

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/020960

発行日 平成16年12月16日 (2004.12.16)

(43) 国際公開日 **平成15年3月13日 (2003.3.13)**

(51) Int. Cl.⁷

C12Q 1/37
GO1N 27/447
GO1N 33/53
GO1N 33/543

F I

C12Q 1/37
GO1N 33/53 D
GO1N 33/543 541B
GO1N 33/543 545Z
GO1N 27/26 311A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全13頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-525661 (P2003-525661)	(71) 出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/008923	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(22) 国際出願日	平成14年9月3日 (2002.9.3)	(72) 発明者	シャーマ スリーナス ブイ アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 セア オークヒルドライブ 42
(31) 優先権主張番号	特願2001-265732 (P2001-265732)	(72) 発明者	小根山 千蔵 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(32) 優先日	平成13年9月3日 (2001.9.3)	(72) 発明者	中野 洋文 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社本社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

(54) 【発明の名称】 薬物の標的蛋白質を決定する方法

(57) 【要約】

薬物の標的蛋白質を決定する方法であって、薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を該薬物の標的蛋白質であると判定する工程を含む方法。例えば、細胞破砕液に含まれる蛋白質などのなかから薬物の標的蛋白質を選択することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬物の標的蛋白質を決定する方法であって、薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を該薬物の標的蛋白質であると判定する工程を含む方法。

【請求項 2】

細胞破碎液に含まれる蛋白質のなかから薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を選択する工程を含む請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 3】

プロテアーゼとして細胞の内在性プロテアーゼを用いる請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の方法。

【請求項 4】

プロテアーゼとして外来性プロテアーゼをさらに添加する工程を含む請求の範囲第 1 項ないし第 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

プロテアーゼ感受性の上昇を該蛋白質の分解量の上昇として検出する請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

プロテアーゼ阻害剤の存在下において該蛋白質の分解量の上昇の抑制を検出する工程をさらに含む請求の範囲第 5 項に記載の方法。

【請求項 7】

アクリルアミドゲル電気泳動を用いて蛋白質の量の変化を検出する請求の範囲第 5 項又は第 6 項に記載の方法。

【請求項 8】

アクリルアミドゲル電気泳動が SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動又は二次元電気泳動である請求の範囲第 7 項に記載の方法。

【請求項 9】

選択された蛋白質を同定する工程を含む請求の範囲第 1 項ないし第 8 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

選択された蛋白質を単離して同定する工程を含む請求の範囲第 9 項に記載の方法。

【請求項 11】

該蛋白質を検出する工程を含む請求の範囲第 1 項ないし第 8 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

該蛋白質を認識する抗体を用いて検出を行う請求の範囲第 11 項に記載の方法。

【請求項 13】

ウェスタンブロット、ドットブロット、酵素免疫測定法、又は放射性免疫測定法により検出を行う請求の範囲第 12 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は薬物の標的蛋白質を決定する方法に関する。

背景技術

薬物は生体内で特定の物質と結合し、その物質の機能を変化させることにより、生体に対しその薬理効果を示す。多くの場合、この生体内の物質は蛋白質であり、薬物の標的蛋白質と呼ばれる。薬物の結合により引き起こされるこの標的蛋白質の機能の変化は、標的蛋白質の何らかの構造変化を伴うと考えられている [米国特許第 5 5 8 5 2 7 7 号、同第 5 6 7 9 5 8 2 号、特開平 9 - 1 7 8 7 4 6 号公報、国際公開 W O 9 7 / 2 0 9 5 2]。ある薬物の標的蛋白質を決定し、薬物とその標的蛋白質が結合した時の標的蛋白質の機能の変化の内容や、その機能の変化と薬理効果の関係を解明していくこと、すなわち薬物が生体内で薬理効果を示す機構を明らかにすることは、新たな薬物の探索や見出された薬物

10

20

30

40

50

の評価、副作用の分離等を行ううえで非常に重要である。

この薬物の作用の機構の解明のためには、まず標的蛋白質の決定が必要である。薬物の標的蛋白質の決定法としては、標的蛋白質が薬物と結合することを利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより組織や細胞から標的蛋白質を精製する方法 [Shimizu N et al., Nat. Biotechnol. 18, 877 (2000)、Fruichi H et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 270, 1002 (2000)、Jbilo O et al., J. Biol. Chem. 272, 27107 (1997)] や、蛋白質発現型の cDNA ライブラリーを構築し、薬物をプローブとして結合する発現クローンを単離する方法 (特開平 10 - 248571 号公報、特表 2000 - 508923 号公報) が知られている。これらの方法により、まず薬物と結合する標的蛋白質あるいは標的蛋白質をコードする遺伝子を単離し、その構造を分析することにより標的蛋白質を決定することができる。

10

しかしながら、これらの方法では薬物と担体とを結合させる必要があり、標的蛋白質の決定のためには、担体との結合により本来の薬物の立体構造がくずれたり、薬物と標的蛋白質との結合が阻害されないように担体を設計しなければならない。通常は、薬物の薬理活性に大きな影響をおよぼさない官能基を用いて薬物と担体とを結合させるが、活性に影響を及ぼさない官能基を選択するためには、その薬物についての構造活性相関のデータが必要であり、この構造活性相関のデータを得るためには多くの労力がかかるという問題がある。

発明の開示

20

本発明の課題は、薬物の標的蛋白質を決定する方法を提供することにある。より具体的には、薬物を担体に結合させる必要がなく、簡便かつ正確に薬物の標的蛋白質を決定できる方法を提供することが本発明の課題である。

一般に、細胞内で天然に存在する蛋白質は、ポリペプチド鎖が折りたたまれて本来の立体構造をとっており、非常に安定であることが知られている [Levitt M et al., Annu. Rev. Biochem. 66, 549 (1997)]。本発明者らは、標的蛋白質が薬物と結合してその機能を変化させる場合、何らかの構造変化がおり、そのためプロテアーゼに対して感受性が高まると予測した。本発明者らは、その仮説を実証すべく、細胞に薬物を投与して細胞内の蛋白質のプロテアーゼ感受性の変化を解析したところ、標的蛋白質がプロテアーゼ感受性に变化すること、及びプロテアーゼ感受性に变化を生じる蛋白質を検出することにより、その蛋白質を該薬物の標的蛋白質として決定できることを見出した。上記方法は、薬物と担体とを結合させる工程を省略でき、予め薬物の構造活性相関のデータを取得する必要がないことから、極めて簡便かつ正確に薬物の標的蛋白質を決定できる。本発明は上記の知見を基にして完成された。

30

すなわち、本発明により、以下の (1) ~ (13) が提供される。

(1) 薬物の標的蛋白質を決定する方法であって、薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を該薬物の標的蛋白質であると判定する工程を含む方法。

(2) 細胞破碎液に含まれる蛋白質のなかから薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を選択する工程を含む (1) に記載の方法。

(3) プロテアーゼとして細胞の内在性プロテアーゼを用いる (1) 又は (2) に記載の方法。

40

(4) プロテアーゼとして外来性プロテアーゼをさらに添加する工程を含む (1) ないし (3) のいずれか 1 項に記載の方法。

(5) プロテアーゼ感受性の上昇を該蛋白質の分解量の上昇として検出する (1) ないし (4) のいずれか 1 項に記載の方法。

(6) プロテアーゼ阻害剤の存在下において該蛋白質の分解量の上昇の抑制を検出する工程をさらに含む (5) に記載の方法。

(7) アクリルアミドゲル電気泳動を用いて蛋白質の量の変化を検出する (5) 又は (6) に記載の方法。

(8) アクリルアミドゲル電気泳動が SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動又は二次

50

元電気泳動である(7)に記載の方法。

(9) 選択された蛋白質を同定する工程を含む(1)ないし(8)のいずれか1項に記載の方法。

(10) 選択された蛋白質を単離して同定する工程を含む(9)に記載の方法。

(11) 該蛋白質を検出する工程を含む(1)ないし(8)のいずれか1項に記載の方法。

(12) 該蛋白質を認識する抗体を用いて検出を行う(11)に記載の方法。

(13) ウェスタンブロット、ドットブロット、酵素免疫測定法、又は放射性免疫測定法により検出を行う(12)に記載の方法。

発明を実施するための最良の形態

10

本発明の方法は、薬物の標的蛋白質を決定する方法であって、薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を該薬物の標的蛋白質であると判定する工程を含むことを特徴としている。本発明の方法は、薬物の標的蛋白質であることが予想される1の蛋白質を対象として、該薬物の標的蛋白質であるか否かを判定するために用いることができる。また、本発明の方法は、2以上の蛋白質を含む混合物のなかから薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を選択するために用いることができる。

好ましくは、本発明の方法は、細胞破砕液を用い、該細胞破砕液中に含まれる蛋白質のなかから薬物の存在下においてプロテアーゼ感受性が上昇する蛋白質を選択する工程を含む。細胞破砕液を用いてイン・ビトロ(in vitro)の条件で上記の選択を行うことにより、イン・ビボ条件、すなわち細胞の培養時に薬物を添加して解析する場合よりも簡便に標的蛋白質を決定でき、標的蛋白質以降の情報伝達分子による二次的な作用、あるいは蛋白質の合成や分解機構への作用等の間接的な作用による蛋白質の変化を排除して、薬物の直接的な作用による蛋白質の変化のみを検出することができる。

20

薬物の存在下における蛋白質のプロテアーゼ感受性の上昇は、一般的には、プロテアーゼによるその蛋白質の分解量の上昇として検出できる。例えば、薬物の存在下において蛋白質混合物をプロテアーゼで処理して個々の蛋白質を検出し、各蛋白質の量の変化を解析することができる。この解析により、蛋白質の量が減少した蛋白質が検出された場合には、その蛋白質がプロテアーゼによる分解を受けており、その蛋白質のプロテアーゼ感受性が上昇したと認定される。上記の検出を行うにあたっては、薬物の非存在下において同様のプロテアーゼ処理を行って対照として用いるのがよい。上記のようにしてプロテアーゼ感受性が上昇した蛋白質がその薬物の標的蛋白質であると判定できる。

30

本発明の方法を行うにあたり、プロテアーゼとしては、細胞に由来するプロテアーゼ(本明細書において「内在性」のプロテアーゼと呼ぶ場合がある。)で十分な場合もあるが、必要に応じて適宜の種類のプロテアーゼ(該細胞に由来しないもの、本明細書において「外来性」プロテアーゼと呼ぶ場合がある。)を添加してもよい。2種以上のプロテアーゼを適宜組み合わせる反応系に添加してもよい。

さらに、プロテアーゼ反応をプロテアーゼ阻害剤の存在下で行ない、プロテアーゼ阻害剤の非存在下で行った場合の結果と比較することにより、蛋白質の量の減少が認められた場合に、その減少がプロテアーゼによる蛋白質の分解量の上昇によるものであり、他の原因、例えば蛋白質の凝集等によるものでないことを証明できる。

40

本発明の方法の好ましい態様として、蛋白質混合物として細胞破砕液を用いる場合について具体的に説明するが、本発明の方法は下記の説明の細部に限定されることはない。

1) 細胞破砕液の調製

細胞破砕液は、薬物の標的蛋白質を決定すべき細胞や組織から調製することができる。細胞破砕液の調製に用いる細胞又は組織としては、樹立された細胞株、血液や組織から分離した細胞、生体から採取した組織など、いかなるものを用いてもよい。一定の培養条件下で保存された細胞株を用い、細胞破砕液の調製時の条件を同一にすることにより、細胞破砕液に含まれる総蛋白質の質的な変動が少なく、再現性のよい結果を得ることができる。

細胞破砕液は、細胞や組織を適当な緩衝液と共に通常ホモゲナイザー、例えばダウンス

50

・ホモゲナイザー (Dounce homogenizer) やポリトロン・ホモゲナイザー (Polytron homogenizer) 等の組織用のホモゲナイザーを用いて物理的にすりつぶすか、あるいは超音波発振装置を用いて細胞を破碎し、得られた液を遠心分離した上清として調製することができる。緩衝液としては、リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) や網膜状赤血球膨潤緩衝液 (reticulocyte swelling buffer; RSB: 10 mmol/L トリス - 塩酸 pH 7.6、10 mmol/L NaCl、1.5 mmol/L MgCl₂) 等の低濃度の NaCl 等の塩類を含む中性付近のリン酸系やトリス系の緩衝液を用いることができる。

2) 薬物の添加

上記で得られた細胞破碎液に薬物を添加する。対照として、薬物を添加しない細胞破碎液も用意することが望ましい。蛋白質の分解が薬物の濃度に依存的であることを見るために、複数の薬物濃度で試験を行うことが好ましい。薬物が固体の場合は、細胞破碎液作成時の緩衝液、又は適当な溶媒に溶解して添加することができる。この場合はコントロールの薬物非添加の細胞破碎液にも薬物の溶解に用いた溶媒を添加するのが好ましい。添加する溶媒の量は、各細胞破碎液で全て同じにするのが好ましい。

3) プロテアーゼ反応

上記の薬物を添加した細胞破碎液にプロテアーゼを作用させる。細胞破碎液には通常は細胞由来のプロテアーゼが十分量含まれているので、細胞破碎液をそのまま 25 ~ 42、好ましくは 37 で保温することにより、プロテアーゼを作用させることができる。特定の蛋白質の量の減少がプロテアーゼによる分解によって生じたことを確認するために、プロテアーゼ阻害剤、好ましくは様々なプロテアーゼを広範に阻害するプロテアーゼ阻害剤混合物を添加した反応系を用意し、プロテアーゼ阻害剤を添加しない条件でプロテアーゼを作用させた系での結果と比較検討することが好ましい。プロテアーゼ阻害剤を添加した系においてその蛋白質の量の減少が認められず、一方、プロテアーゼ阻害剤を添加しない系において蛋白質量の減少が認められる場合には、蛋白質の量の減少がプロテアーゼによる分解で生じたと認定できる。

プロテアーゼを作用させる時間は特に限定されないが、細胞破碎液中の蛋白質全体を分解することなく、しかもプロテアーゼ感受性の上昇した標的蛋白質の特異的分解のためには十分である作用時間を適宜選択する必要がある。本明細書の実施例には、細胞破碎液を用いた本発明の方法の典型例が具体的かつ詳細に説明されているので、上記のプロテアーゼ作用時間は、細胞の種類や薬物の種類などの種々の条件に応じて、本明細書の実施例を参照することにより、当業者が適宜選択できることは言うまでもない。

例えば、薬物を添加しない細胞破碎液を 30 分 ~ 24 時間の間でいくつかの時間について同様に保温してプロテアーゼを作用させ、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により蛋白質を検出し、適用した反応時間のうち、プロテアーゼを作用させる前と比較して 50 kDa 以上の領域にもスミア状でなくはっきりとした蛋白質のバンドが多数見られる時間を反応時間として選択することができる。また、このように選択された時間の中では長い時間の方が好ましい。細胞により、含まれるプロテアーゼの量が異なるので、好ましい作用時間は異なるが、例えば HCT 116 細胞 (ATCC 番号 CCL - 247) の細胞破碎液では 6 ~ 12 時間が好ましい。

上記の細胞破碎液にさらに外来性プロテアーゼを添加する場合、プロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、V8 プロテアーゼ、エラスターゼ、カルボキシペプチダーゼ、リジルエンドペプチダーゼ、プロテイナーゼ K、テルモリシン、パパイン、ズブチリシン、又はそれらの混合物などを挙げることができる。

4) 蛋白質の解析と標的蛋白質の決定

プロテアーゼ阻害剤の存在下及び非存在下のそれぞれの条件でプロテアーゼを作用させた細胞破碎液中の個々の蛋白質を解析し、各蛋白質のプロテアーゼ感受性の上昇を検出する。ある蛋白質におけるプロテアーゼ感受性の上昇は、通常は、それぞれの条件下の細胞破碎液中の蛋白質を解析したときに特異的に認めらる蛋白質量の減少であって、薬物量に依

10

20

30

40

50

存した減少として検出され、かつプロテアーゼ阻害剤存在下ではその減少が阻害される現象として検出できる。このようにして、プロテアーゼ感受性の上昇が検出された蛋白質を薬物の標的蛋白質として決定することができる。以下、細胞破砕液に含まれる標的蛋白質を同定する方法と、ある特定の蛋白質が標的蛋白質であるかどうかを評価する方法とに分けて説明する。

4 - 1) 標的蛋白質の同定

標的蛋白質が未知の場合は、プロテアーゼ感受性の上昇が検出された蛋白質を細胞破砕液から単離して構造決定することにより、標的蛋白質の同定を行うことができる。通常、この場合には、細胞破砕液の蛋白質全体を解析することが望ましい。解析方法としては、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動、二次元電気泳動などのアクリルアミドゲル電気泳動法が挙げられる。電気泳動後のゲル、あるいはゲルから蛋白質を転写したポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜やニトロセルロース膜に対して、クマジー・ブリリアント・ブルー染色や銀染色等の方法により蛋白質全体を非特異的に染色し検出する。

薬物を添加した細胞破砕液について、プロテアーゼ阻害剤非存在下及び存在下それぞれの条件でプロテアーゼを作用させた場合の蛋白質全体のパターンを比較し、プロテアーゼ阻害剤非存在下で薬物添加により特異的に量が減少し、その量の減少がプロテアーゼ阻害剤存在下では阻害されるバンドやスポットを選択する。これらのバンドやスポットに相当する蛋白質は、薬物との結合によりコンフォメーションの変化を起こした結果、プロテアーゼ感受性が高くなり、プロテアーゼの分解をより多く受けるようになった蛋白質であり、添加した薬物の標的蛋白質と決定できる。

薬物を添加しなかった細胞破砕液のゲルあるいは蛋白質を転写した膜について、上記の解析で薬物依存的に量が減少しているバンドやスポットに相当するバンドやスポットを与える標的蛋白質は、以下のようにして単離して構造決定することができる。まず、相当するバンドあるいはスポットを切り出し、蛋白質をゲル上でトリプシンなどのプロテアーゼによりペプチドに切断後、該ペプチド混合物をMALDI - TOF (matrix assisted laser desorption ionization - time of flight) 質量分析計により検出する。シークエンスデータベース上の配列のプロテアーゼ処理によって計算された理論上のペプチドの質量パターンと、実験的に得られたペプチド配列パターンとを比較する。ペプチド混合物の質量パターンの一致率などを加味したMOWSEスコア [Pappin et al., Curr. Biol. 3, 327 (1993)] の高い蛋白質が標的蛋白質であると決定できる。

複数の蛋白質が含まれている場合などには、以上の方法で決定できない場合もあるが、その場合には、ESI (electrospray ionization) を用いたタンデム質量分析法による解析を行い、部分シークエンスを得た後にGenBank等のEST (expressed sequence tag) のデータベースから検索、決定することができる [Pandey A and Mann M, Nature 405, 837 (2000)、谷口, 実験医学 17, 2550 (1999)]。すなわち、これらの方法から検索の結果見出された、一致するアミノ酸配列を含むデータベース中の蛋白質が、標的蛋白質であると決定できる。一致するアミノ酸配列が存在しない場合は、新規なアミノ酸配列を有する新規な蛋白質と判断できる。

4 - 2) 特定の蛋白質が薬物の標的蛋白質であるかどうかを評価する場合

ある特定の蛋白質が薬物の標的蛋白質であるかどうかを評価する場合は、蛋白質全体を解析する代わりに、評価の対象となる蛋白質を特異的に検出する。該蛋白質の特異的な検出法としては、該蛋白質を認識できる抗体を用いた方法があげられ、ウェスタン・ブロットやドット・ブロット、サンドイッチELISA等の酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay; EIA)、放射性免疫測定法 (Radioimmunoassay; RIA) などをあげることができる。これらの方法は、文献 [富山朔二・安東民衛編, 単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック (1987)、続生化学実験講座5, 免疫生化学研究法, 東京化学同人 (1986)、Goding JW, Monoclonal Antibodies: Principles and Practi

10

20

30

40

50

ce, Third edition, Academic Press (1996)、Harlow E and Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] に基づいて行うことができる。

該蛋白質の量がプロテアーゼ阻害剤非存在下で薬物依存的に減少し、その減少がプロテアーゼ阻害剤存在下では阻害される場合には、該蛋白質が薬物の標的蛋白質であると決定することができ、薬物依存的な減少が見られない場合、あるいはプロテアーゼ阻害剤存在下でも減少が見られる場合は、該蛋白質は薬物の標的蛋白質ではないと考えられる。

本発明の好ましい典型的な方法は、以下の工程(1)から(4)を含む。

(1) 細胞破砕液を調製し、(a) 薬物を添加した細胞破砕液(細胞破砕液(a))、及び(b) 薬物及びプロテアーゼ阻害剤を添加した細胞破砕液(細胞破砕液(b))をそれぞれ調製する。 10

(2) 上記工程(1)で調製した細胞破砕液(a)、細胞破砕液(b)、及び薬物もプロテアーゼ阻害剤も添加しない対照の細胞破砕液(対照細胞破砕液)をそのまま、あるいは外因性プロテアーゼを添加して保温することにより、プロテアーゼを細胞破砕液中の蛋白質に作用させる。

(3) 保温後のそれぞれの細胞破砕液中の個々の蛋白質を検出し、対照細胞破砕液と比較したときに、細胞破砕液(a)では量が減少しており、細胞破砕液(b)ではその量の減少が阻害される蛋白質を選択する。

(4) 選択した蛋白質(標的蛋白質)を単離して同定する。 20

また、別の典型的な方法では、上記工程(1)及び(2)に続けて以下の工程(5)及び(6)を含む。

(5) 保温後のそれぞれの細胞破砕液中の個々の蛋白質をアクリルアミドゲル電気泳動によって分離して染色し、対照細胞破砕液と比較したときに、細胞破砕液(a)では面積が減少しており、細胞破砕液(b)ではその面積の減少が阻害されるバンド又はスポットを選択する。

(6) 選択したバンド又はスポットを形成する蛋白質(標的蛋白質)を単離して同定する。

さらに別の典型的な方法では、上記工程(1)及び(2)に続けて以下の工程(7)を含む。 30

(7) 保温後のそれぞれの細胞破砕液中のある特定の蛋白質を検出し、対照細胞破砕液と比較したときに、細胞破砕液(a)では該蛋白質の量が減少しており、細胞破砕液(b)ではその量の減少が阻害されることを検出する。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に例示するが、本発明の範囲は実施例によって限定されるものではない。

以下の実施例においては薬物としてUCS15Aを用いた。この薬物は、ストレプトマイセス属放線菌の培養液中から単離され、骨吸収抑制作用を有する物質(特開平8-268888号公報)であり、SI-4228(特公昭62-28959号公報)として報告されていた物質と同一の物質である。UCS15Aは骨吸収抑制作用の他、殺菌作用(特開昭58-116686号公報、特開昭63-22583号公報)、免疫抑制作用(特開昭61-293920号公報)、抗腫瘍活性(特開昭63-48213号公報)等の多様な作用を有する物質であるが、その作用機構及び標的蛋白質は不明であった。最近、UCS15Aが、チロシンキナーゼsrcの情報伝達を阻害するが、srcの酵素活性自体は阻害しないこと、さらにsrcとsrcの基質として知られているSam68の結合を特異的に阻害することが報告された[Sharma S V et al., Oncogene, 20, 2068(2001)]。このことは、UCS15Aの標的蛋白質の一つがSam68であることを強く示唆するものである。 40

(1) 細胞破砕液の調製

ヒト大腸癌細胞株HCT116(ATCC番号CCL-247)を10%ウシ胎児血清を 50

含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modification of Eagle's medium; DMEM) を用いて、37、5% CO₂ 条件の CO₂ インキュベーターで細胞培養用 100 mm 径ディッシュに培養し、3 日ごとに 1 / 5 ずつに分けて継代して増殖させた。継代して 3 日目の HCT 116 細胞ディッシュ 3 枚分に対し、培地を取り除き、10 mL の氷冷した PBS を加えてから取り除くことにより細胞を洗浄した。この細胞に、低浸透圧である RSB (10 mmol / L トリス - 塩酸 pH 7.6、10 mmol / L NaCl、1.5 mmol / L MgCl₂) 10 mL を加えた。氷上に 10 分間置き、細胞を膨張させた後、細胞をディッシュからはがして、RSB ごと 15 mL 容量のダウンス・ホモゲナイザーにいった。ホモゲナイザーのすりつぶし棒を 50 往復させて細胞を破碎した。この細胞破碎液を 4、15、000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清を回収し、1 mL ずつ 10 本に分けた。 10

(2) UCS 15 A のプロテアーゼ分解アッセイ

UCS 15 A は特開昭 58 - 116686 号公報の記載に基づきストレプトマイセス属放線菌より単離精製し、10 mmol / L の濃度のジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液を調製した。UCS 15 A を (1) で調製した HCT 116 細胞破碎液 10 本にそれぞれ、終濃度 0 (DMSO のみ)、25、50、75、100、150、200、225、250 及び 300 μ mol / L になるように添加した。なお、添加する UCS 15 A はあらかじめ DMSO で希釈し、添加する DMSO の量はどれも同じになるようにした。UCS 15 A を添加した細胞破碎液を、回転培養機でゆるやかに回転させながら 37 で 12 時間保温して、細胞内在性プロテアーゼを反応させた。反応後の細胞破碎液それぞれに 333 μ L の 4 x 濃度のレムリのサンプルバッファーを添加し、よく混合させた後、100 で 10 分間加熱した。この 20 μ L をそれぞれ 8.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。電気泳動後のゲルをクマジー・プリリアント・ブルー (Coomassie brilliant blue; ナカライテスク株式会社製) で染色した。その結果を第 1 図 (左図) に示したが、UCS 15 A の濃度が上昇するとともに量が減少しているいくつかの蛋白質が観察された。 20

(3) ウェスタンブロットによる Sam 68 の検出

以下のようにしてウェスタンブロットにより細胞破碎液中の Sam 68 を検出した。まず、上記 (2) の電気泳動後のゲルから蛋白質を孔径 0.45 μ m のニトロセルロース膜 (プロトラン (Protran); シュライシャー・アンド・シュエル (Schleicher and Schuell) 社製) にブロットした。膜に 0.25% ゼラチンと 0.2% Tween - 20 を含む PBS (以下 PBS - TG とよぶ。) を乗せて 4 で一晩置いて非特異的結合をブロックした後、まず一次抗体として PBS - TG で 1 : 1000 に希釈したウサギ抗 Sam 68 ポリクローナル抗体 (サンタ・クルズ (Santa Cruz) 社製) を 2 時間反応させた。0.2% Tween - 20 を含む PBS (以下 PBS - T とよぶ) で洗浄した後、次に二次抗体として PBS - TG で 1 : 4000 に希釈したホース・ラディッシュ・パーオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク (Amersham Pharmacia Biotech) 社製) を 1 時間反応させた。検出は ECL 試薬 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製) を用いた化学発光により行った。その結果、第 1 図 (右図) に示すように UCS 15 A の濃度が上昇するとともに細胞破碎液中の Sam 68 の量が減少していることが確認された。 40

(4) プロテアーゼ阻害剤の効果

(3) の Sam 68 の量の減少がプロテアーゼによる分解によるものであることを、以下に示すプロテアーゼ阻害剤の添加により確認した。

(2) に記載したプロテアーゼ分解アッセイの際に、UCS 15 A と共に広範囲のプロテアーゼを阻害できるプロテアーゼ阻害剤カクテル [コンプリート (Complete); ロシュ (Roche) 社製] を添加して同様に反応を行い、電気泳動後、(3) と同様にしてウェスタンブロットによる Sam 68 の検出を行った。阻害剤の添加条件等は試薬に付属するメーカーのマニュアルに従った。その結果、図 2 に示すように、プロテアーゼ阻 50

害剤の添加により細胞破碎液中の S a m 6 8 の量の減少は抑えられた。したがって、S a m 6 8 の量の減少はプロテアーゼによる分解であることが確認され、S a m 6 8 は U C S 1 5 A 存在下で内在性プロテアーゼに感受性になることが確認された。

なお、第 2 図のプロテアーゼ阻害剤存在下と非存在下でのウェスタンブロットは両者とも同量の細胞破碎液を使用し、検出のための感光時間も同一で行ったが、両者のレーン 2 を比較すると、U C S 1 5 A を添加しなかった場合は、37 で 1 2 時間保温しても、プロテアーゼ阻害剤の非存在下での S a m 6 8 の蛋白質量は、プロテアーゼ阻害剤存在下での S a m 6 8 の蛋白質量と変わらなかった。したがって、S a m 6 8 は内在性プロテアーゼに対して元来非常に安定な蛋白質であることがわかった。

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、簡便かつ正確に薬物の標的蛋白質を決定できる。該方法は、新たな薬物の探索や見出された薬物の評価、副作用の分離等の医薬の創製のための手段として極めて有用である。

10

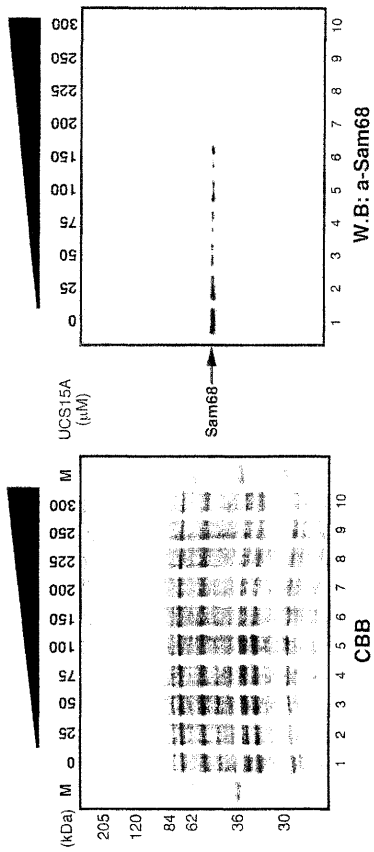
【図面の簡単な説明】

第 1 図は、H C T 1 1 6 の細胞破碎液を用いた、U C S 1 5 A を濃度を変えて添加した蛋白質のプロテアーゼ分解アッセイの結果を示す図である。左は S D S - P A G E のクマジー・プリリアント・ブルー染色の結果、右は、ウェスタン・ブロットにより S a m 6 8 を特異的に検出した結果である。両者とも各レーンの上の数字は細胞破碎液に添加した U C S 1 5 A の濃度 ($\mu \text{m o l} / \text{L}$) を示し、M は分子量マーカー、左の数字は分子量マーカーの各分子量 (k D a) を示す。

20

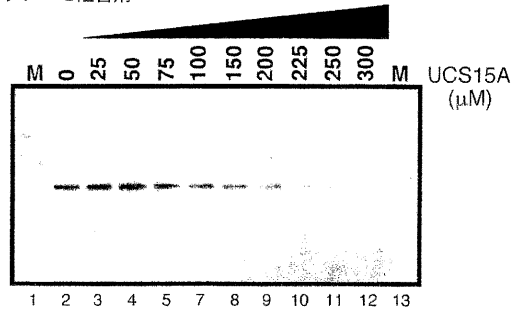
第 2 図は、細胞破碎液中の S a m 6 8 の分解に対するプロテアーゼ阻害剤の効果を示す図である。上は、プロテアーゼ阻害剤を添加しない場合、下はプロテアーゼ阻害剤を添加した場合の、U C S 1 5 A を濃度を変えて添加したプロテアーゼ分解アッセイで、ウェスタン・ブロットにより S a m 6 8 を特異的に検出した結果である。両者とも各レーンの上の数字は細胞破碎液に添加した U C S 1 5 A の濃度 ($\mu \text{m o l} / \text{L}$) を示し、M は分子量マーカーを示す。

【 図 1 】
第 1 図

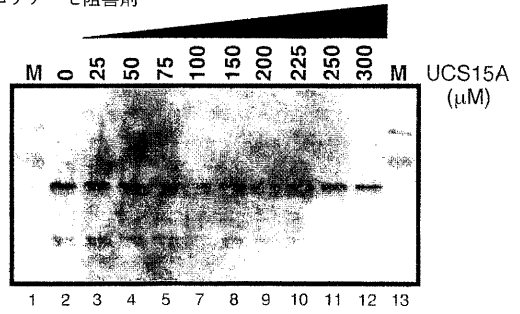


【 図 2 】
第 2 図

(-) プロテアーゼ阻害剤



(+) プロテアーゼ阻害剤



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/08923
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12Q1/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N27/26		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C12Q1/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N27/26		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST FILE (JOTS), WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 770876 A (SCRIPTGEN PHARM INC.), 02 May, 1997 (02.05.97), & JP 9-178746 A	1-13
A	EP 1085097 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.), 21 March, 2001 (21.03.01), & JP 2001-54399 A	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 November, 2002 (12.11.02)		Date of mailing of the international search report 26 November, 2002 (26.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/08923
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12Q1/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N27/26		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12Q1/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N27/26		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 770876 A (SCRIPTGEN PHARM INC.) 1997.05.02 & JP 9-178746 A	1-13
A	EP 1085097 A (FUJI PHOTO FILM CO. LTD.) 2001.03.21 & JP 2001-54399 A	1-13
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 12.11.02	国際調査報告の発送日 26.11.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 印	4B 9162 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

G 0 1 N 27/26 3 1 5 H

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	确定药物靶蛋白的方法		
公开(公告)号	JPWO2003020960A1	公开(公告)日	2004-12-16
申请号	JP2003525661	申请日	2002-09-03
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	シャーマスリーナスブイ 小根山千歳 中野洋文		
发明人	シャーマスリーナスブイ 小根山千歳 中野洋文		
IPC分类号	C12Q1/37 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/37 G01N27/447		
FI分类号	C12Q1/37 G01N33/53.D G01N33/543.541.B G01N33/543.545.Z G01N27/26.311.A G01N27/26.315.H		
优先权	2001265732 2001-09-03 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种确定药物靶蛋白的方法，该方法包括判断在药物存在下蛋白酶敏感性增加的蛋白是所述药物的靶蛋白的步骤。例如，可以从细胞裂解物中所含的蛋白质等中选择药物的靶蛋白质。

