように、初期PrP生合成におけるシグナル配列仲介事象の1つの結果は、新生鎖と、引き続いてその生合成に参加する因子との間の示差的相互作用を促進することである。

【0086】

実施例2

プリオンタンパク質の変更されたトポロジーの病原性は 遺伝学的および感染プリオン疾患に対して普通である

プリオン疾患は感染性、散在性および遺伝的であることがある (Prusiner, S. B., PNAS (1998) 95 : 13363 - 13383 ; Weissmann, C., J. Biol. Chem. (1999) 274 : 3 - 6 ; Johnson, New Eng. J. Med. (1998) 339 : 1994 - 2004 ; Horwich, Cell (1997) 89 : 499 - 510)。これらの疾患の感染性形態、例えば、ウシ海綿状脳症およびクロイツフェルト・ヤコブ病は、通常、伝達可能な病原性の脳内蓄積、およびPrP^{S^c}と命名するプリオンタンパク質 (PrP) の異常にフォールドされたイソ型により特徴づけられる。しかしながら、PrPのトランスメンブラン形態である^{C^tm}PrPの好適な合成による研究 (Hegde他、Science (1998) 279 : 827 - 834) によるよりむしろ、ある種の遺伝したPrP突然変異はPrP^{S^c}の非存在下に神経変性を引き起こすように思われる (Brown, Ann. Neur. (1994) 35 : 513 - 529 ; Tateishi, J.他、Neurology 1990, 40 : 1578 - 1581 ; Tateishi, Neurology (1996) 46 : 532 - 537 ; Tateishi, J.他、Brain Pathology (1995) 5 : 53 - 59)。PrPにおけるある種の突然変異 (ヒトプリオン疾患関連A117V突然変異を包含する) は小胞体 (ER) における生合成を変更し、より高い百分率のPrP分子をトランスメンブラン形態^{C^tm}PrPで合成させる。トランスジェニックマウスにおける^{C^tm}PrPを好む突然変異の発現は、プリオン疾患において観測されるものに類似する神経変性的変化を生じた (Hegde他、Science (1998) 279 : 827 - 834)。^{C^tm}PrPを好む突然変異の検出が示唆するように、脅威が増強した^{C^tm}PrPは神経変性を引き起こす (Hegde他、Science (1998) 279 : 827 - 834) が、この神経変性メカニズムが伝染性プリオン疾患の病原性に関係するかどうかは不明瞭であった。これ

を探查するために、^{C^{un}}PrPを形成する性向が異なる突然変異PrPトランスジェーンを使用して問題のマウスを発生させ、引き続いてPrP^{Sc}誘導神経変性に対するマウスの感受性を評価した。

【0087】

無細胞翻訳およびトランスロケーション

SP6ポリメラーゼを使用する関係するコーディング領域の転写、イヌ腓臓からのミクロソーム膜を含有するウサギ網状赤血球ライゼイト中の翻訳、およびタンパク質分解は本質的に以前に記載された通りであった (Hegde他、Science (1998) 279 : 827 - 834)。翻訳反応を32 において40分間実施し、0.5mg/mlのPKを使用してタンパク質分解反応を0 において60分間実施した。産物をR073抗体を使用して免疫沈降させ (Rogers、M.他、J. Immun. 1991、147 : 3568 - 3574)、15%のアクリルアミドゲル上のSDS - PAGEにより分離し、オートラジオグラフィにより可視化した。

【0088】

【表1】

表 1

トランスジェニック・マウスの作製及び特徴付け

トランスジェニック 系統番号	トランスジェ ニック系統名	% Ctm インビトロ	(Sha)に対する PrP発現レベル	Ctm- 係数	Age spont disease (day)	CtmPrp インビボ	Sc237 inc. time (日)
TgShaPrp (STE)H	F1788	6	4	24	—	—	323+/-14 (9/9)
TgShaPrp (A117V)L	E15781	31	0.4	12	—	—	70+/-2 (6/6)
TgShaPrp (A117V)H	E15727	31	4	124	572+/-35 (5/5)	+	55+/- (6/6)
TgShaPrp (N1081)L	E15786	35	1	35	—	—	311+/- (3-3)
TgShaPrp (N1081)H	E15790	35	5	175	312+/-24 (7/7)	+	233+/-2 (9/9)
TgShaPrp (KH-11)L	E12485	48	0.4	19	—	—	257+/-2 (9/9)
TgShaPrp (KH-11)M	F1220	48	1	48	472+/-13 (6/6)	+	181+/-5 (10/10)
TgShaPrp (KH-11)H	F1198	48	4	192	58+/-11 (24/24) ^a	++	ND ^b

表 1 本試験において使用したトランスジェニック・マウスの特徴。% Ctmインビトロの値は、図 8 a の定量から得た。PrP 発現レベルを、13A5モノクローナル抗体を用いた定量的ウエスタン・ブロットイングにより測定し、そしてSyrianハムスターにおけるPrP 発現に対して再発現させた。^{*}Sha; 代表的実験に関しては図 1 日を参照のこと。各トランスジェニック系統に関するCtm-係数を、先行する2つの列内の値を乗じることにより得る。“Age spont disease”は、臨床兆候の開始歳を示す（平均±SEM(n/n)）。インビボにおけるCtmPrPの存在を測定するための生化学アッセイは、先に記載されており⁹、そして臨床的に病的な動物（病気を発症しているトランスジェニック系統の場合）又は600日歳を超えるマウス（神経変性を発症していないトランスジェニック系統の場合）のいずれかに対して行った。“Sc 237 inc. time”は、Sc 237 Shaプリオンによる接種から機能不全の神経学的兆候の顕出までの時間 [平均±SEM(n/n)] を示す。

^a 引用文献9からのデータ。

^b NDは、測定していないことを示す。

【 0 0 8 9 】

以前に記載されているようにを発生させた (Manson他、Neurodegeneration (199

4) 3 : 331 - 340およびその中の参考文献)。脳組織のホモジネートを13A5mAbでイムノプロットングし (Kascsak, R.J., J. Virology 61 : 3688 - 3693)、正常ゴールデンハムスターの脳組織の連続希釈物と比較することによって、PrP発現をアッセイした (第8図bおよび表1)。以前に記載されているように、これらのマウスを自発的病気の発生について観測した (Prusiner, Ann. Neur. (1982) 11 : 353 - 358)。Tg [SHaPrP] / Prnp^{0/0} (系統A3922)⁹をTg [MoPrP] / Prnp^{0/0} (系統B4053) に対して交雑させることによって、SHaPrPおよびMoPrPの両方を発現する二重トランスジェニックマウス (第11図参照) を発生させた (Telling, Genes Dev. (1996) 10 : 1736 - 1750)。以前に記載されているように、1%の脳ホモジネート (w/v) をマウス (30 μ l / 動物) またはハムスター (50 μ l / 動物) に脳内接種することによって、伝染性 (第10図参照) を評価した (Prusiner, Ann. Neur. (1982) 11 : 353 - 358)。ハムスタープリオンのSc237系統 (第9図において使用した) およびマウスプリオンのRML系統 (第11図において使用した) は以前に記載された (Marsh, J. Infect. Dis. (1975) 131 : 104 - 110 ; Chandler, Lancet (1961) 1 : 1378 - 1379)。

【 0 0 9 0 】

CtmPrPおよびPrP^{Sc}についての脳の評価

脳組織 (新しく取出したまたは液体窒素中のフラッシュ凍結後に - 80 °C において貯蔵した) を、PBS (5%w/vまたは10%w/v) 中で16、18および20ゲージの針を連続的に通過させることによって均質化した。CtmPrP検出 (「温和な」タンパク質分解条件) のために、試料の17 μ lのアリコート (25 μ g / μ lの濃度) を1%のNP - 40、0.25mg / mlのPKに調節し (20 μ lの最終体積)、氷上で60分間インキュベートした。PrP^{Sc}検出 (「苛酷な」タンパク質分解条件) のために、17 μ lの試料 (25 μ g / μ lの濃度) を0.5%のNP - 40、0.5%のデオキシコレート、0.1mg / mlのPKに調節し (20 μ lの最終体積)、37 °C において60分間インキュベートした。温和な / 苛酷な消化条件の間の差は、操作的であるが、インキュベーションの37 °C の温度変化、および非イオン性洗剤 / 非イオン性およびイオン性洗剤の混合ミセルを含むので、微妙ではないことに注意すべきである。PMSFを5mMに添加し、さらに5分間インキュベートし、試料を5体積の沸騰する1%SDS、0.1Mの

Tris、pH8.9に移すことによって、タンパク質分解反応を停止させた。次いで試料を製造業者の使用説明書に従いPNGアーゼで消化し、10%トリシン - SDS - PAGEにより分割し、イントロセルロースに移し、3F4または13A5モノクローナル抗体 (Kascsak, J. Virol. 61: 3688 - 3693)、またはR073ポリクローナル抗体 (Rogers, J. Immunol. (1991) 147: 3568 - 3574) でプロービングした。

結果

ERにおいて合成される^{C^tm}PrPの量を変更するゴールデンハムスター (Sha) PrPので4つの突然変異体のin vitroトランスロケーション産物を第8図aに示す。FVB/Prnp^{0/0}バックグラウンドの中にこれらの突然変異体PrPの各々を発現するトランスジェニックマウスを発生させ、特性決定した (表1および第8図b参照)。Tg [SHaPrP (KH II) _H]、Tg [SHaPrP (KH II) _M] およびTg { SHaPrP (N108I) _H } マウスは、それぞれ、ほぼ60、472、572および312日に神経変性疾患の徴候および病徴を発生することが観測された (第8図cおよび表1)。対照的に、Tg [SHaPrP (STE)] マウスおよびより低いレベルの疾患関連トランスジーンを発現するマウス { Tg [SHaPrP (KH II) _L]、Tg [SHaPrP (A117V) _L] およびTg [SHaPrP (N108I) _L] } のいずれも自発的疾患を発生しなかった (表1; データは示されていない)。これらの系統のトランスジェニックマウスの各々からの脳組織の生化学的分析は^{C^tm}PrPの増加を明らかにしたが、疾患を発生した系統においてPrP^Sを示さなかった (第8図b)。総合すると、第8図中のデータはPrPの^{C^tm}PrP形態の合成の増加が神経変性疾患の発生に関連する点を要約する。

【0091】

2つの方法において見られる、^{C^tm}PrPと疾患の重症度との間の明らかな投与量応答はいっそう顕著である。第1に、^{C^tm}PrP合成がERにおいて好適であることがいっそう強くなるほど (KH II > N108I > A117V)、自発的疾患の開始はいっそう早くなる (表1)。第2に、これらの突然変異体の各々の発現レベルが明らかな限界値より下に低下すると、^{C^tm}PrPの発生 (第8図dおよび参考文献9) および疾患の発生 (表1) は阻害される。さらに、KH II突然変異を発現する3つのトランスジェニック系統は、それらのそれぞれの発現レベルに逆に相関する時間に疾患を発生する (表1)。これらの観測により、^{C^tm}PrPに好適な量の突然変異およびそ

の発現レベルの両方が神経変性の発生に寄与することが証明される。

【0092】

$C^{tm}PrP$ を作る異なる性向を有するトランスジェニックマウスのこのパネルを使用して、 $C^{tm}PrP$ と PrP^{Sc} との間の関係を分析した。まず、同一レベルのトランスジーンを発現するが、 $C^{tm}PrP$ を作る性向が異なるトランスジェニックマウスの PrP^{Sc} に対する感受性を検査した：Tg [SHaPrP (STE)] および Tg [SHaPrP (A117V)_H]。Sc237ハムスタープリオンを接種すると、Tg [SHaPrP (STE)] および Tg [SHaPrP (A117V)_H] マウスは、それぞれ、ほぼ323および54日に病気を発生することを我々は発見した（第9図a、表1）。疾患開始時において代表的マウスを生化学的に分析すると、Tg [SHaPrP (STE)] マウスはTg [SHaPrP (A117V)_H] マウスよりも実質的に多い PrP^{Sc} を含有することが明らかにされた（第9図b）。こうして、より高い $C^{tm}PrP$ を発生するトランスジェニック系統は PrP^{Sc} に対していっそう感受性であり、より低いレベルの全 PrP^{Sc} 蓄積で疾患を発生する。

【0093】

次に、Tg [SHaPrP (KH II)_L] 対 Tg [SHaPrP (A117V)_H] のSc237に対する感受性を比較した（第9図c）。突然変異を一定に保持することによって、増殖に対する潜在的バリアーに関する発生を回避するが、なお発現レベルをモジュレートすることによって $C^{tm}PrP$ を発生する性向を変化させる。期待されるように、発現レベルを低下させると、Sc237接種後の疾患に対する潜伏期が増加した。しかしながら、より顕著には、KH IIおよびA117Vの両方の突然変異体を使用すると、より低いレベルの発現因子は疾患開始時により高いレベルの PrP^{Sc} を含有することを我々は発見した（第9図f）。異なるレベルの野生型 PrP を発現するマウスを使用して、疾患における発現レベルと PrP^{Sc} の量との間の同様な逆の関係が観測された（10参照）。こうして、前述したように、 $C^{tm}PrP$ を形成する性向が減少したマウスは疾患の開始時により高いレベルの PrP^{Sc} を蓄積した。上記接種データを単一のプロットに統合するために、 C^{tm} 指標と命名する測度を使用して $C^{tm}PrP$ を発生する相対性向により、異なる系統のトランスジェニックマウスを等級づけた（表1参照）。 $C^{tm}PrP$ トポロジーで合成された鎖の百分率にトランスジーンを発現レベルを掛け、こうして $C^{tm}PrP$ 発生に影響を及ぼす2つのパラメーターを組

込むことによって、この指標を誘導する。Ctm指標と疾患開始に蓄積したPrP^{Sc}の量との間に、明瞭な関係が存在することを第9図gは示す。この関係は、疾患を引き起こすPrP^{Sc}の能力がCtmPrPを発生する宿主の性向の関数であることを示唆する。

【0094】

第9図中のデータは2つの重要な点を証明する。第1に、種々の系統のトランスジェニックマウスを接種すると、臨床的疾患の開始時に非常に異なるPrP^{Sc}蓄積レベルが観測される。各場合においてマウスの系統が同一であり、唯一の差がPrPトランスジーンの特質および発現レベルであるとき、プロテアーゼ耐性PrP^{Sc}の蓄積が疾患の最も近い原因でないであろうという結論をこの観測は強調する；引き続き事象（^{Ctm}PrPを明らかに包含する）が関係することが推測される。第2に、PrP^{Sc}の蓄積量と^{Ctm}PrPの発生をモジュレートする因子との間の関係が存在する。このような関係が示すように、^{Ctm}PrPおよびPrP^{Sc}はそれらが直接的または間接的に互いの代謝に影響を及ぼすことができる経路の一部である。

【0095】

第9図g中のデータを調和させる1つの方法は、PrP^{Sc}の蓄積が^{Ctm}PrPの発生を増加させ、次いで^{Ctm}PrPが神経変性を誘発する場合である。こうして、^{Ctm}PrPを発生する性向が増強した（すなわち、Ctm指標が高い）トランスジェニックマウスは、疾患を引き起こすために必要な限界値を越えて^{Ctm}PrP発生が増加する前に、より少ないPrP^{Sc}を必要とするであろう。このモデルは第9図gにおいて観測される逆の関係を説明し、2つの追加の予測を作る。第1に、^{Ctm}PrP形態のPrP合成を実質的に好むトランスジェニックマウスは神経変性疾患の発生におけるPrP^{Sc}の要件を完全に回避するので、このようなマウスからの組織は感染性ではないであろう。第2に、感染性プリオン疾患においてPrP^{Sc}が蓄積する過程間に、^{Ctm}PrPレベルは増加するであろう。これらの予測を試験した。

【0096】

^{Ctm}PrP関連疾患の伝染性を評価するために、臨床的に病気のTg [SHaPrP (KH II)_M] マウスからの脳ホモジネートを4つの宿主に脳内に接種した：i) 低いレベルでKH II突然変異を発現するTg [SHaPrP (KH II)_L] マウス、ii) 野生型S

HaPrPを過剰に発現するTg [SHaPrP] マウス、iii) PrP遺伝子がホモ接合的に崩壊したFVB / Prnp^{0/0}マウス、およびiv) ゴールデンハムスター。第10図に示すように、末期的に病気のTg [SHaPrP (KH II)_H] マウスからのホモジネートは、3つの独立の宿主において直接的に比較したとき、対照Tg [SHaPrP] ホモジネートと異なる速度で神経学的病気を誘導しなかった。さらに、接種後625日までにおいて第10図からの代表的脳組織を生化学的および病理学的に検査すると、実験動物または対照動物においてPrP^S°または神経学的疾患の証拠は示されなかった（データは示されていない）。しかも、Sc237を使用するTg [SHaPrP (KH II)_L] マウスの接種は脳においてPrP^S°を容易に発生し（第2図c）、これは疾患をTg [SHaPrP (KH II)_L] およびTg [SHaPrP] マウスに疾患を再び伝染させた（データは示されていない）。こうして、PrP (KH II) h aPrP^S°に形成されることができ、Tg [SHaPrP (KH II)_H] マウスにおける^{C^tm}PrP関連疾患は検出可能PrP^S°を発生せず、したがって感染性ではない。伝染の欠如は、これらの遺伝学的プリオン疾患における神経変性が^{C^tm}PrPにより直接的に引き起こされるという仮説のための支持を提供する。第9図g中のデータに基づいてなした第2予測は、感染性プリオン疾患におけるPrP^S°の蓄積が^{C^tm}PrPの発生を増加させ、これは引き続いて神経変性に導くということである。不都合なことには、この予測の試験は蓄積するPrP^S°の生化学的PrPにより妨害される（Meyer PNAS (1986) 83 : 2310 - 2314）。その分画において高度にプロテアーゼ耐性でありかつ不均質性であることによって、それはすべての細胞下画分を実質的に汚染する傾向がある。さらに、それは^{C^tm}PrP検出のアッセイを妨害し、このアッセイもまたプロテアーゼからの保護に基づく。PrP^S°は細胞により容易には分解されず、非常に高いレベルに蓄積し¹²、非常に少量の細胞下画分の汚染であってさえ^{C^tm}PrPの微妙な増加の検出を困難とする。こうして、新しく合成されたPrPのトポロジーに対する蓄積するPrP^S°の効果をモニターするために別の方法を必要とする（第11図a参照）。

【 0 0 9 7 】

このような実験を設計するために、これらの観測を利用した。第1に、PrP^S°変換に対する種バリエーションがマウスとゴールデンハムスターとの間に存在する（Prushiner、Cell (1990) 63 : 673 - 686 ; Pattison、Res. Vet. Sci. (1968) 9 : 40

8-410)。第2に、PrP^{Sc}形成に対する種バリエーションと対照的に、合成、トランスロケーションまたはトポロジにおける種特異的差はマウスPrP (MoPrP) とSHaPrPとの間において観測されない (Hegde, Science (1998) 279: 827-834)。そして最後に、SHaPrPに対して高度に特異的なモノクローナル抗体 (これはMoPrPと交差反応しない) は、これらの2つのPrPトランスジェン¹²の発現を区別するために有効である。こうして、このような二重トランスジェニック動物において、マウスPrP^{Sc}の蓄積の過程間における「リポーター」としてハムスター^{C¹m}PrPの形成を使用することができる。この実験のために、MoPrPおよびSHaPrPの両方を合成する二重トランスジェニック動物にマウスプリオン (RML系統の) を接種する。次いで、PrP^{Sc}の蓄積および疾患の発生の時間過程間の種々の間隔において、個々のマウスを殺し、全PrP^{Sc}の蓄積およびハムスター^{C¹m}PrPの存在について検査する (第4図a参照)。この原理は、接種後、MoPrPのみがプリオン複製およびPrP^{Sc}の形成のための基質であることである¹³。細胞が発生する (または発生しない) 能力に対するこのPrP^{Sc}蓄積の効果を、SHaPrPの検査により評価することができる。

【0098】

臨床的疾患はこれらの動物において接種後ほぼ9週に発生することが認められる (データは示されていない)。この9週の時間過程間にPrP^{Sc}はこれらのマウスにおいて蓄積し、最も早い検出可能な時間はほぼ5~6週であることを我々は発見した (第11図b)。期待されるように、この研究における生化学的基準 (第11図b) と以前の研究¹³における感染性の基準とにより、SHaPrPはPrP^{Sc}を形成したことが認められなかった。しかしながら、顕著には、SHaPrPを検査すると、^{C¹m}PrPの量の有意な増加が認められた (第11図c)。接種しなかったマウスの平行の組において、このような増加は観測されなかった (データは示されていない)。これらの発見は、^{C^un}PrPが伝染性形態のPrPの非存在下に神経変性を引き起こすことができるという観測 (参考文献9、第8図および第10図) と組み合わせると、PrP^{Sc}の蓄積は^{C^un}PrPの合成を新たに誘導することによって疾患を引き起こすことができることを示唆する。

【0099】

本明細書に記載する発見は、PrP^{Sc}蓄積、^{Ctm}PrP形成および代謝の事象、および神経変性疾患の発生の間の原因となる関係を示唆する。証拠のこれらの相補的かつ独立的に記載はこの結論を示す。第1に、^{Ctm}PrPの発生をある種の限界値を越えて増加させる（PrP突然変異と発現レベルとの組み合わせをモジュレートすることによって）と、PrP^{Sc}形成の非存在下に神経変性が生ずる（第8図、第10図および参考文献9）。第2に、神経変性疾患を引き起こすために必要な蓄積したPrP^{Sc}の量は、^{Ctm}PrPを発生する宿主の性向により影響を受ける（第9図）。そして第3に、脳はPrP^{Sc}の蓄積過程間に増加するレベルの^{Ctm}PrPを含有するように思われる（第11図）。総合すると、データはプリオン疾患の病原性における3つの連続的段階を示唆する（第12図）。

【0100】

感染性プリオン疾患は、段階Iの工程、PrP^{Sc}の蓄積を開始することによって働くことが提案される。遺伝学的プリオン疾患は、原理的には、段階IまたはIIのいずれかにおいて働くことができるであろう。問題のPrP突然変異がPrP^{Sc}の自発的生成生ずる場合、段階Iは開始され、PrP^{Sc}は複製し、蓄積し、引き続いて^{Ctm}PrPを増加させる（段階II）。このようなメカニズムは、クロイツフェルト・ヤコブ病のある種の遺伝学的変異型を引き起こすと考えられるE200K突然変異¹⁶についてもっともらしい。こうして、PrP^{Sc}はこれらの患者の17において見られ、そして疾患は実験動物に対して容易に伝染性である⁷。選択的に、ある種の他のPrP突然変異は、^{Ctm}PrP発生を直接的に増加させることによって、段階Iを完全にバイパスすることができる。ヒトゲルストマン・ストラウセル・シェインケル¹⁸病を生ずるA117V突然変異は、このようなメカニズムにより働くことが推定される。これはこの疾患が伝染性でない理由⁶⁻⁸、およびPrP^{Sc}がこれらの患者の脳組織において検出されなかった^{6, 9}理由を説明するであろう。

【0101】

プリオン疾患における第1段階は、^{Ctm}PrPが、いったん発生すると、神経変性疾患に導くメカニズムを包含する。これが起こるメカニズムおよび関係する細胞内経路は完全に不明瞭のままである。しかしながら、^{Ctm}PrPが単にミスフォールドされ、ERの中に保持されまたは蓄積するか、あるいは変性されたタンパク質応

答を誘発することはないことが推定される。これは $C^{tm}PrP$ の本質的にすべてがERを越えて輸送されたしまうという観測⁹により示唆される。ここでERは分泌経路におけるタンパク質フォールディングのための現在既知の品質コントロール機構の部位である^{19, 20}。さらに、Tg [SHaPrP (KH II) _M] 動物を使用する場合またはA117V突然変異を含有するGSSのヒトの場合におけるように、疾患は病理学的レベルに密接したレベルで発現されたトランスジーンにより誘発されることができ。こうして、 $C^{tm}PrP$ が神経変性を誘導するいっそう選択的な手段は入手可能なデータにより示唆される。

【0102】

第12図に記載するフレームワークは、将来の研究のいくつかの新しいルートを示唆する。第1に、 $C^{tm}PrP$ の生合成および輸送における調節された事象は解明されるべきである。分画に適用可能な無細胞系におけるPrPのトランスロケーションおよびトポロジーの決定の初期の事象の再構築は、 $C^{tm}PrP$ 合成を調節するトランス作用性因子を同定する有望なルートであると思われる^{21, 22}。さらに、トポロジーに影響を及ぼすいくつかの突然変異に利用可能性は、 $C^{tm}PrP$ 輸送の後の事象を定めることを目的とする研究を促進するであろう。第2に、 $C^{tm}PrP$ 代謝の研究から獲得された洞察は、これらの事象がPrP^S蓄積によりトランスモジュレートされる方法のよりすぐれた理解を疑いなく可能とするであろう。このような研究は、PrP^S蓄積および $C^{tm}PrP$ 仲介神経変性の事象間の関係をいっそうよく描写することが推定される。PrP^S蓄積が細胞のいくつかの代謝機能に対して衝撃を与えることがわかると^{23, 24, 25}、これらの1またはそれ以上は疾患を誘発する $C^{tm}PrP$ 発生に影響を及ぼすことが推定される。PrP^S蓄積を越えた段階で作用して $C^{tm}PrP$ 仲介神経変性を直接引き起こすPrP突然変異体の入手可能性（参考文献9および第8図）は、プリオン疾患の病原性における下流の事象の分析を促進するであろう。

【0103】

実施例3

タンパク質コンフォメーションに対するプロラクチン、ベータラクタマーゼ、および免疫グロブリンG重鎖のシグナル配列の作用

一般に、適切にフォールドされるタンパク質とミスフォールドされるタンパク質との間において二分法が受け入れられた (Eilgaard他 (1999) Science 286: 1882 - 1888)。換言すると、タンパク質が2以上の適切にフォールドされた状態を有することができ、さらに異なる時間または環境において他のフォールドされた状態に対して1つを選択することができるという可能性は考慮されてきていない。異なる方法でフォールディングする線形ポリペプチド配列は実質的に異なる形状を有することができるので、この新しいレベルの調節はゲノムの情報含量および細胞に対して有効な遺伝子発現の調節可能性を大きく増加する。この仮説を試験するために、まず、3つの無関係の、簡単な分泌タンパク質、すなわち、プロラクチン (Pr1)、ベータラクタマーゼ (lac)、および免疫グロブリンG重鎖 (IgG) を選択して、個々のシグナル配列が異なる新生鎖のそれらのようにER膜を横切るそれら自身のパッセンジャー配列のトランスロケーション (第13図参照) において等しく効率的であるかどうかを決定した。

【0104】

これらのcDNAのアリコートをもつ3つのユニーク制限エンドヌクレアーゼ認識部位の各々においてトランケートし、こうして転写するときトランケートされたcDNAがこれらの分泌タンパク質のより長いC末端伸長された長さをコードするRNA転写物を発生し、最後にミクロソーム膜を補充した無細胞翻訳系中でこれらの転写物を発現するようにした。第14図において理解できるように、これらのシグナル配列がそれら自身の新生鎖のトランスロケーションにおいて等しく高度に効率的であるという事実にかかわらず、プロテイナーゼKを使用する消化に対する新生トランケートド鎖のアクセス可能性により測定して、異なる新生鎖のトランスロケーションのためにラジカル的に異なるリボソーム - 膜連結が確立される (第14図の各パネルの右の絵参照)。

【0105】

最初にER膜に対するターゲティングすると、すべての3つの鎖はプロテアーゼに対してアクセス可能に止まる (第14図A~Cの左のパネル)。短時間後、プロラクチンの場合において、堅固なシールが確立され、この時新生鎖はER内腔に直接転位する (第14図Aの中央のパネル参照)。しかしながら、ベータラクタマー

ぜおよびIgG重鎖の場合において、リボソーム - 膜連結は実質的に後の時点において開いたままであり（第14図BおよびCの中央のパネル参照）、非常に後においてのみ、それは効率よく閉鎖する（第14図BおよびCの右のパネル）。これが示唆するように、異なるタンパク質は顕著に異なるリボソーム - 膜連結を介してER内腔に転位する。プリオンタンパク質（PrP）についての研究により示唆されるように、シグナル配列がタンパク質フォールディングの調節に関係する場合、新生鎖がフォールディングを開始する異なる環境を確立することによって、これは一部分起こることができる。リボソーム - 膜連結が開いたままであるとき、第14図Bおよび第14図Cの中央のパネルにおけるように、鎖は細胞質ゾルの還元性環境中でフォールディングを開始する；第14図Aの中央のパネルおよび第14図Bおよび第14図Cの右のパネルにおけるように、リボソーム - 膜連結が閉じるとき、フォールドしないまたは部分的にフォールドした鎖はER内腔の酸化性環境に進行して、フォールディングファンネル選択のプロセスを開始するか、あるいは続ける。

【0106】

前述したように（実施例1）プリオンタンパク質（PrP）の場合において、リボソーム - 膜連結の開いたおよび閉じた状態は、異なるようにフォールディングされかつ異なるトランスメンブラントポロジエー的形態である同一のポリペプチド配列である、PrPの分泌形態 / Ctm形態の合成に相関する。第14図中のデータは、リボソーム - 膜連結の状態とタンパク質のフォールディングとの相関を、簡単な分泌タンパク質、例えば、プロラクチンおよび免疫グロブリン重鎖に拡張する。

【0107】

一部分シグナル配列が確立するリボソーム - 膜連結の特質により、シグナル配列がタンパク質フォールディングにおいて仮定した調節の役割を演ずる場合、2つの異なる分泌タンパク質のシグナル配列の交換は、3つの予測の形態で、劇的な結果を有するであろう：

第1に、シグナル配列の交換は新生鎖が存在する環境を変化させるであろう（例えば、プロテイナーゼKでプロービングしてリボソーム - 膜連結の変化により、または新生鎖を化学的架橋により決定されるアソシエートするタンパク質の変化により評価する）。プロラクチンシグナル配列の背後のプロラクチンの新生鎖

と、IgGシグナル配列の背後のプロラクチンの新生鎖との間の化学的架橋の1例は第15図に示されている。PrPについて、実質的に同一の結論に到達する。

【0108】

第2に、2つのタンパク質のフォールディングは、異なる環境における異なるアクセサリタンパク質との相互作用により2つの異なるフォールディングファンネルに向けられ、困難であることが推定される。これを記録する1つの方法は、タンパク質コンフォメーションのリポーターとしてグリコシル化部位において操作し、両方のシグナル配列がタンパク質から究極的に切断されてさえ、同一鎖が1つのシグナル配列の背後に存在するが、他のシグナル配列の背後に存在しないとき、同一鎖はグリコシル化されることを証明する方法である。これは第16図においてプロラクチンについて証明されており、ここでそれ自身のシグナル配列 (PrI) または免疫グロブリン重鎖 (IgG/PrI)、成長ホルモン (GH/PrI) のシグナル配列の背後において、操作されたグリコシル化リポーターを使用する。第16図Aにおける各パネルの第5レーンから理解できるように、異なるシグナル配列の背後で作られた生ずる成熟プロラクチン鎖は、新生鎖にコアN-結合糖を付加するオリゴサッカリルトランスフェラーゼの能力により評価して、コンフォメーション的に異なる。第16図Bはこの差を定量する。これらの構築物のトランケーションの発現により、他に比較して1つのプロラクチンのグリコシル化の差は反応速度論的現象でないことが明らかにされる。なぜなら、新生鎖を除外してトランケートされ、したがって非成長性鎖の延長したインキュベーションはそれ以上のグリコシル化を生じなかったからである。第16図Cが示すように、コンフォメーションの差は、グリコシル化により記録したとき、種々のシグナル配列の背後のプロラクチンをコードする対応する構築物でトランスフェクトされたcos細胞の培地中に分泌された物質から容易に明らかである。こうして、プロラクチンのコンフォメーションは、異なるシグナル配列の背後のその合成により簡単に変化される。その差はシグナル配列の既知の役割により説明することができない。なぜなら、利用するすべてのシグナル配列は、それらの新生基質 (第13図参照) および修飾されたプロラクチンコーディング領域によりコードされる基質の両方のターゲティングおよびトランスロケーションに対して等しくコンピテントである

からである。さらに、第16図において合成されるプロラクチンのすべてのコンフォメーションは、培地の中へのそれらの分泌により評価して、品質コントロール機構により適切にフォールディングされると判定される。

【0109】

第3の予測は次の通りである。すなわち、交換されたシグナル配列のいくつかの場合において、シグナルと引き続くパッセンジャーとの間の「ミスマッチ」は十分に苛酷であるので、完全にターゲティングされた鎖であってさえER内腔の中へのトランスロケーションとコンパティブルなフォールディングファンネルを見出すことができず、その代わりに細胞質ゾルの中に「落下して戻り」、転位することができない。正確には、無傷のER膜を使用して分泌形態でもみ発現されることができるPrP突然変異体について、この形態の欠陥は観測され、そして糖タンパク質消耗再構成ミクロソーム膜におけるその発現は鎖の転位を不可能した（Hegde他、（1998）Mol. Cell. 2：85 - 91）。

【0110】

第13図において、IacおよびIgGシグナル配列の背後において、プロラクチンは実質的なトランスロケーション欠陥を表示し（第13図A）、これはIgGの領域からの配列をシグナル配列に引き続いて導入することによって改善することができることを我々は証明する（第13図Bおよび第13図C）。さらに、糖タンパク質消耗再構成膜を横切る突然変異体PrPのトランスロケーションにおける欠陥は、PrPシグナル配列をプロラクチンのシグナル配列と交換することによって補正することができ（データは示されていない）、これにより示唆されるように、欠陥は膜および鎖に対して固有でなく、むしろ、特定のシグナル配列 - 鎖の組み合わせの不適合性を反映し、フォールディングファンネルの選択におけるシグナル配列の仮定された役割と一致した。

【0111】

実施例4

上記から理解できるように、シグナル配列はタンパク質の最終のフォールドされた状態を決定することができる。これは他のシグナル配列ではなく、あるシグナル配列の背後においてタンパク質の中に操作されたグリコシル化部位のアクセ

ス可能性により証明される。成長する鎖は異なるフォールディングファンネルを進行するので、リボソーム - 膜連結の特質および新生鎖とトランスロケーション機構との間のタンパク質 - タンパク質の相互作用に依存して、異なるコンフォメーションが達成される。コンフォメーションの差の結果として、鎖が成長する間においてさえ、タンパク質の異なるようにフォールドされた形態は修飾酵素に対して異なるようにアクセス可能である。それゆえ、タンパク質のコンフォメーションのリポーターとして働く操作されたグリコシル化部位は、他のシグナル配列ではなく、1つのシグナル配列が操作されるとき、グリコシル化される。さらに、リボソーム - 膜連結の特質がトランスロケーション前に実質的な鎖フォールディングを可能とするようなものである極端な場合において、真性の鎖における追加の情報が出現してリボソーム - 膜連結を閉鎖しなくてはならない。このような情報が存在しないと、IgGシグナル配列の背後のプロラクチンについて証明されるように、鎖は転位することができない。

【0112】

こうして、モデルの分泌タンパク質はプリオンタンパク質について以前になされた観測（実施例1）を反復し、それらの結果が特別の場合でなかったことを示す。事実、プリオンタンパク質について特別であると思われるものは、その生合成およびフォールディングの経路ではなく、選択的フォールディング経路がトポロジ的差をし、それらの検出をいっそう容易と発現することである。

【0113】

実施例5

トランス作用性因子によりタンパク質フォールディングのモジュレーション

上記実施例1に示すように、伝染性プリオン疾患におけるPrP^{Sc}増殖の時間経過を^{C¹m}PrPの発生増加に精密に追跡する。こうして、PrP^{Sc}の蓄積は^{C¹m}PrPの発生または代謝に関係する事象をトランスモジュレートするようと思われる。^{C¹m}PrPは、ER内腔に転位したC末端ドメインを有し、過剰発現されるとき自発的神経変性を誘発する（Hegde、Science（1998）279：827 - 834）。実施例2に示すように、^{C¹m}PrPは臨床的徴候開始直前に誘導されるよう思われ、それが神経変性への最終の共通の経路を開始することが示唆される。ER膜の未知糖タンパク質は、^{se}

$^{\circ}\text{PrP}$ に導く経路に新生PrP鎖を向けることによって、 $^{\text{C}^{\text{tm}}}\text{PrP}$ の発現から正常の脳を「保護」するトランスロケーションアクセサリ因子 (TrAF) として関係づけられる (Hegde, Mol. Cell. (1998) 2: 85 - 89)。

【0114】

新生PrP鎖がトポロジ的形態の中に配分されるメカニズムは複雑なものである (Rutkowski、提出された)。PrPシグナル配列それ自体は、新生鎖の少なくとも2つの集団を確立することによってある役割を演ずる：あるものは開いたリボソーム - 膜連結を有する；他のものは閉じたりボソーム - 膜連結を有する。こうして、シグナル配列はPrPの出現するN末端ドメインが面する環境を決定することができる。細胞質ゾル環境に暴露された鎖のみは $^{\text{C}^{\text{tm}}}\text{PrP}$ となる可能性を有する。追加のタンパク質 - タンパク質相互作用が最終結果を決定するので、開いたリボソーム - 膜連結は、必要であるが、 $^{\text{C}^{\text{tm}}}\text{PrP}$ を作るために十分ではない。トランスメンブランドメインが $^{\text{C}^{\text{tm}}}\text{PrP}$ 形成に向けられるのを妨害する突然変異は、細胞質ゾルに再び向けられる鎖を生じ、細胞質ゾル中でこれらの鎖は分解される可能性が最も強い。

【0115】

$^{\text{se}^{\circ}}\text{PrP}$ と $^{\text{C}^{\text{tm}}}\text{PrP}$ との間の区別はトポロジに基づいてなされる。しかしながら、非変性洗浄剤溶液中の制限されたプロテアーゼ消化に対する異なる感受性により決定して、同一配列のこれらの2つのポリペプチドもまたそれらのコンフォメーションにおいて異なる。こうして、トランスロケーションの調節は、コンフォメーションおよび機能の両方において異なるPrPの多数の形態を発生する手段であるように思われる。 $^{\text{C}^{\text{tm}}}\text{PrP}$ よりむしろ $^{\text{se}^{\circ}}\text{PrP}$ を作るように新生PrP鎖を指令する機構 (すなわち、TrAF) は、脳において検出可能な $^{\text{C}^{\text{tm}}}\text{PrP}$ の量を増加させるスクラピー感染の能力に基づいて、それ自体調節されることができる。総合すると、これらの観測は新しい原理に導く：タンパク質のコンフォメーションは、ちょうどその一次アミノ酸配列ばかりでなく、かつまた2またはそれ以上の異なる機能的コンフォメーションの結果のうちのどれが実際に起こるか、あるいは優勢を占めるに影響を及ぼすタンパク質、例えば、TrAFにより決定される。

【0116】

したがって、複雑な分泌タンパク質または内在性膜タンパク質は多数の潜在的な機能的フォールドされた状態を有することができる。1系列の可能な環境（例えば、細胞質ゾル、膜、内腔）中で、新生鎖内のリガンドとトランスロコンにおけるレセプターとの間の組み合わせ系列の相互作用により、異なるフォールドされた状態は発現するようになる。種々のコンフォメーションの発生/分解の割合は、任意の所定の時間に発現される特定の基質について可能な最終結果の種類、および数を決定する。これらのプロセスは、特定の直ちの必要性（Chapman、Annu. Rev. Cell and Dev. Biol. (1998) 14: 459 - 485）および細胞の包括的プログラム（Bonafacino、Nature (1990) 334: 247 - 251）の両方を有するタンパク質生合成と共同する、細胞表面からのシグナリング経路およびその他の方法により統合される。

【0117】

この見解は、分泌および内在性膜の新生鎖が2以上のフォールディングファンネルを進行することを必要とする（または単一の、複雑なフォールディングファンネル内の異なる末端への異なる通路を取る）。これはTrAFを有する新生鎖中の離散配列の相互作用またはTrAFがアクセス可能とする環境により達成される。異なるTrAFは、異なる鎖または所定の鎖のフォールディング状態の異なるサブセットに対して作用する、異なる区画（細胞質ゾル、膜、ER内腔）に局在化し、また、他の機能的フォールドされた形態に対する1つの形態の選択に寄与する。これはタンパク質フォールディングにおける「三次の」複雑度として考えることができる。それは分子シャペロンの概念と異なり、可能な構造的結果の各々は機能的であり - 機能または調節のいくつかの面においてちょうど異なる。こうして、分泌および内在性膜タンパク質は多数のコンフォメーションで出ることができ、各々は明確な機能的意味を有する。

【0118】

最後に、可能な選択的フォールディングファンネルの中からの選択を支配する、TrAFを包含する、トランスロコンおよびその成分は、細胞内シグナリングによりそれら自体調節されることができ、タンパク質フォールディングに対して「四次の」複雑度を提供する。第18図は、トランスロケーションの調節の有効なモデ

ルを要約し、それを四次のフォールディングファンネルに関係づける。

【0119】

トランスロケーションの調節をトランスで探査するために、分画・再構成された系を開発し、ここで細胞質ゾルまたは膜を操作する結果として、PrPのコンフォメーション混合物を変更することができる。PrPを使用する発見は他の無関係のタンパク質における研究により再現されること示された (RutkowskiおよびLingappa) ので、問題の遺伝子産物を含有する任意のシグナル配列の配座異性体を検出し、研究するという目標を達成するために、これらの系を操作することができることが明らかである。

結果

以前において、トランスロケーションおよびコンフォメーションに影響を与えるトランス作用性についての証拠は比較的間接的であった (Hegde他、(1998) Mol. Cell. 2: 85 - 91; Hegde他、(1999) Nat. 402: 822 - 826)。この見解をいっそう直接的に支持する、2つの新しい系列の証拠を我々は今回発見した。第1に、分化の前後にマウス赤白血病 (MEL) 細胞から調製した細胞質ゾル抽出物はPrPのトランスロケーションに影響を与え、Sec - PrPの利益となるように形態の分布をシフトすることができること我々は観測した (第19図参照)。第2に、初期の出産後の発生における種々の時間においてハムスター脳からミクロソーム膜を調製したとき、TrAF活性は変化し、13日の胚脳における高から、出産後14日における最下点に行くことを発見し、このプロセスはCtm - PrPを抑制するTrAF活性が選択した脳領域において減少して、初期齧歯類脳発生のプログラムの一部分として、Ctm - PrPを促進し、ニューロンアポトーシスを誘発するという仮説と一致した (第20図参照)。

【0120】

前述の結果にかんがみて、他の源からトランス作用性因子を使用する相補性が可能である方法で、ウサギ網状赤血球ライゼイトを分画する準備をした。リボソームのペレットとDEAE溶出液画分との組み合わせは、完全なトランスロケーション活性を回復するために十分であることを我々は発見した (第21図~第23図参照)。

。

【0121】

同様に、我々は以前発表されたプロトコル (GorlichおよびRapoport (1994) Cell 75:615-630; Hegde他、(1998) Mol. Cell. 2:85-91) を変更して、以前の調製物に機能的に等しいが、コスト、速度、およびそれ以上の分画に適用可能である、分画・再構成されたプロテオリポソームを発生させた。このプロトコルは前述した通りである。

【0122】

上記結果から明らかなように、本発明は、生理学的プロセスにおけるトランスロケーション系の参加を検出し、拡大し、理解し、そして操作する新規なプラットフォームおよびパラダイム、およびER膜を横切るトランスロケーションのためのシグナル配列を有する任意の分泌または内在性膜タンパク質、または他のタンパク質の異なる配座異性体の宿主の生理学に対する効果を提供する。異なる配座異性体を異なる生理学的結果に導くことができる、タンパク質のフォールディングをコントロールすることができることによって、細胞の経路に対する配座異性体の効果を研究する機会、異なる配座異性体の形成に関係する因子の同定、特定のコンフォメーションから生ずる悪い結果の処置、および異なる配座異性体の形成から生ずる細胞のプロセスの理解を達成することができる。新規な薬剤を開発することができ、そして従来使用されてきているものと異なる観点から疾患を考慮することができる。

【0123】

また、前述の結果が証明するように、異なる遺伝学的組成を有する異なる種から調製されたマイクロソーム膜は、通常少量の配座異性体を発現する強力なツールを提供する。この場合において、ユニマイクロソーム膜は高度にトランスロケーションコンピテントであることが発見されたが、哺乳動物マイクロソーム膜特に通常少量の種である形態である、PrP、Ctm - Prpのただ1つの配座異性体を発生させた。生化学的アプローチを超えた、このアプローチの潜在的な利点は、不安定性成分が手順により不活性化されている可能性がより少なく、そして異なる膜中の明確な部分的活性の存在により、多数の成分を区別することができることである。また、霊長類の生物の組織からの膜調製物は、少なくとも最初のスクリーンにつ

いて、いっそう原価効率がよく、陽性の結果はいっそう高価な、生化学的に純粋な試薬で確認される。

【0124】

分画し、再構成されたプロテオリポソームの調製を提供する、新規なプロトコルは、比較的費用のかからない、イオン交換クロマトグラフィーに対して適合性である洗浄剤を使用し、ConA消耗再構成において最初に同定された活性成分、ならびに初期の同定がConA貫流のそれ以上の分画を必要とする活性成分をさらに分画することができる。本発明において提供される手順の他の新規な利点は、主要な努力を払わないで、新規なTrAFの初期のスクリーニングを簡単に実施できることである。これにより、いくつかのTrAF活性成分は2以上の成分を含むことができ、そして、ある場合において、過剰の1つの成分が他の成分の欠如を部分的に補償することができる。

【0125】

本発明を理解を明瞭とする目的で例示および実施例により多少詳細に説明したが、本発明の精神から逸脱しないで種々の変化および変更が可能である。ここにおいて引用したすべての参考文献は、それらの全体において、引用することによって本明細書の一部とされる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

第1図は、PrPシグナル配列を置換するトポロジーに対する効果を示す。第1図(A)は、野生型PrP、PrI - PrP、および L - PrPの略線図を示す。ボックスは、PrP成熟領域に融合した、PrP、プレプロラクチン、およびプレ - ベータ - ラクタマーゼからのシグナル配列を表す。第2図(B)は、PrP、PrI - PrP、および L - PrPのトポロジーを示す。各構築物のin vitro翻訳およびトランスロケーション反応からのミクロソームを沈降により単離し、ゲルの下に示すように1%トリトンX - 100の存在または非存在下にプロテイナーゼK (PK) を使用する消化のために等しいアリコートに分割した。1つのアリコートを未処理のままにした。PrPの3つのトポロジー的形態は、洗浄剤の非存在下にPKで消化すると、明確なサイズのバンドを生じた (Hedge他 (1988a) Science 279 : 827 - 834)。各バンドの位

置は、それぞれのトポロジーの線図的表示と一緒に、ゲルの左に記載されている。

PrI - PrPのシグナル配列の切断は非効率的であり、シグナル切断種およびシグナル非切断種の両方により^{sec}PrPおよび^{Ntm}PrPは表わされる。各構築物についての^{Ctm}PrPトポロジーにおける転位した鎖の百分率は3回のこのような実験から定量され、(C) (平均 + / - SEM) で示される。

【図2】

第2図は、ターゲッティングの反応速度がPrPトポロジーに影響を及ぼさないことを示す。第2図(A)は、x軸上に示すように変化量のミクロソームの存在下に翻訳されたPrPを示す。トポロジーについてのタンパク質分解アッセイ後、オートラジオグラフを定量して、シグナル切断された全翻訳産物の百分率(黒塗り正方形)および^{Ctm}PrPトポロジー中の転位した鎖の百分率(白抜き円)を決定した。第2図(B)は、75mMのATAを使用する5分における開始阻害により同期化されたPrPの翻訳反応を示す。食い違い間隔(x軸上に示すように)において、アリコートを取り出し、ミクロソームを添加し、ターゲッティングおよびトランスロケーションを30分間進行させた。トポロジーおよびシグナル切断を決定し、第2図(A)におけるようにプロットした。第2図(C)は、ミクロソームの存在(白抜きバー)または非存在(陰影をつけたバー)下に翻訳された、223マーのPrPをコードする、StuIトランケートドmRNAを示す。5分後、それ以上の開始はATAにより阻害され、30分において、ミクロソームを欠如する試料にミクロソームを添加し、両方の反応をさらに30分間インキュベートした。次いで新生鎖を10mMのEDTAでミクロソームから解放させた。前述したように、シグナル切断およびトポロジーを評価し、定量した。

【図3】

第3図は、シグナル配列がリボソーム - 膜連結に影響を及ぼすことを示す。第3図(A) : プレプロラクチン(PrI)、プレ - ベータ - ラクタマーゼ(L)、L - PrIおよびPrI - LについてのトランケートドmRNAを翻訳し、転位させ、そしてこれらの反応からのミクロソームを沈降により単離した。各試料の1つのアリコートを未処理のままにし、PKを残部に添加した。PrIおよびL - PrIをPrull

においてランケートした。LおよびPrI - LをHpaIIにおいてランケートした。これらの構築物のアミノ酸サイズを示す。第3図(B) : PrI - PrP、野生型PrP、およびL - PrPをBstXI (野生型PrPについて61aa)、NdeI (113aa)、XbaI (135aa)、またはHincII (180aa)においてランケートし、第3図(A)におけるようにタンパク質分解により分析した。PKによる消化から保護された物質の百分率を示されたオートラジオグラフのデンストメトリー定量により測定し、各試料の下に記載する。図面は右においてシグナル配列(白抜きボックス)およびトランスメンブランドメイン(灰色ボックス)の両方のリボソームに関する位置を表す。

【図4】

第4図は、TRAM依存性からのトポロジの解離を示す。第4図(A) : 構築物PrP、PrP_(R2 / 3)、PrP_(D2 / 3)、PrP_(R4 / 5)、およびPrP_(D4 / 5)のシグナル配列。各構築物におけるアミノ酸変化に下線が引かれており、そしてシグナル切断部位は矢じり印で示されている。第4図(B) : 第4図(A)に示す構築物を使用して翻訳およびトランスロケーションをプログラミングし、そして生ずるトポロジを第1図Bにおけるようにタンパク質分解により分析した。^{C1m}PrP合成の百分率をオートラジオグラフのデンストメトリーにより定量し、各構築物について示す。各構築物のシグナル配列をx軸上に示す。PrI - PrPおよびL - PrPについて^{C1m}PrP合成を比較のために示す。第4図(C) : 第5図Aに示すPrPシグナル配列の突然変異体をプロラクチン成熟領域に融合した。プロラクチン成熟領域に融合した、プレプロ - アルファ因子(依存性)およびプレプロラクチン(独立性)のシグナル配列を、それぞれ、TRAM依存性およびTRAM独立性のシグナル配列として使用した(Vogt他(1996) J. Cell. Biol. 134 : 25 - 35参照)。精製されたTRAMを含有するかまたは欠如するConA消耗プロテオリポソーム(実験手順に記載されているように調製した)中で、構築物を翻訳し、転位した。各反応からのアリコートを取って置いて、翻訳効率が両方の型のプロテオリポソーム中で同一であった。物質の残部を0.5mg/mlのPKで処理し、抗タンパク質抗体で免疫沈降させた。TRAMを含有する膜に関してTRAMを欠如するプロテオリポソーム中のプロテアーゼ保護された物質の減少百分率として、ここにおいて示す、TRAM依存性を測定した。

【図5】

第5図は、シグナル配列とTMドメインとの間の関係を示す。第5図(A)：構築物PrP_(AV3)、PrI - PrP_(AV3)、および L - PrP_(AV3)を、正確に第1図Bにおけるように、翻訳し、転位させ、タンパク質分解によりトポロジーについて分析した。各トポロジー形態の移動を右に示す。第5図(B)：構築物PrP_(G123P)、PrI - PrP_(G123P)、および L - PrP(G123P)を、正確に第1図Bにおけるように、翻訳し、転位させ、PKによりトポロジーについて分析した。^{s.e.c}PrPのみが観測され、その移動を右に示す。第5図(C)：PrP、PrI - PrP_(AV3)、および L - PrP_(G123P)の約180マーをコードするHincIIトランケートドmRNAをマイクロソームの存在下に翻訳し、次いでこれを沈降により単離した。正確に第3図Bにおけるように、リボソーム - 膜連結の状態を検査するPKによるタンパク質分解を実行した。

【図6】

第6図は、PDIとの^{s.e.c}PrPの相互作用を示す。第6図(A)：PrP_(G123P)およびPrP_(AV3)(約180マー)をコードするHincIIトランケートドmRNAを翻訳し、そして膜を沈降により単離した。1つのアリコートをもつDSS(+XL)で処理し、残部を未処理のままにした(-XL)。非架橋物質をゲルの下部に示す。分子量マーカーの移動を右に示す。矢じり印は、PrP_(G123P)に優先的に架橋するほぼ65kDaのタンパク質を示す。第6図(B)：正確に第6図(A)におけるようにPrI - PrPおよび L - PrPをHincIIにおいてトランケートし、処理した。等量の全トランケーション産物を各レーンに負荷した。(A)において見られる65kDaの架橋を矢じり印で示す。第6図(C)：正確に第6図(A)におけるようにPrI - PrPおよび L - PrPをNdeI(約113マー)においてトランケートし、架橋により分析した。第(A)図において見られる65kDaの架橋(黒塗り矢じり印)およびまた優先的にPrI - PrPと形成する60kDaの架橋(白抜き矢じり印)を示す。第6図(D)：PDIpの精製。下記のもの示されている：開始粗面マイクロソーム(RMs)のクーマッシー染色；サポニン処理により抽出されない(ペレット)または抽出されるタンパク質；ConA - セファローズカラムからのサポニン抽出物の貫流(FT)および溶出液；Q - セファローズカラムからのConA溶出液の貫流および溶出液、およびゲル濾過(GF)カラムからのプールしたピーク画分、ほぼ均質へのp65(矢印)の精製を生

ずる。精製の詳細については実験手順を参照のこと。第6図(E) : PrI - PrPおよび - PrPを腓臓(上部パネル)または脳(下部パネル)ミクロソームの存在下に翻訳し、膜を沈降により単離した。1 mMのDSSとの架橋後、新生鎖をリボソームから10 mMのEDTAで解放させ、0.5%のサポニンを添加して内腔タンパク質を抽出した。1つのアリコートを取って置き(レーン1、4)、PD1pに対する抗体(レーン2、5)またはPDI(レーン3、6)を免疫沈降のために残留物質に直接的に添加した。腓臓ミクロソーム中で翻訳されたPrI - PrPはPD1p(黒塗り矢じり印)およびPDI(白抜き矢じり印)に対して優先的に架橋するが、脳ミクロソームにおいてPDI(白抜き矢じり印)に対する架橋のみが観測される。第6図(F) : 約113マーを生ずるようにNdeIにおいてトランケートした、第4図Aからの野生型PrPおよびシグナル配列点突然変異をコードするmRNA、ならびに100マーを生ずるようにMboIIにおいてトランケートした野生型プレプロラクチン(PrI)を、パネル(A)におけるように翻訳し、架橋により分析した。架橋し、10 mMのEDTAで新生鎖を解放した後、0.5%のサポニンを添加し、膜を沈降させ、内腔タンパク質を含有する上清を回収した。矢じり印は^{s°c}PrP特異的内腔架橋を表示する。各構築物のシグナル配列をゲルの下に示す。

【図7】

第7図は、シグナル配列の作用についての仮説的モデルを示す。シグナル配列はリボソーム - 膜連結の状態を決定し、引き続いてこれはPrPの場合において最終のトポロジー的運命に影響を及ぼし、多分転位挙動または他の基質のいっそう微妙な面に影響を及ぼす。各転位の結果の1例を記載する。

【図8】

第8図は、^{Ctm}PrP誘導神経変性の投与量応答を示す。第8図(A) : ERにおける野生型および突然変異PrP分子のトポロジー。各PrP構築物(ゲルの上に示す)をコードするin vitro合成転写物を使用して、ER由来ミクロソーム膜およびグリコシル化の競合ペプチドインヒビターを含有するウサギ網状赤血球ライゼイト細胞不含翻訳反応をプログラミングした。翻訳後、試料を未処理のままにするか、あるいはゲルの上に示すように0.5%のトリトンX-100(「Det」)の非存在または存在下にPKで消化した。全長PrP分子、PK消化により発生したNH₂末端のフラグ

メント (^{125}I -PrPで示す) およびCOOH末端のフラグメント (^{35}S -PrPで示す) を右にマークする。第8図 (B) : 種々のトランスジェニックマウス系統の発現レベル。各トランスジェニックマウスからの10%の脳ホモジネートの変化量を13A5モノクローナル抗体を使用してPrPについてイムノプロットし、ゴールデンハムスターの脳ホモジネートの滴定と比較した。第8図 (C) : Tg [SHaPrP (A117V)_H] (黒塗り円) およびTg [SHaPrP (N108I)_H] (白抜き円) の時間経過。非トランスジェニック対照動物 (破線) およびTg [SHaPrP (KH II)_H] (黒塗り正方形; Manson他 (1994) Neurology 46 : 532 - 537からのデータ) を比較のために示す。第8図 (D) : 方法に記載されているように ^{125}I -PrPおよびPrP^{S^c}についての種々のトランスジェニックマウスおよびゴールデンハムスター (ゲルの上に示す) の分析。Tg [SHaPrP (A117V)_H] およびTg [SHaPrP (N108I)_H] 試料は臨床的に病気のマウスからのものであり、そしてTg [SHaPrP (A117V)_L] およびTg [SHaPrP (N108I)_L] 試料は少なくとも600日齢のマウス (疾患の徴候を示さない) からのものであった。「温和な」条件下にPKに対して耐性であるPrPのフラグメント (^{125}I -PrPで示す) は、Tg [SHaPrP (A117V)_H] およびTg [SHaPrP (N108I)_H] 試料においてのみ見られる。いずれの試料においても、PK耐性PrP^{S^c}は観測されなかった。

【図9】

第9図は、 ^{125}I -PrPとPrP^{S^c}との間の関係を示す。第8図 (A)、(C)、(E) : Sc237ハムスタープリオンの接種後における、種々のトランスジェニック系統における病気発生の時間経過。第9図 (B)、(D)、(F) : 種々のトランスジェニック系統における病気時におけるプロテアーゼ耐性PrP^{S^c}の相対レベル。方法に記載されているような「苛酷なPK」条件および等量のSDS - PAGE分離した各試料を使用して、各系統の複製試料を消化した。13A5モノクローナル抗体を使用するイムノプロットングにより、PrP^{S^c}の特徴を示すC末端のPrP27 - 30フラグメント (括弧で示す) を検出した。未消化の、全長PrPの位置を星印で示す。第9図 (G) : Sc237プリオンの接種後の病気時に蓄積したPrP^{S^c}の量に対して、各トランスジェニック系統についてのCtm指標 (表1参照) をプロットした。

【図10】

第10図は、CtmPrP誘導神経変性疾患の伝染の欠如を示す。末期的に病気のTg [SHaPrP (KH 11)_H] マウス (「KH - 11」) および臨床的に正常のTg [SHaPrP] マウス (「wt」) を殺し、脳組織のホモジネートをグラフの下に示すように種々の宿主の脳内に接種した。使用した宿主動物はTg [SHaPrP (KH 11)_L] [「(KH - 11)_L」]、FVB/Prnp^{0/0} (「PrPnull」)、Tg [SHaPrP]、およびゴールデンハムスターであった。個々の動物が死亡した時間 (日) をプロットする。接種それ自体に関係する原因を包含する、すべての原因により死亡をプロットする。実験を約600日後に停止し、この時残留する動物のいずれも神経学的疾患の徴候または症状を示さなかった。各実験は、試験すべき3匹の別々の動物から調製したイノキュラムを注射した10匹の宿主動物の3組を表す。我々の動物ケア設備において、ハムスターは日常的にほぼ200~400日間生きるが、マウスは600日間より長く生き続けることに注意すべきである (データは示されていない)。

【図11】

第11図は、PrP^S蓄積の時間経過間の^CtmPrP発生を示す。第11図 (A) : 実験表示の略図。SHaPrPおよびMoPrP (それぞれ、陰影をつけた円および白抜き円で表す) の両方を発現する二重トランスジェニックマウスに、RMLマウスプリオン (クロスハッチの正方形) を接種する。経時的に、宿主MoPrP^CはMoPrP^Sに変換され、蓄積する。この時間経過間に、HaPrPは種バリアーのためにHaPrP^Sに変換されず、したがって^CtmPrPについてアッセイする。第11図 (B) : RMLの接種後の種々の時間 (週) におけるマウス中の全PrP^SおよびSHaPrP^Sの相対量。「苛酷なPK」条件を使用してホモジネートを消化し、PNGアーゼで処理し、SDS - PAGEにより分析し、R073ポリクローナル抗体 (全PrPを検出するため) または3F4モノクローナル抗体 (SHaPrPについて選択的にプロービングするため) でイムノプロットングした。レーン2および11 (これらは1/4を含有する) およびレーン3および10 (これらは1/10を含有する) を除外した、各レーンにおいて等量のホモジネートを分析する。第11図 (C) : RMLの接種後の種々の時間におけるハムスター^CtmPrP (34maを使用して選択的に検出した) の相対量。各バーは3回の測定の平均 ± SEMを表す。

【図12】

第12図は、プリオン疾患の病原論の3段階モデルを示す。段階IはPrP^Sの形成および蓄積である。これは接種または突然変異したPrP^CのPrP^Sへの自発的変換により開始することができる。段階IIは、^{Ctm}PrPの発生に関する事象を含んでなる。これらの事象は、蓄積したPrP^Sにより現在未知の工程（疑問符を有する点線）においてトランスで、またはPrPのある種の突然変異体によりシスで影響を受けることがある。段階IIIは、^{C^{un}}PrP仲介神経変性に関する事象（現在未知）を表す。これは第1工程としてER後区画への^{C^{un}}PrPの脱出を含むようである。このモデルにおいて、PrP^Sは疾患を引き起こすことができる（^{C^{un}}PrPを介して）が、絶対的に必要ではなく、これに対して^{C^{un}}PrP産生は必要であり、疾患の発生のために十分である。

【図13】

第13図は、モデルの分泌タンパク質シグナル配列の効率を示す。プレプロラクチン(PrI)、プレ-ベータ-ラクタマーゼ(^{lac})、およびプレ-IgG重鎖(IgG)のための全長mRNAを、イヌ臍臓ミクロソーム膜(RM)の非存在または存在下にウサギ網状赤血球ライゼイト中で翻訳し、そして翻訳された物質の等しいアリコート在未処理のままにするか、あるいは1%のトリトンX-100(det)の存在または非存在下にプロテイナーゼK(PK)で処理した。非処理物質(pPrI、p^{lac}、pIgG)の位置、ならびにシグナル切断した物質(PrI、^{lac})およびグリコシル化物質(IgG-CHO)の位置を示す。

【図14】

第14図は、新生分泌タンパク質がリボソーム-膜連結に対して異なるように作用することを示す。第14図(A)：プレプロラクチンmRNAを連続的位置においてトランケートして、記載する数のN末端のアミノ酸を含有する新生鎖発生させた。シグナル切断タンパク質のアミノ酸数を括弧内に記載する。正確にRutkowski他(A New Role for the Signal Sequence in Translocational Regulations、参照：前の出願60/171,012および60/172,350)におけるように、リボソーム-膜連結の状態をタンパク質分解によりアッセイした。第14図(B)および(C)：^{lac}およびIgG mRNAを示した位置において系統的にトランケートし、(A)におけるようにタンパク質分解により分析した。各パネルについて

、右の絵は鎖成長間の3点の各々におけるリボソーム - 膜連結の状態を描写する。第14図Aの左のパネルのみおよびBおよびCの左および中央のパネルは「開いた」リボソーム - 膜連結を描写するが、第14図Aの中央および右のパネルおよび第14図BおよびCの右のパネル「閉じた」リボソーム - 膜連結を描写することに注意すべきである。

【図15】

第15図：プロラクチン (PrI) およびIgG / PrIをPrull (各タンパク質のシグナル配列および成熟領域の56アミノ酸をコードする) においてトランケートし、イヌ臍臓粗面ミクロソームの存在下に翻訳した。ターゲット鎖を沈降により単離した。1つのアリコートを取って置き、他のアリコートを2mMのBM (PE0) 3 [XL] で処理した。矢じり印は、PrIに対して優先的に架橋するほぼ35kDaのタンパク質を示す。10kDaの非架橋物質はパネルの下部に存在する。分子量マーカーの移動はゲルの左に示されている。

【図16】

第16図：シグナル配列依存的染色体変化のリポーターとしてのグリコシル化。
第16図 (A)：操作されたN末端グリコシル化部位を有する天然プレプロラクチン (PrI)、またはマウスIgG重鎖 (IgG / PrI)、ラット成長ホルモン (GH / PrI)、またはハムスターPrP (PrP / PrI) のシグナル配列に融合したグリコプロラクチンをコードする *in vitro* 転写mRNAを、示すようにイヌ粗面ミクロソーム (RM) の存在または非存在下に、ウサギ網状赤血球ライゼイト系中で翻訳した。また、グリコシル化の競合インヒビターをいくつかの試料に添加した (AP)。翻訳後、試料を取って置くか、あるいは1%のトリトンX - 100の存在または非存在下に0.5mg / mlのプロテイナーゼK (PK) と0 において30分間インキュベートした。次いで反応物をSDS - PAGE上に展開し、オートラジオグラフィーにより可視化した。3種のプロラクチンを示す：シグナル切断し、転位させ、グリコシル化したプロラクチン (PrI - CHO)；非シグナル切断のプレプロラクチン (pPrI)；およびシグナル切断し、転位させた、非グリコシル化プロラクチン (PrI)。第16図 (B)：オートラジオグラフ、例えば、第16図 (A) に示すオートラジオグラフを走査し、デンストメトリー的に解析することによって、各構築物についてグリコシ

ル化を達成するプロラクチン鎖の百分率を3回実験から定量した。第16図(C) : それ自身のシグナル配列を有するか、あるいはラット成長ホルモンまたはマウスIgG重鎖のシグナル配列を有するグリコプロラクチンをコードする発現プラスミドで、COS-1細胞を一時的トランスフェクトした。比較のため、グリコシル化部位を欠如する同一構築物をまたトランスフェクトした(-CHO)。無血清無メチオニン培地中で細胞を45分間前インキュベートした後、100 μ Ciの 35 S-メチオニン/システイン混合物を細胞培地に添加し、細胞を1時間標識化した。これらの細胞からの培地のアリコートがSDS-PAGE上に直接展開した。グリコシル化形態および非グリコシル化形態の両方のタンパク質をパネルの右に示す。グリコシル化GH/PrIおよびIgG/PrIは明瞭に可視であるが、グリコシル化天然プロラクチンは観測されない。

【図17】

第17図は、トランスロケーションの成功に導く連結領域の要件を示す。第17図(A) : プロラクチン成熟領域をそれ自身のシグナル配列(PrI-PrI)に、またはプレ-ベータ-ラクタマーゼ(L-PrI)またはプレ-IgG重鎖(IgG-PrI)のシグナル配列に、シグナル配列切断部位において融合した。これらの基質の全長mRNAをミクロソーム膜の存在下に翻訳し、第17図Aにおけるように分析した。各基質について、プロセッシングし、転位した状態を達成した全鎖の百分率を定量することによって、トランスロケーション効率を決定した。各バーは3回の試験からのトランスロケーションの平均(+/-SEM)を表す。第17図(B) : PrI-PrI、L-PrI、およびIgG-PrIをコードするmRNAをPruIIまたはAfIIIにおいてトランケートした。成熟プロラクチンからのアミノ酸数を括弧で示す。沈降した鎖を第15図Bにおけるようにタンパク質分解により分析して、リボソーム-膜連結を評価した。3回の試験におけるPKに対する各基質の保護の平均百分率をy軸にプロットする。第17図(C) : IgG-PrIキメラの略図。増加する長さのアミノ酸のプレ-IgG重鎖または非IgGストレッチをプロラクチン成熟領域に対して融合させた。シグナル配列の切断部位を矢じり印で示す。IgGからの配列を白抜きボックスで表し、PrI成熟領域をバーで表し、そして非IgG対照配列をハッチングを施したボックスで表す。PrIシグナル配列を陰影をつけたボックスで示す。各構築物

の下の番号は、プレ-IgG重鎖、プレプロラクチンシグナル配列 (PrI - PrI)、または上のIgG配列 (IgG - PrI (i - 132) Stufferのアミノ酸15~132) からのアミノ酸を表し、開始メチオニンをNo.1で示す。第17図 (D) : 第17図 (C) に示す基質をミクロソーム膜の存在下に翻訳し、第17図 (B) におけるように3回の試験からのトランスロケーションの平均百分率について分析する。

【図18】

第18図は、トランスロケーションの調節がコンフォメーションの不均質性に導く方法の略図を示す。ERにおけるタンパク質生合成の3段階の終点をローマ数字で左に示す：I、ターゲティングを含む最も初期の事象；II、トランスロケーションそれ自体の事象；およびIII、最終のフォールドされたタンパク質。段階Iにおけるトランスロケーション調節の4つの形態が第18図 (A~D) に示されている。トランスロケーション調節は、ここにおいて仮定するように、完結された、フォールドされたタンパク質において不均質性を達成する (III参照) 手段を提供する。分子シャペロンを黒塗り卵形で示すが、TrAFをハッチングを施した長方形で示す。第18図 (A) において、トランスロコンは分子シャペロンとして働く。

第18図 (B) において、トランスロコンは、還元性環境において、多分分子シャペロンまたは翻訳後修飾の機構に関連して、新生鎖のフォールディングを開始させる。トランスロコンの内腔ゲートは閉じているが、リボソーム - 膜連結を構成する細胞質側は開いていることに注意すべきである。第18図 (C) において、再び明確な分子シャペロンの絶対的参加で、逆転 - 閉じた細胞質ゲートおよび開いた内腔ゲート - が達成される。最後に、第18図 (D) はTrAFの作用がタンパク質トポロジーならびにコンフォメーションを変化であることができることを示す。一次タンパク質フォールディングは、これらの考えに対して独立である。二次タンパク質フォールディングは、三次レベルのタンパク質フォールディングの複雑度を構成するTrAF作用に依存して、異なる方法で発現する (注：第18図B対Cにおける異なる分子シャペロン)。タンパク質フォールディングの一次複雑度は、例えば、環境または他の条件の変化に応答して、細胞が図面 (A~D) を選択できるようにするシグナリング経路による、TraAFの調節のためである。

【図19】

第19図：以前に記載されたように（Lopez他、Science（1990）248：226 - 229）ジメチルスルホキシドで分化を誘導する前および誘導した4または6日後にマウス赤白血球細胞から調製した細胞質ゾル抽出物の存在下に、PrP cDNAを転写し、翻訳した。翻訳反応間に³⁵Sメチオニンが存在すると、放射能標識化した新しく合成したタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム（SDS - PAGE）中のポリアクリルアミドゲルの電気泳動およびオートラジオグラフィ（AR）により可視化することができる。活性の1単位は、5 A280u/mlの最終濃度でイヌ腓膵ミクロソーム膜を補充した10 μlの翻訳反応中でsecPrPの利益となるように、PrPトポロジック的形態を変化させるために必要な抽出物の量である。細胞質ゾル抽出物を調製するために、10mMのHepes pH7.5中で細胞を膨潤させた後、細胞を細断して均質化し、100,000 × gにおいて1時間遠心することによって膜を除去した。理解できるように、非分化MEL細胞からの細胞質ゾルはsecPrPを促進する活性に富んでおり、その活性は細胞の経時的分化で失われる。この場合において、異なる終点についていくつかのタンパク質が利用されるとされる細胞質ゾル調節活性のリポーターとして、PrPは働く。第6日の時点からゲル中にグロビンのバンドが存在し、これらの細胞におけるマーカーであるグロビンの誘導が示されることに注意すべきである。

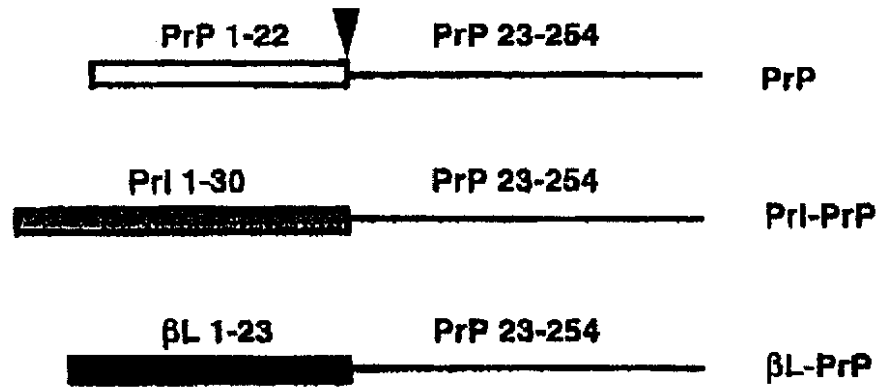
【図20】

第20図：以前に記載されているように、示した源からのミクロソーム膜の存在下に、PrP cDNAの転写および翻訳を実行した。以前に記載されているように、洗浄剤の非存在または存在下に生成物をプロテアーゼで消化した。洗浄剤の非存在下に生成物をプロテアーゼで消化すると、Sec - PrP / Ctm - PrP比をSDS - PAGEおよびARにより容易に評価できることが示される。E = 胚日13のハムスター脳からのミクロソーム膜；N = 新生児ハムスター脳ミクロソーム膜；7d = 出産後7日のハムスター脳からのミクロソーム膜；14d = 出産後14日のハムスター脳からのミクロソーム膜；21d = 出産後21日のハムスター脳からのミクロソーム膜；A = 成体ハムスター脳からのミクロソーム膜；SUE = ウニ胚ミクロソーム膜（これはTrAFを欠如し、したがって糖タンパク質消耗の分画し、再構成したプロテオリポソーム

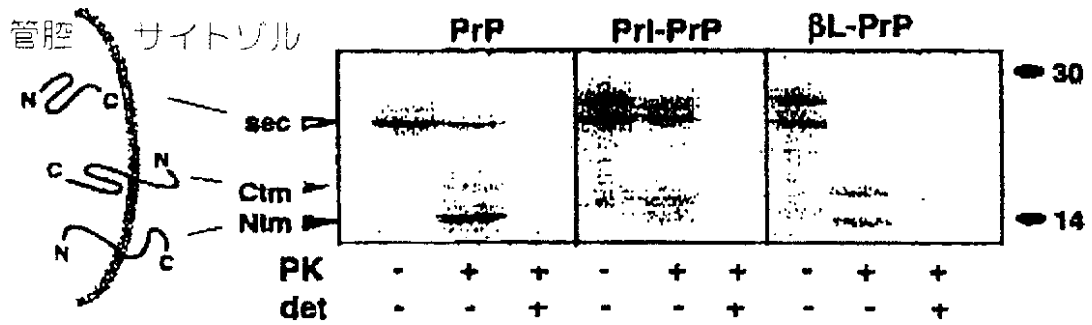
ムに対して匹敵するCtm - PrPをもっぱら発生する (Hegde他、(1998) Mol. Cell 12: 85 - 91)。上の矢印はSecPrPの位置を示す；下の矢印はCtm - PrPを示す。下のグラフは、上の示すレーンの各々についての分泌PrP / 全PrPの比の定量である。異なる組織および種からの膜、および発生の異なる時間における同一組織および種からの膜は、ラジカル的に異なるTrAF活性を有することができ、トランスロケーションがタンパク質生合成の調節の重要な部位であり、かつトランス作用性因子がトランスロケーションの調節に寄与するという仮説と一致することが証明される。この場合において、プリオンタンパク質はTrAF活性のリポーターとしてのみ使用されている。トランスロケーションの調節を見出すことができる、すべての遺伝子に、同一原理が適用される。

【図1】

A



B



C

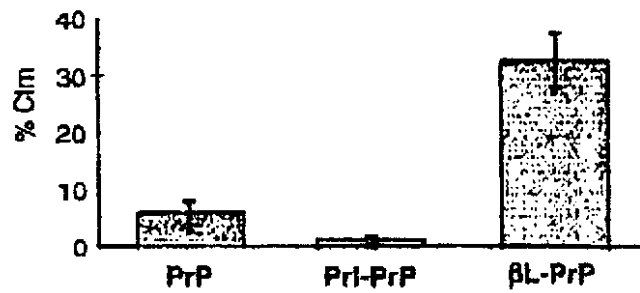


FIGURE 1

【図2】

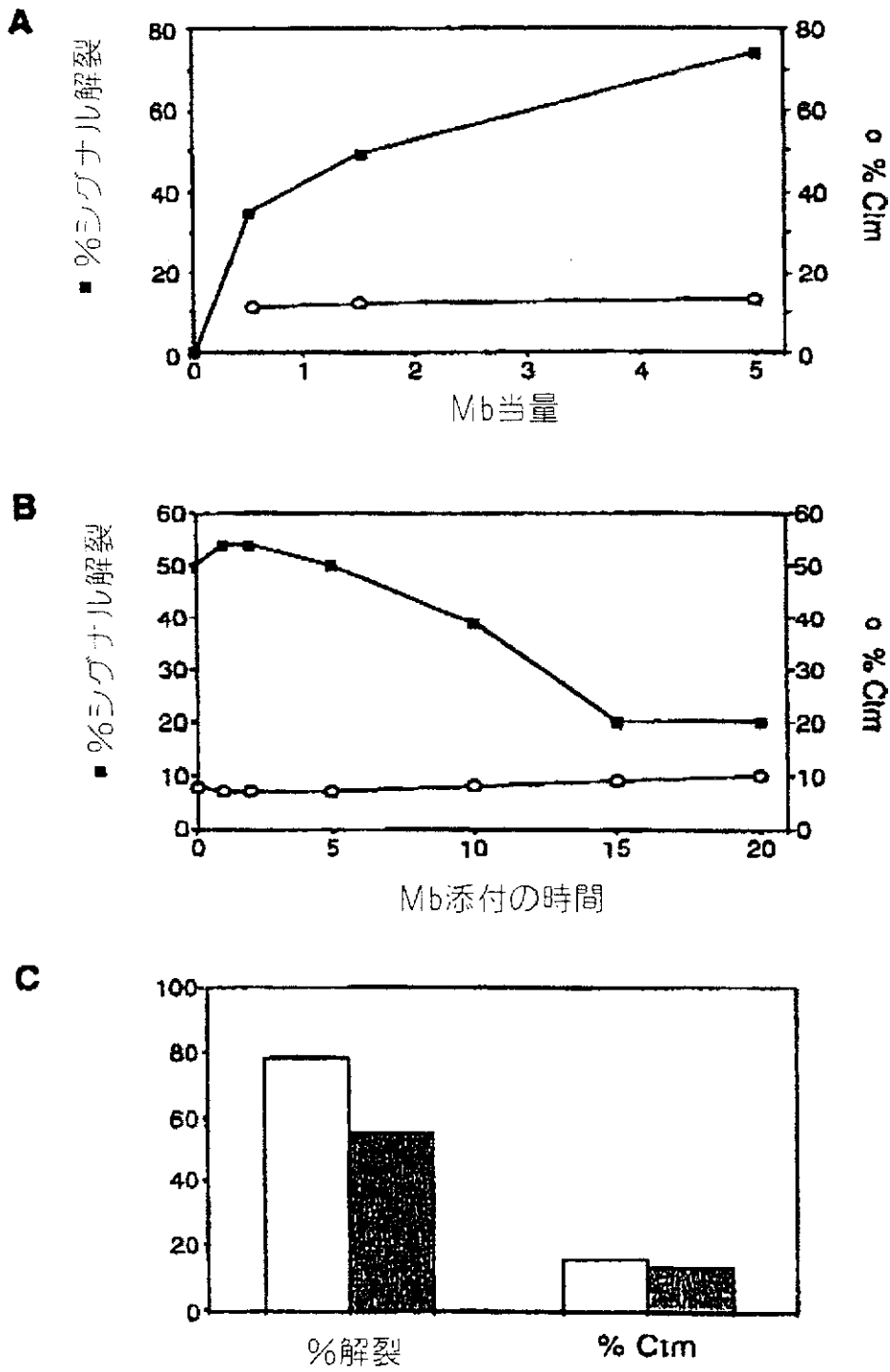


FIGURE 2

【図3】

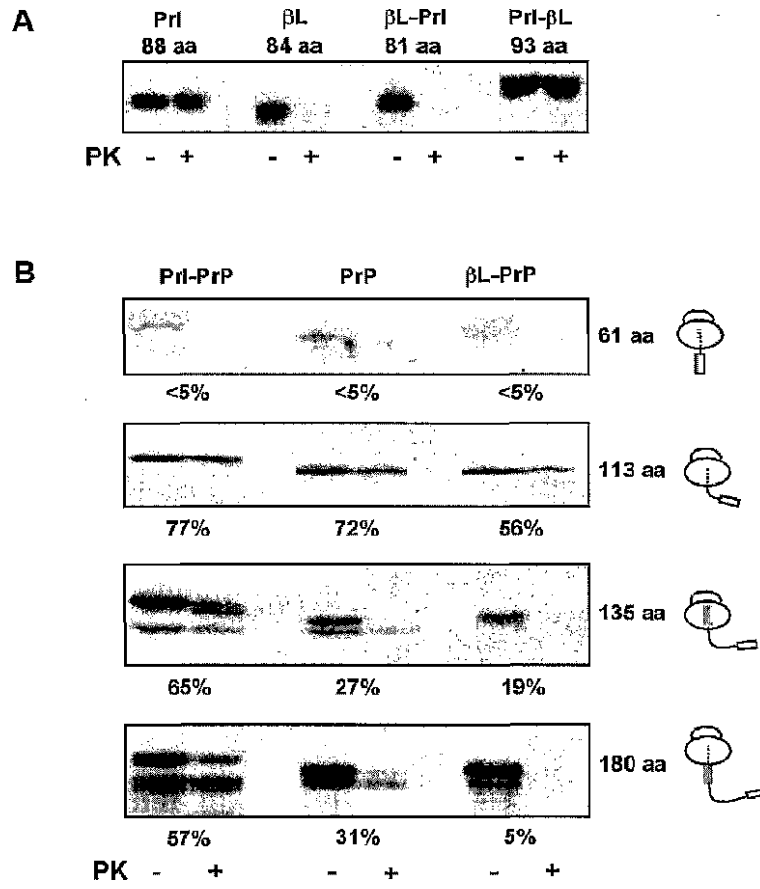


Figure 3

【図4】

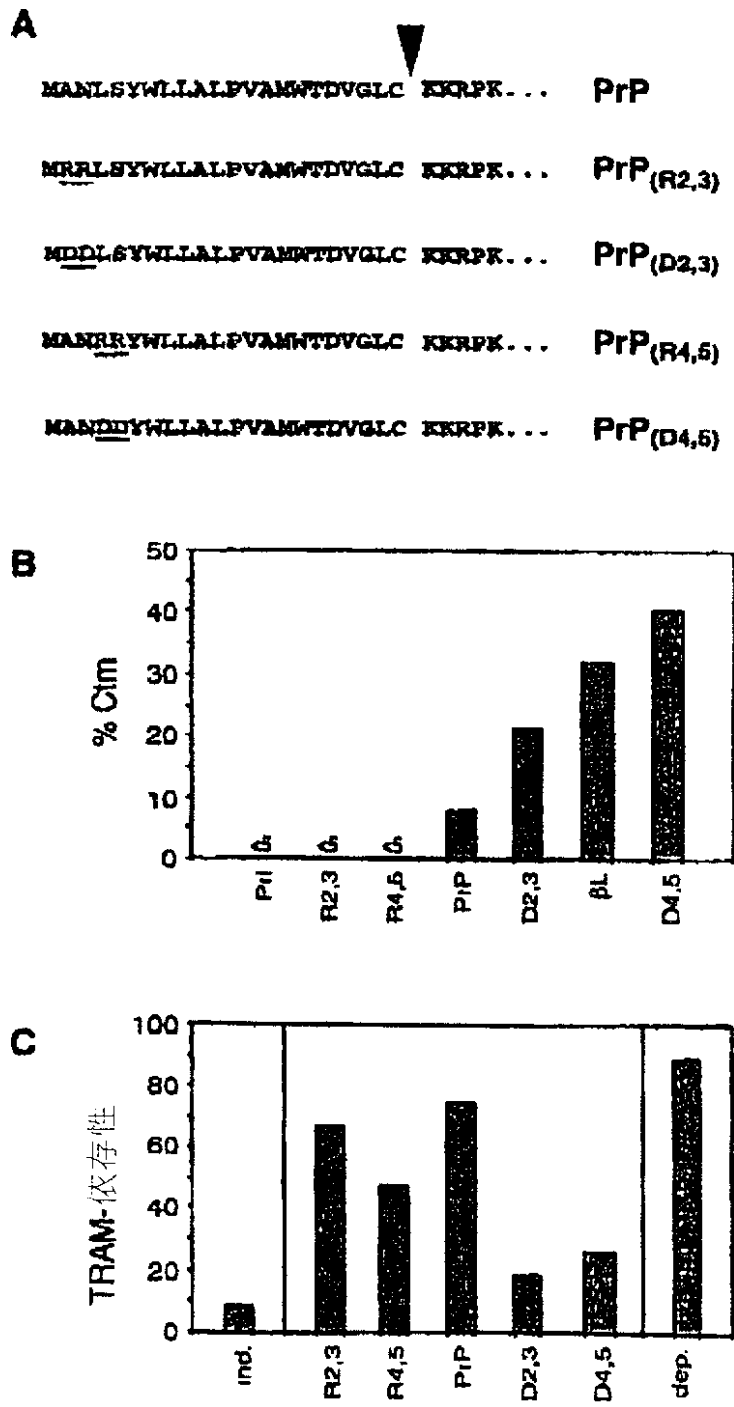


FIGURE 4

【图5】

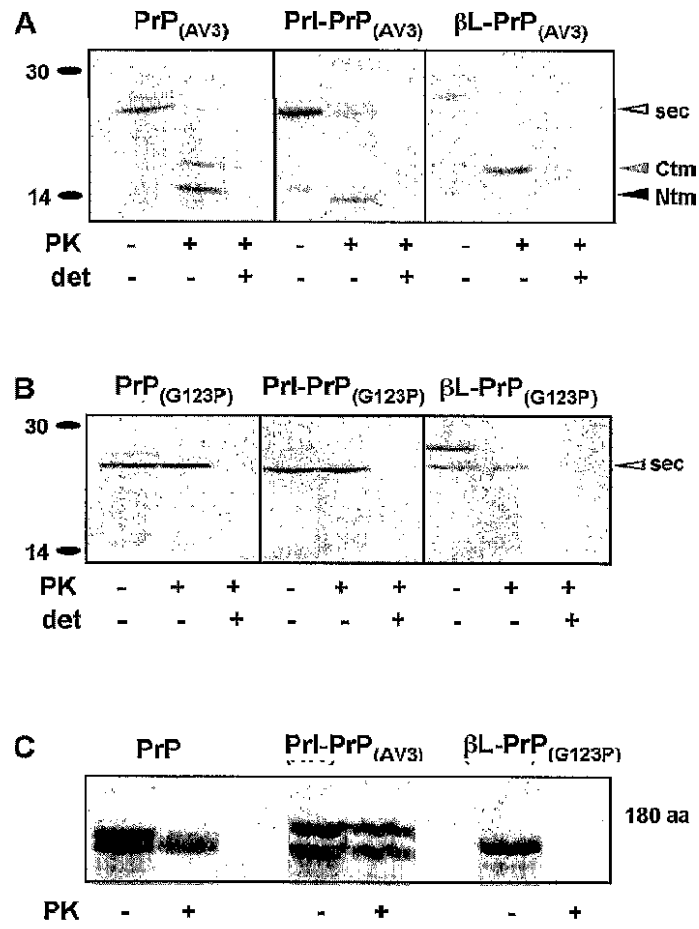


Figure 5

【図6】

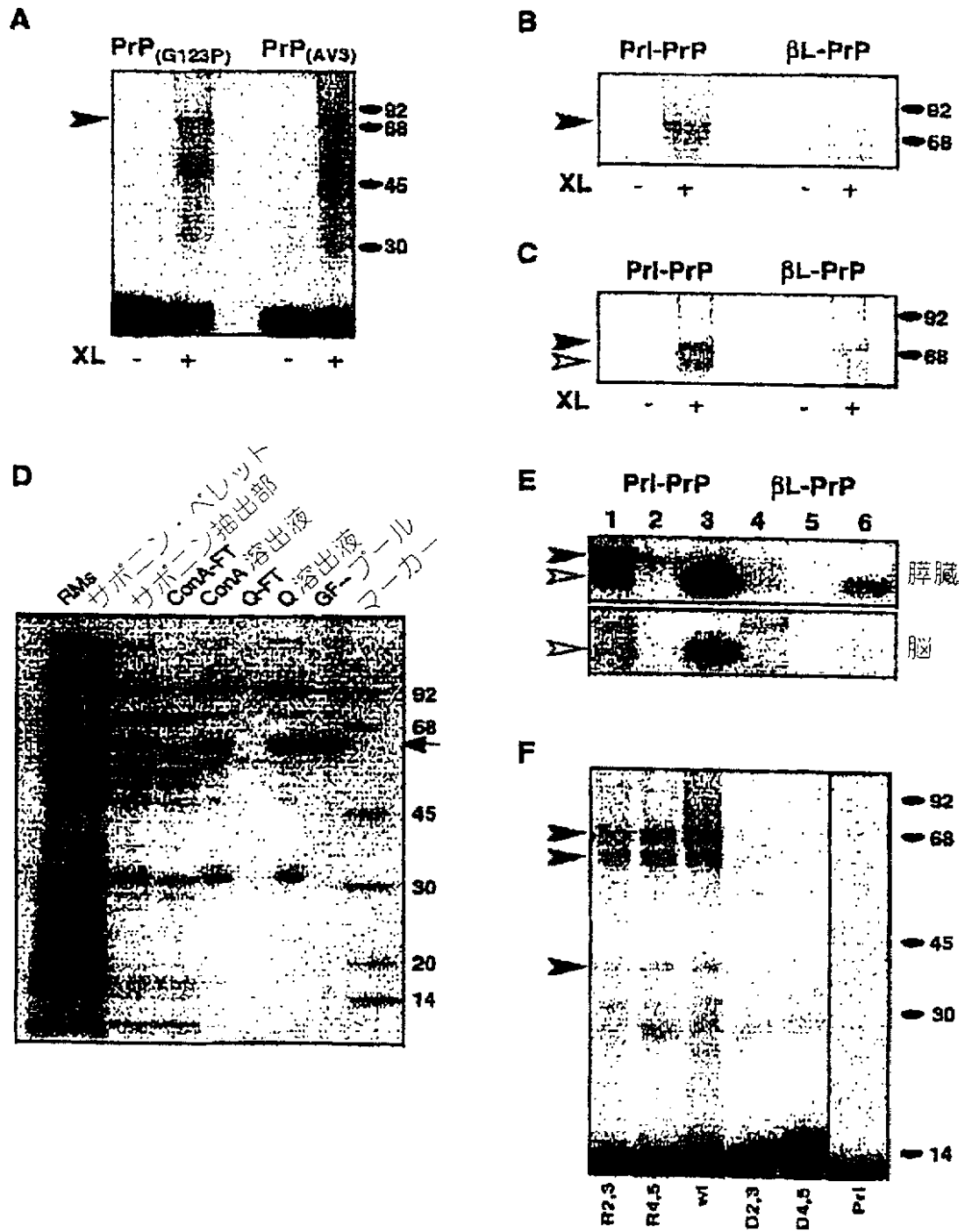


FIGURE 6

【図7】

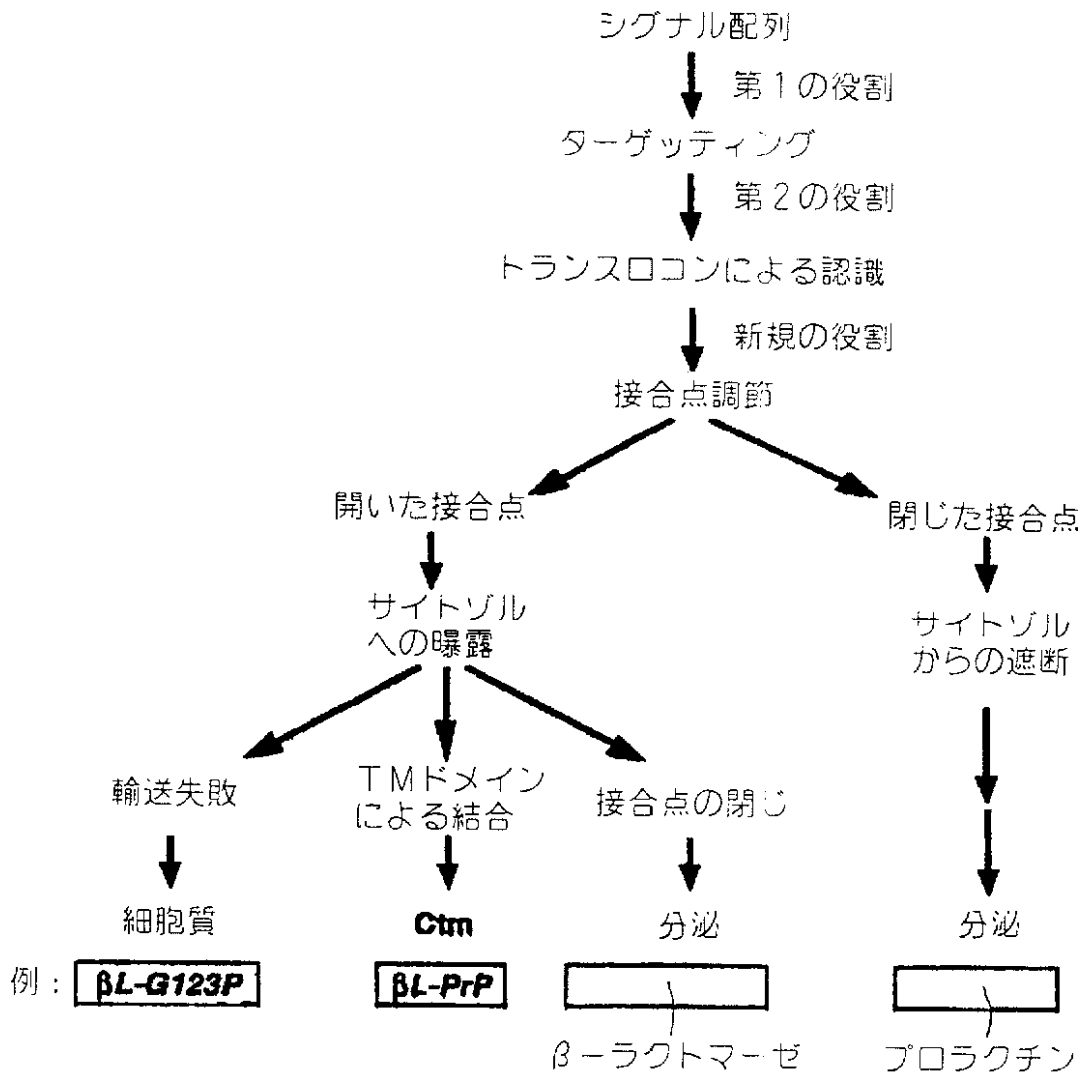


FIGURE 7

【図9】

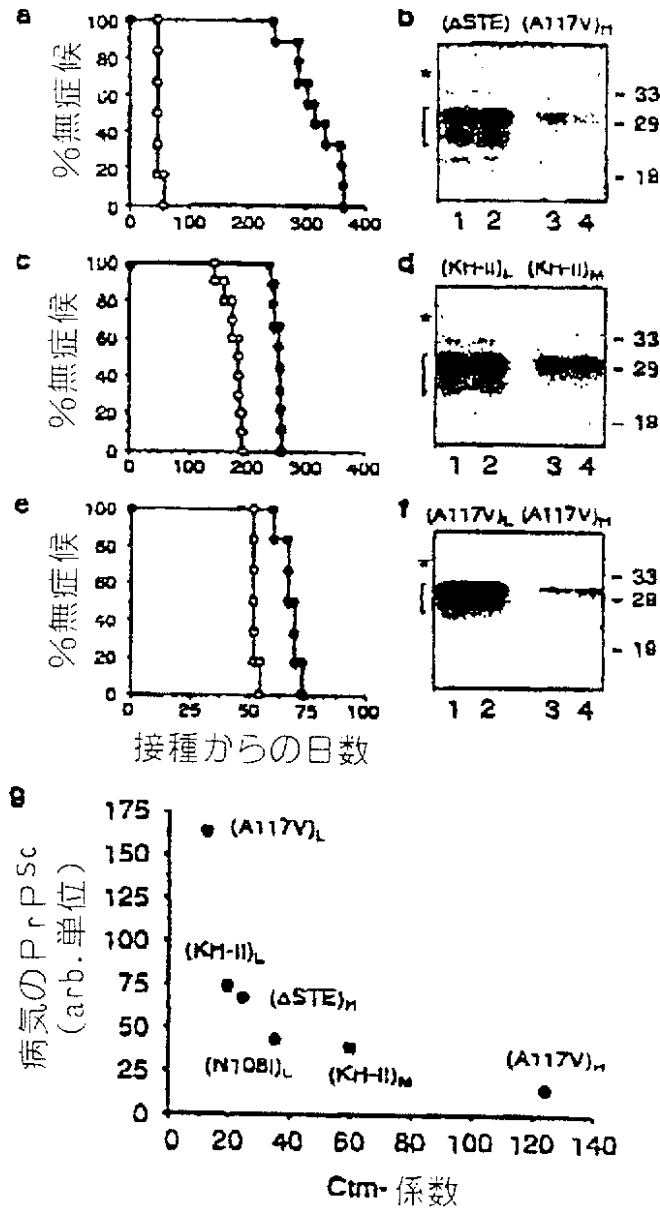


FIGURE 9

【図10】

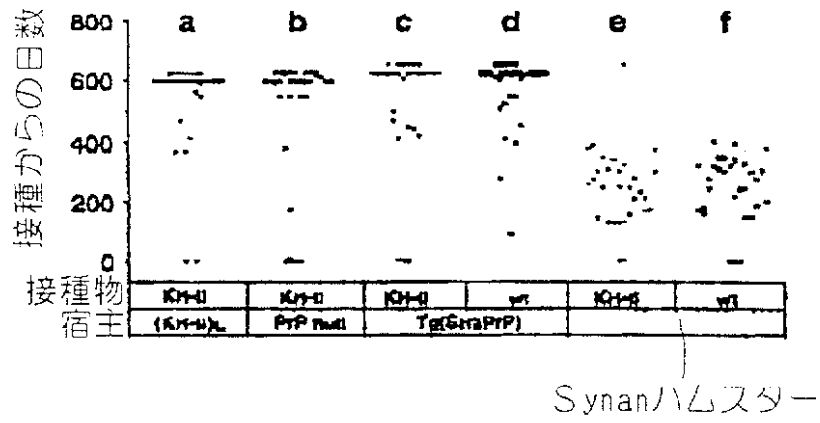


FIGURE 10

【図11】

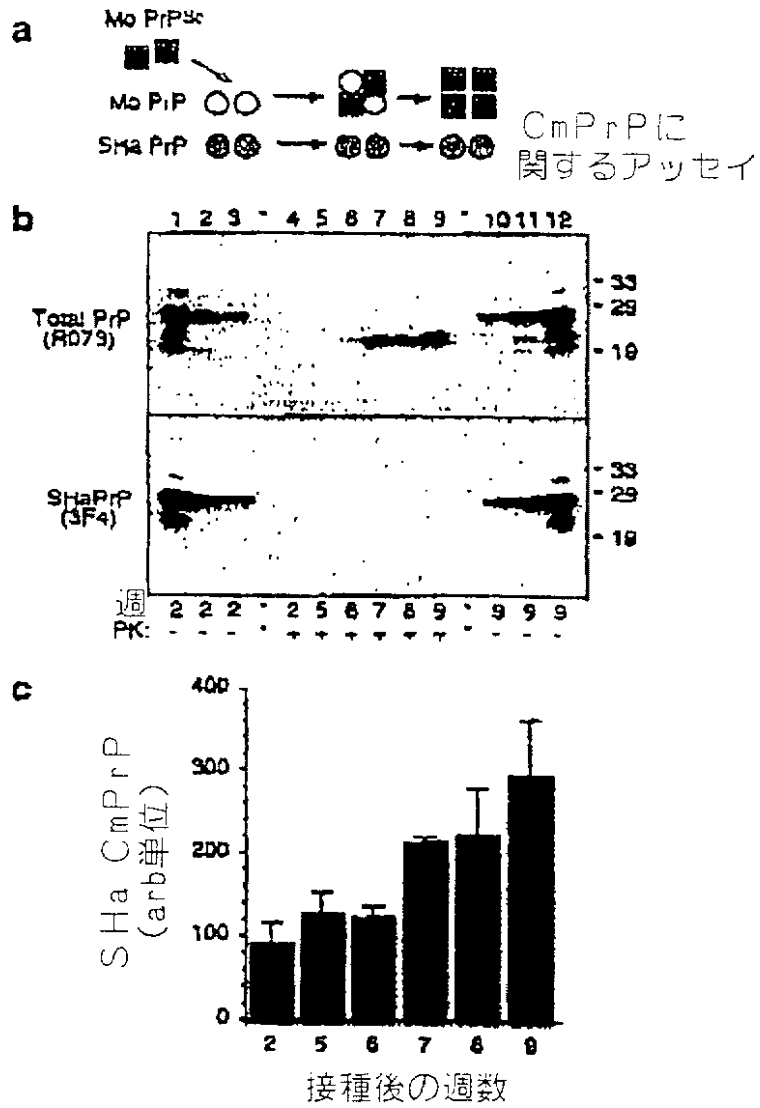


FIGURE 11

【図12】

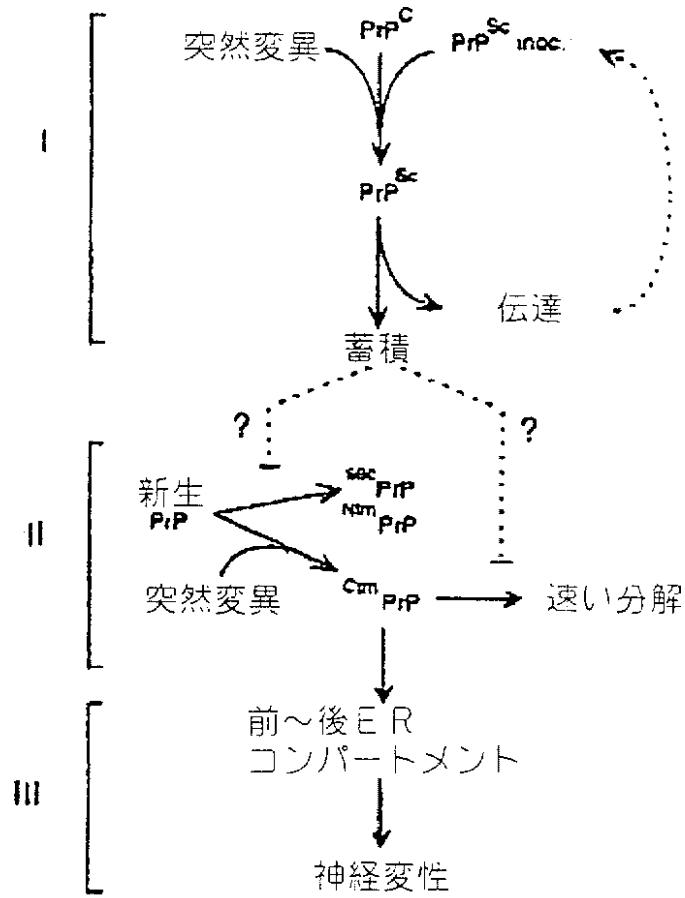


FIGURE 12

【図13】

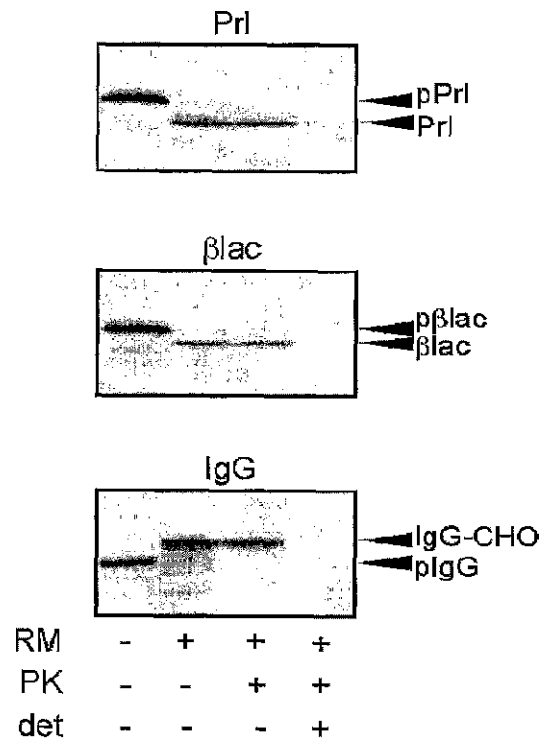


Figure 13

【図14】

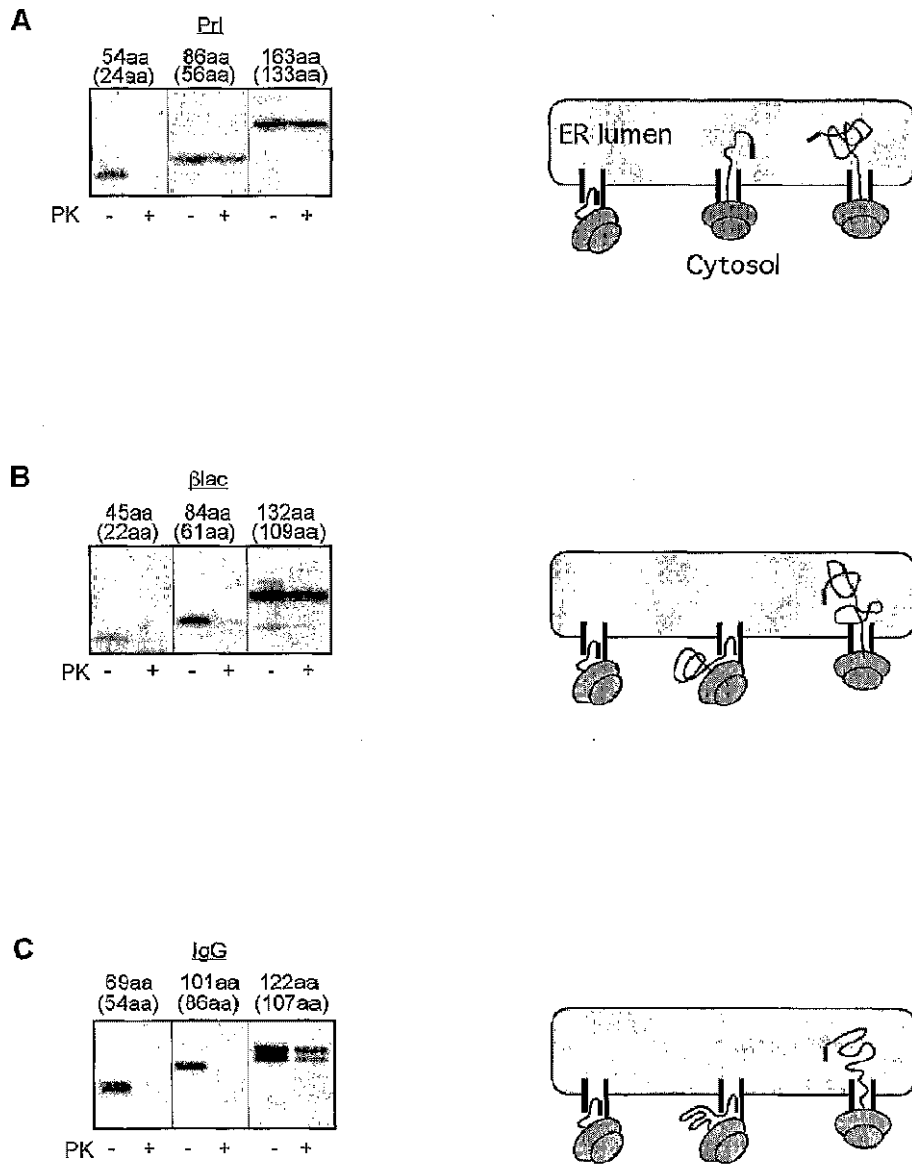


Figure 14

【図15】

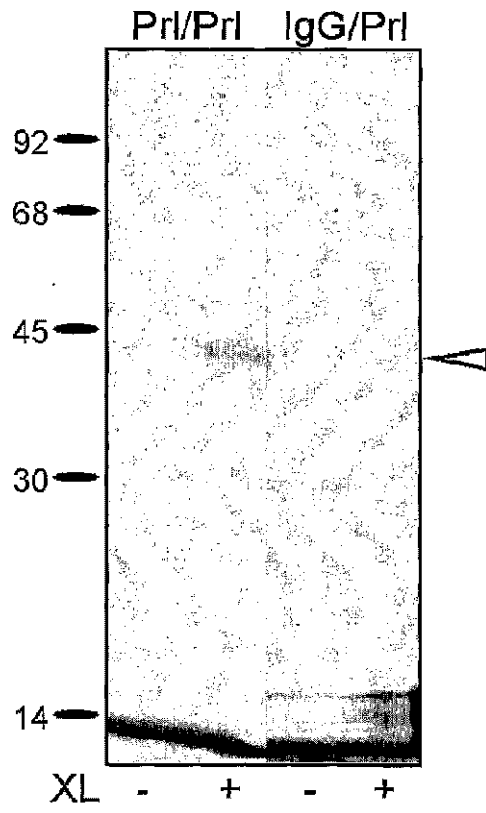


Figure 15

【図16】

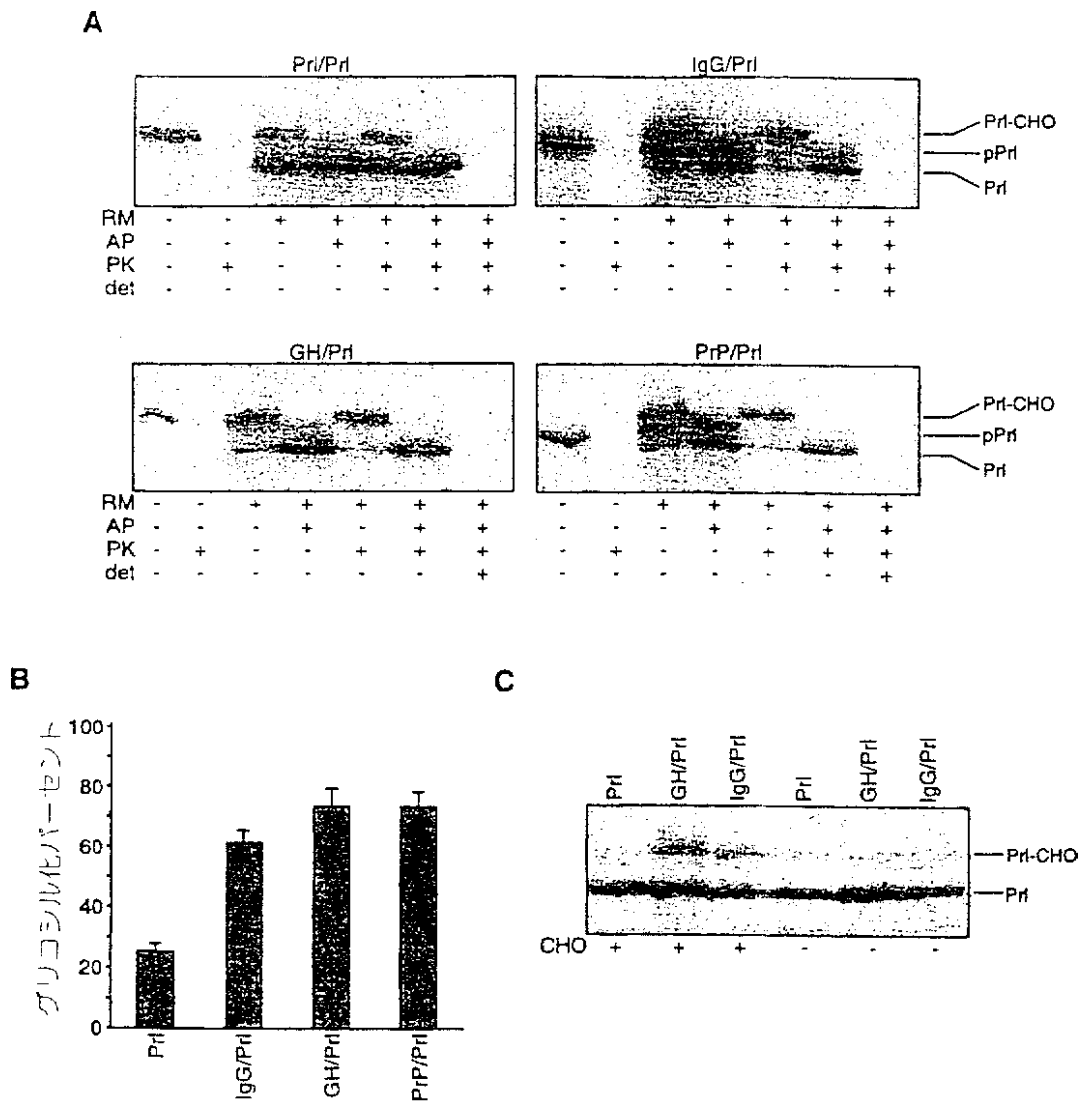
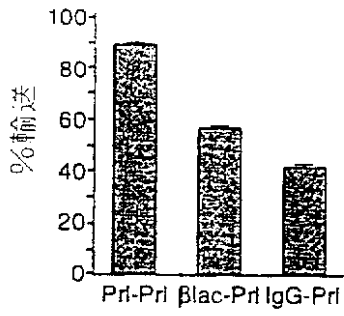


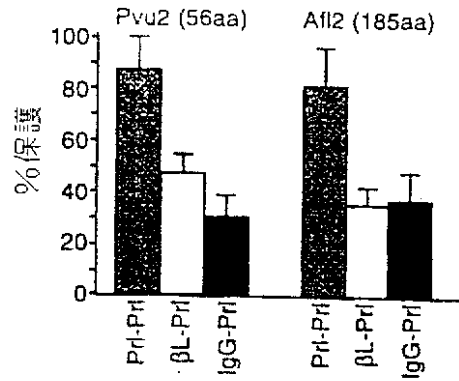
FIGURE 16

【図 17】

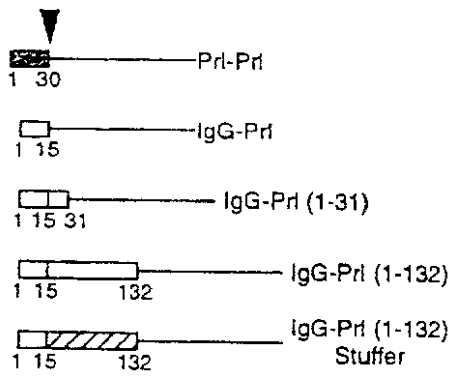
A



B



C



D

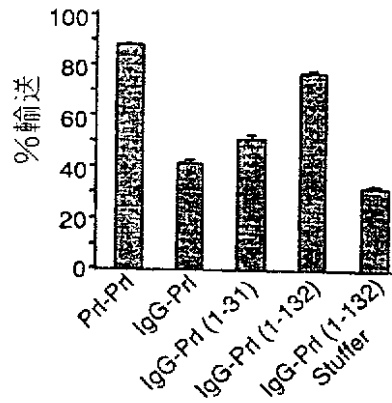


FIGURE 17

【図18】

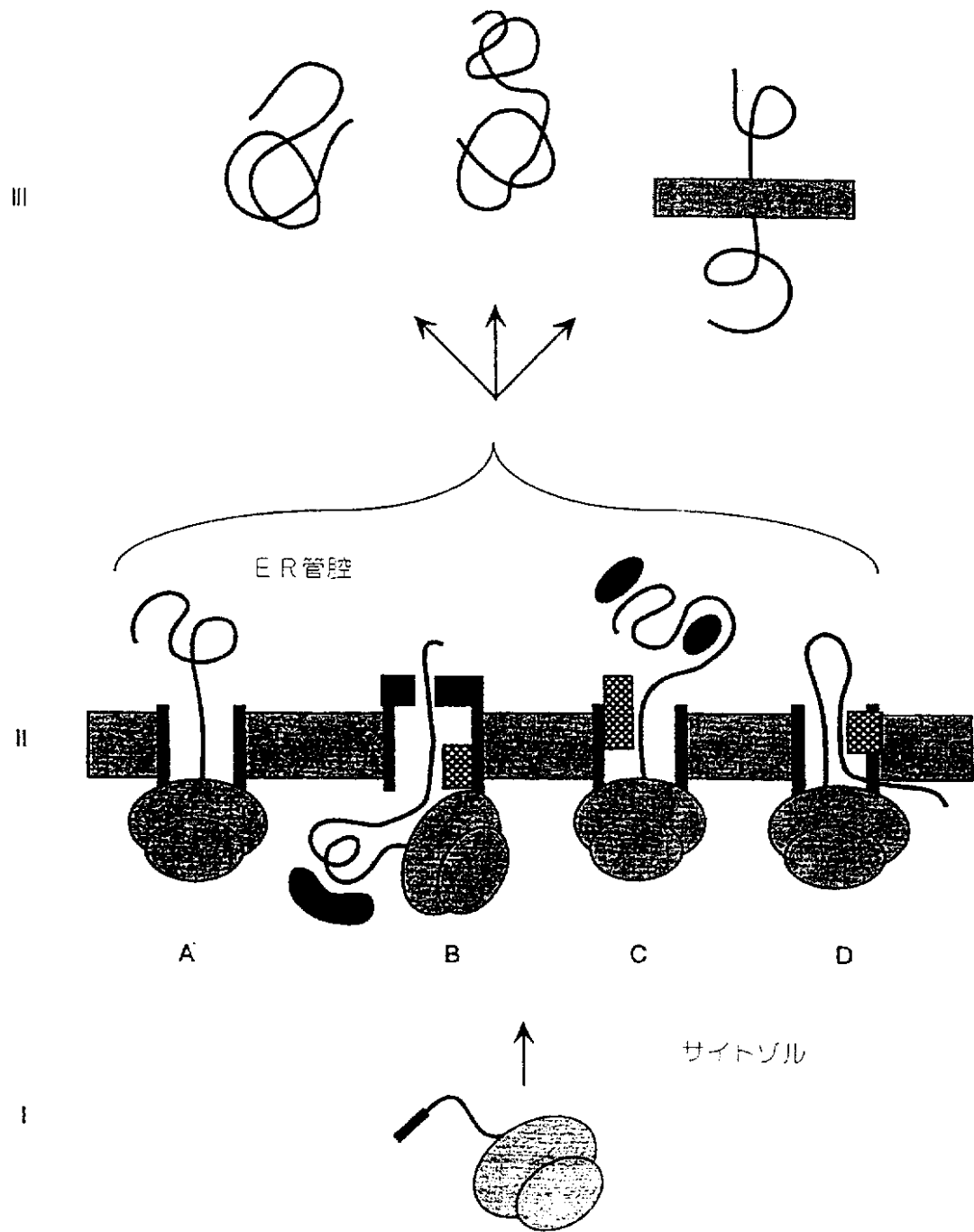


FIGURE 18

【図19】

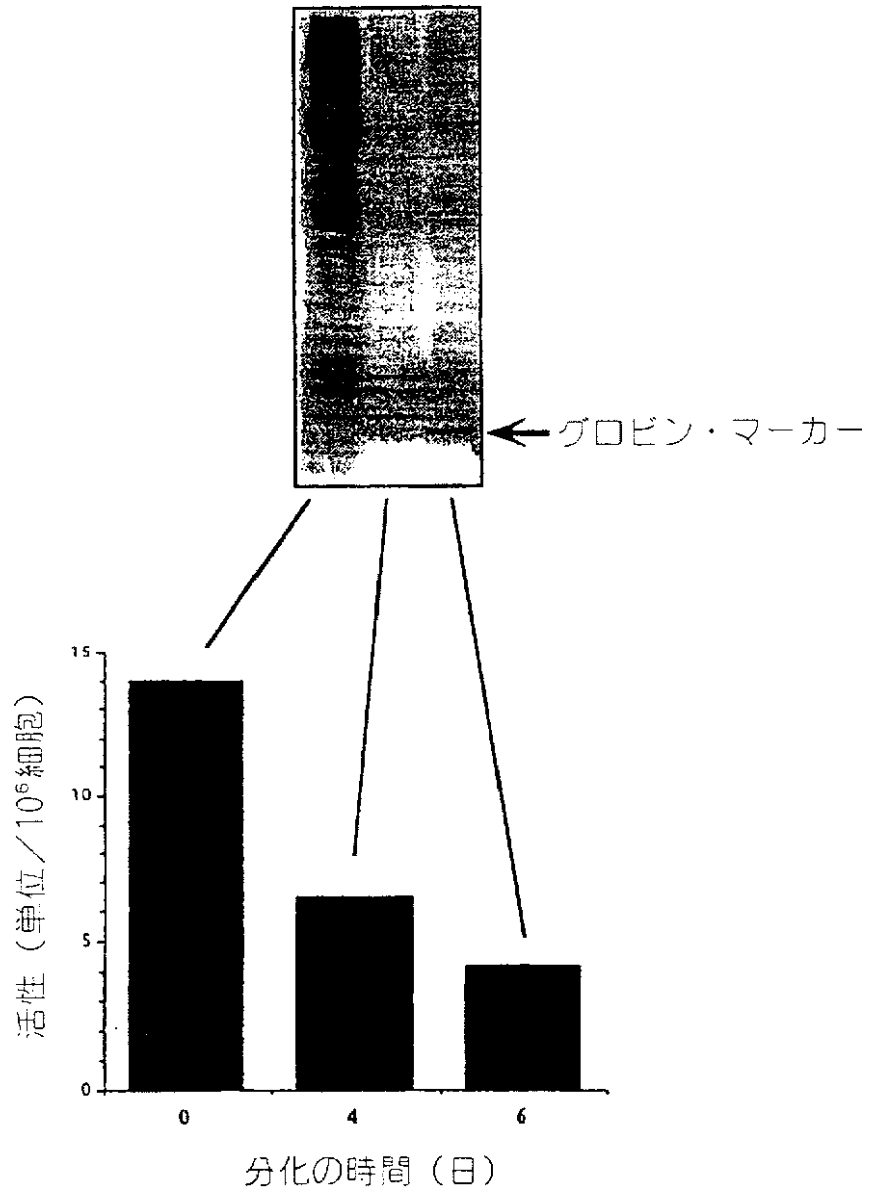


FIGURE 19

【图20】

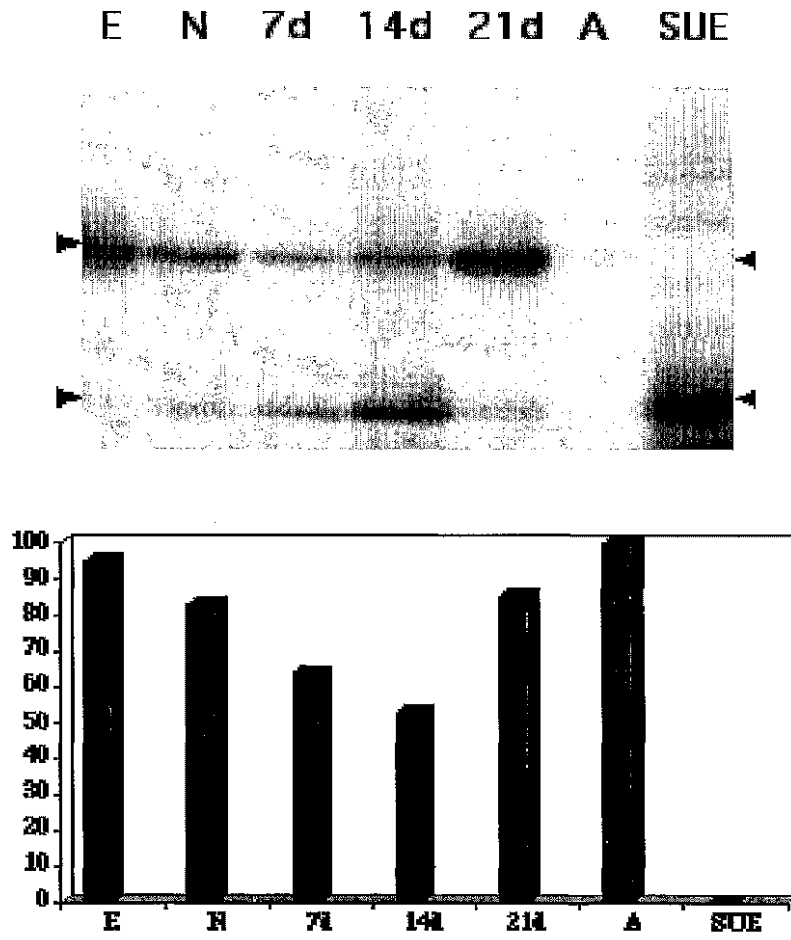


Figure 20

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/34375
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C07K16/18 C07K14/47 C12N15/00 C12N5/00		
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) IPC 7 G01N C12N C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEGDE RAMANUJAN S ET AL: "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 279, no. 5352, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 827-834, XP002172020 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-15, 19-21, 30-42,49
X	LOPEZ C D ET AL: "UNUSUAL TOPOGENIC SEQUENCE DIRECTS PRION PROTEIN BIOGENESIS" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 248, no. 4952, 1990, pages 226-229, XP002172021 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-15, 19-21, 30-42,49
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "B" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 7 August 2001		Date of mailing of the international search report 31 10. 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, P

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No PCT/US 00/34375

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEGDE RAMANUJAN S ET AL: "Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum." MOLECULAR CELL, vol. 2, no. 1, July 1998 (1998-07), pages 85-91, XP002172022 ISSN: 1097-2765 the whole document ---	1-15, 19-21, 30-42,49
X	WO 96 08561 A (CHAUDHURI BHABATOSH ;CIBA GEIGY AG (CH); STEPHAN CHRISTINE (FR)) 21 March 1996 (1996-03-21) the whole document ---	1-15, 19-21, 30-42,49
X	EP 0 861 900 A (ZUERICH ERZIEHUNGSDIREKTION) 2 September 1998 (1998-09-02) the whole document ---	1-15, 19-21, 30-42,49
P,X	HEGDE RAMANUJAN S ET AL: "Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration." NATURE (LONDON), vol. 402, no. 6763, 16 December 1999 (1999-12-16), pages 822-826, XP002172023 ISSN: 0028-0836 the whole document ---	1-15, 19-21, 30-42,49
T	HOELSCHER CHRISTINA ET AL: "Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 16, 20 April 2001 (2001-04-20), pages 13388-13394, XP002172024 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	1-15, 19-21, 30-42,49
A	EBLE B E ET AL: "MULTIPLE TOPOGENIC SEQUENCES DETERMINE THE TRANSMEMBRANE ORIENTATION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 7, no. 10, 1987, pages 3591-3601, XP001010407 ISSN: 0270-7306 abstract -----	1-15, 19-21, 30-42,49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/34375**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 30,31,37,49
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. 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 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. 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. 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.:
see extra sheet invention 1.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-15,19-21,30-42,49

Claims 1-15, 19-21, 30-42, 49 disclose a method for identifying different protein conformers, based on expressing the recombinant protein with different signal sequences.

2. Claims: 16-18

Claims 16-18 disclose a method for identifying the presence of a conformer in a sample, based on detecting altered binding of a biospecific binding member.

3. Claims: 22-25

Claim 22-25 disclose methods of evaluating individual responses to environmental changes associated with a disease state and of screening individuals for susceptibility to a disease associated with Ctm-PrP, based on detecting Ctm-PrP levels in cells from said individuals.

4. Claims: 26-28

Claims 26-28 disclose a method for screening compounds for their effect on the relative amounts of different protein conformers, based on detecting altered amounts of the different conformers in presence of the compound.

5. Claim : 29

Claim 29 discloses a method for determining the relative amounts of the conformers of an endogenous protein, comprising contacting a chimeric host with said agent, wherein said chimeric host is characterized by having a foreign gene encoding said protein from a different species or other than an endogenous gene processed by the same translocational mechanism as said gene encoding said protein; and determining the effect of said agent on said foreign gene as a surrogate for said endogenous gene.

6. Claims: 43-45

Claims 43-45 disclose a method for identifying a change in quantitative distribution of protein conformers, comprising comparing the distribution of conformations in multiple biopsy samples obtained from an animal.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. Claims: 46-47

Claims 46-47 disclose an isolated cell or a recombinant non-human cell comprising one or more conformers of a disease-associated protein other than Ctm-PrP.

8. Claim : 48

Claim 48 discloses an isolated or purified conformer of a disease-associated protein other than Ctm-PrP.

9. Claims: 50-51

Claim 50-51 disclose a chimeric gene comprising an open reading frame encoding a disease-associated protein and a signal sequence other than the native signal sequence.

10. Claims: 52-55

Claims 52-55 disclose an isolated cell or recombinant non-human cell comprising a nascent chain of a disease-associated protein bound to a trans-acting factor or a gene encoding a disease-associated protein wherein a signal sequence of said gene is bound to a trans-acting factor.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 30,31,37,49

Claims 30,31,37 and 49 relate to proteins having an altered conformation, defined by reference to the method of identifying or producing them, namely employing two different signal sequences as claimed in claim 1. The claims cover all proteins having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT only for the different topological forms of prion proteins.

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a complete search over the subject-matter for which protection is sought in claims 30,31,37 and 49 is impossible. Consequently, the search has been restricted to the different topological forms associated with prion proteins..

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/34375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9608561 A	21-03-1996	AU 3521595 A	29-03-1996
		CA 2198263 A	21-03-1996
		EP 0783574 A	16-07-1997
		FI 971034 A	12-03-1997
		HU 76973 A	28-01-1998
		JP 10506271 T	23-06-1998
EP 0861900 A	02-09-1998	WO 9837210 A	27-08-1998
		AU 6498698 A	09-09-1998
		EP 1007700 A	14-06-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	5/10	G 0 1 N	30/88	E
C 1 2 Q	1/02		33/53	D
G 0 1 N	30/88			N
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ルトコースキー, トーマス ディー.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94143
 - 0444, サンフランシスコ, パルナサス
 アベニュー 513, デパートメント オブ
 バイオケミストリー アンド バイオフィ
 ジクス, ユニバーシティ オブ カリフォ
 ルニア, サンフランシスコ

(72)発明者 ヘッジ, ラマヌガン エス.
 アメリカ合衆国, メリーランド 20892,
 ベゼスダ, ビルディング 36, ルーム 1
 ディー-32, ラボラトリー オブ セルラー
 オンコロジー, ナショナル インスティ
 テューツ オブ ヘルス

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA04 DA02 EA04
 FA18 GA11 HA01
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QR32
 QS34
 4B065 AA26X AA90X AA90Y AB01
 AC14 BA02 CA24 CA46
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA45 DA86
 EA50 FA74

专利名称(译)	调节构象和拓扑蛋白		
公开(公告)号	JP2003517313A	公开(公告)日	2003-05-27
申请号	JP2001545853	申请日	2000-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	リングッパビシユワナスアール ルトコースキートーマスディー ヘッジラマヌガンエス		
发明人	リングッパ,ビシユワナス アール. ルトコースキー,トーマス ディー. ヘッジ,ラマヌガン エス.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/62 C12N15/63 C12Q1/02 G01N30/88 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5008 A01K67/0275 A01K2217/05 A01K2227/105 A01K2267/0343 A01K2267/0356 A61K39/00 C07K14/47 C07K2319/02 C07K2319/033 C07K2319/04 C07K2319/61 C07K2319/75 C12N15/625 C12N15/635 C12N15/8509 G01N33/502 G01N33/5047 G01N33/5076 G01N33/5088 G01N33/68 G01N33/6842 G01N33/6845 G01N33/6878 G01N33/6896		
FI分类号	C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N30/88.E G01N33/53.D G01N33/53.N C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA18 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR32 4B063/QS34 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/171012 1999-12-15 US 60/172350 1999-12-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于鉴定未知的新构象的蛋白质的方法和组合物，所述新构象的蛋白质以不同的构象体存在。通过使用嵌合基因将天然信号序列替换为产生构象子的不同信号序列，可以将天然蛋白与嵌合基因的产物进行比较。不同的构象阐明了抗体产生的机理，与天然和不同构象子相关的蛋白质，测定生理样品中不同构象子的存在的方法，特别是对于构象子的方法 不同的蛋白质可用于结合化合物，尤其是药物和其他身份。如果构象异构体的形成与疾病状态相关，则可以在筛选中使用该构象异构体，以将该化合物鉴定为候选药物。

