

(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 - 530125

(P2003 - 530125A)

(43)公表日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 9/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 9/00		25/00	4 B 0 6 3
25/00		25/18	4 B 0 6 5
25/18		25/20	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全198数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 575640(P2001 - 575640)

(86) (22)出願日 平成13年4月6日(2001.4.6)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月7日(2002.10.7)

(86)国際出願番号 PCT/GB01/01570

(87)国際公開番号 W001/077170

(87)国際公開日 平成13年10月18日(2001.10.18)

(31)優先権主張番号 0008321.2

(32)優先日 平成12年4月6日(2000.4.6)

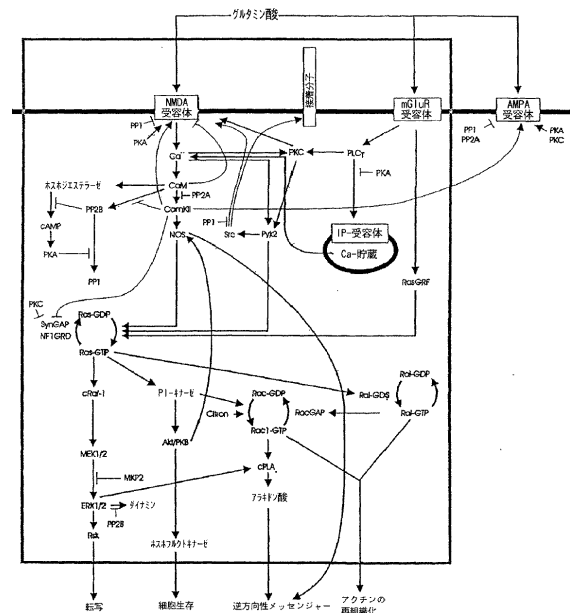
(33)優先権主張国 イギリス(GB)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的物質およびその使用方法

(57)【要約】

本発明では、多タンパク質の複合体と、そのサブ複合体と、それらを生成する方法とが提供される。好ましくは、複合体はNMDA受容体を含有している。さらに本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための化合物を同定する方法が提供される。さらに、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を診断し、または、診断を補助する方法が提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 多タンパク質の複合体であって、
ポリペプチドサブユニットNR1と、表1に列挙された成分の群から選択される少なくとも1つの成分とを含有する
複合体。

【請求項2】 請求項1に記載された複合体であって、
表1および/または表2に列挙された成分の群から選択される3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の異なる成分を含有する
複合体。

【請求項3】 請求項1または2に記載された複合体であって、
ポリペプチドサブユニットNR1、NR2A、NR2B、PSD-95と、表1に列挙された成分の群から選択される少なくとも1つの成分とを含有する
複合体。

【請求項4】 請求項1乃至3の何れかに記載された複合体であって、
表1および表2に列挙された成分のすべてを含有する
複合体。

【請求項5】 請求項1乃至4の何れかに記載され、ペプチド親和性クロマトグラフィー法により得ることができる複合体であって、
前記ペプチド親和性クロマトグラフィー法は、
(i)動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集し、
(ii)PSD-95に結合するペプチドと、前記サンプルとを接触させることにより前記複合体を単離する
ステップを含む
複合体。

【請求項6】 請求項5に記載された複合体であって、
PSD-95に結合するペプチドが、SIESDVまたはKRLLDAQRG
SFPPWVQQTRVである
複合体。

【請求項7】 請求項1乃至6の何れかに記載された複体のサブ複合体で

あって、

表1および表2に列挙された成分から選択される2つ以上のポリペプチド成分を含有しており、

前記ポリペプチド成分の少なくとも1つが、表1に列挙された群から選択されるサブ複合体。

【請求項8】 請求項7に記載されたサブ複合体であって、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の成分を含有するサブ複合体。

【請求項9】 請求項1乃至6の何れかに記載された多タンパク質複合体、または、請求項7もしくは8に記載されたサブ複合体を生成する方法であって、
(i)動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集し、
(ii)表1および表2で同定される任意の1つ以上の成分に結合するペプチドと、前記サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップを含んでおり、
前記ペプチドは、抗体またはその抗原結合フラグメントの何れでもない方法。

【請求項10】 請求項9に記載された方法であって、
前記ペプチドは、PDZドメインを含む1つ以上の成分に結合し、かつ、前記成分のPDZドメインを介して結合する方法。

【請求項11】 請求項9または10に記載された方法であって、
前記複合体は、ペプチド親和性クロマトグラフィーを用いて単離される方法。

【請求項12】 請求項9乃至11の何れかに記載された方法であって、
前記ペプチドは、PSD-95に結合する方法。

【請求項13】 請求項12に記載された方法であって、
前記ペプチドは、ヒトNMDA-R2BサブユニットのC末端の領域のアミノ

酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む方法。

【請求項14】 請求項11に記載された方法であって、前記ペプチドは、アミノ酸配列S I E S D Vを含む方法。

【請求項15】 請求項12に記載された方法であって、前記ペプチドは、K L S S I E S D Vである方法。

【請求項16】 請求項14に記載された方法であって、前記ペプチドは、S I E S D Vである方法。

【請求項17】 請求項12に記載された方法であって、前記ペプチドは、S y n G A PサブユニットのC末端の領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む方法。

【請求項18】 請求項17に記載された方法であって、前記ペプチドは、アミノ酸配列Q T R Vであるか、またはそれを含む方法。

【請求項19】 請求項18に記載された方法であって、前記ペプチドは、K R L L D A Q R G S F P P W V Q Q T R Vであるか、またはそれを含む方法。

【請求項20】 請求項1乃至6の何れかに記載された多タンパク質複合体、または、請求項7もしくは8に記載されたサブ複合体を生成する方法であって、ステップ(i)、(ii)を含み、ステップ(i)は、動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集するステップであり、

ステップ(ii)は、表1に列挙された成分から選択される成分に結合する分子と、前記サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップである

方法。

【請求項21】 請求項1乃至6の何れかに記載された多タンパク質複合体、または、請求項7もしくは8に記載されたサブ複合体を生成する方法であって、ステップ(i)、(ii)を含み、

ステップ(i)は、請求項1乃至6の何れかに記載された多タンパク質複合体を発現する動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集するステップであり、表1に示された成分のうち、少なくとも1つの成分の発現が、野生型多タンパク質複合体を発現する動物との比較において改変され、

ステップ(ii)は、異常な複合体の成分に結合する分子と、前記サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップである

方法。

【請求項22】 請求項21に記載された方法であって、

前記動物は、トランスジェニック非ヒト動物である

方法。

【請求項23】 請求項20乃至22の何れかに記載された方法であって、

前記分子は、抗体、またはその抗原結合フラグメントである

方法。

【請求項24】 請求項23に記載された方法であって、

前記複合体は、免疫沈降により単離される

方法。

【請求項25】 請求項23に記載された方法であって、

前記複合体は、免疫親和性クロマトグラフィーを用いて単離される

方法。

【請求項26】 請求項20乃至22の何れかに記載された方法であって、

前記複合体は、ペプチド親和性クロマトグラフィーにより単離される

方法。

【請求項27】 請求項5もしくは6に記載された複合体、または、請求項

9乃至26の何れかに記載された方法であって、

組織のサンプルは、脳から得られる

複合体または方法。

【請求項28】 請求項27に記載された複合体または方法であって、
組織のサンプルは、前脳から得られる

複合体または方法。

【請求項29】 請求項5、6、27もしくは28の何れかに記載された複
合体、または、請求項9乃至28の何れかに記載された方法であって、

組織のサンプルは、成体、若年体または新生仔の哺乳動物における中枢神経系
から得られる

複合体または方法。

【請求項30】 請求項9乃至29の何れかに記載された方法であって、
(ステップ(i)の前に)組織が採取される哺乳動物の年齢を選択する
ステップを含む

方法。

【請求項31】 請求項7または8に記載されたサブ複合体を作製する方法
であって、

(i)表1および表2で同定される成分から選択される第1の成分をコードする
遺伝子構築物を、宿主細胞において発現させ、

(ii)表1および表2で同定される成分から選択される第2の成分をコードす
る遺伝子構築物を、宿主細胞において発現させ、

(iii)宿主細胞培養物から成分を単離し、

(iv)前記成分を互いに接触させる

ステップを含んでおり、

前記第1の成分と、前記第2の成分とは異なり、少なくとも一方の成分が表1
に示された成分から選択される

方法。

【請求項32】 請求項31に記載された方法であって、

成分を互いに接触させるステップの前に、表1および表2で同定される成分か
ら選択される成分をコードする少なくとも1つのさらなる遺伝子構築物を、宿主
細胞において発現させる

ステップを含む

方法。

【請求項33】 請求項31または32に記載された方法であって、それぞれの成分が、異なる宿主細胞において発現される方法。

【請求項34】 請求項31または32に記載された方法であって、1つ以上の成分が、同じ宿主細胞において発現される方法。

【請求項35】 請求項8乃至34の何れかに記載された方法で用いるための宿主細胞であって、

表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードするような1つ以上の遺伝子構築物を含む宿主細胞。

【請求項36】 請求項35に記載された宿主細胞であって、表1および表2に列挙された成分の群から選択される2つ以上の成分をコードするような1つ以上の遺伝子構築物を含む宿主細胞。

【請求項37】 請求項35または36に記載された宿主細胞であって、表1および表2に列挙された2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の成分をコードするような遺伝子構築物を含む宿主細胞。

【請求項38】 請求項35乃至37の何れかに記載された宿主細胞であって、哺乳動物細胞である宿主細胞。

【請求項39】 請求項35乃至38の何れかに記載された宿主細胞であって、ニューロンであるか、またはニューロンから得られる細胞である宿主細胞。

【請求項40】 請求項35乃至39の何れかに記載された宿主細胞から単離される亜細胞画分であって、

請求項1乃至6の何れかに記載された多タンパク質複合体、または、請求項7

もしくは8に記載されたサブ複合体を、その中に含む
亜細胞画分。

【請求項41】 請求項40に記載された亜細胞画分であって、原形質膜であるか、または、それを含む亜細胞画分。

【請求項42】 請求項7または8に記載されたサブ複合体を作製する方法であって、

(i) 請求項1乃至6の何れかに記載された複合体と、タンパク質-タンパク質間相互作用を妨げる薬剤とを接触させ、

(ii) それにより形成されるサブ複合体を単離する
ステップを含む
方法。

【請求項43】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法であって、

(i) 試験される化合物を選択し、

(ii) 請求項1乃至6の何れかに記載された多タンパク質複合体、または、請求項7もしくは8に記載されたサブ複合体の何れかと、試験化合物とを接触させ、

、

(iii) 試験される化合物が複合体またはサブ複合体と相互作用するか否かを判定する

ステップを含んでおり、

複合体またはサブ複合体と相互作用する試験化合物は、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害の徴候を軽減し、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害の発病を防止もしくは遅延し、ならびに/または、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に関連付けられる欠損を修正するための候補化合物として同定される

方法。

【請求項44】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法であって、

(i) 試験される化合物を選択し、

(i i) 表 1 に列挙された成分から選択される成分と、試験化合物とを接触させ、

(i i i) 試験される化合物が成分の特性を調節するか否かを判定するステップを含んでおり、

成分の特性を調節する試験化合物は、中枢神経系における NMDA 受容体の機能障害の徴候を軽減し、中枢神経系における NMDA 受容体の機能障害の発病を防止もしくは遅延し、ならびに / または、中枢神経系における NMDA 受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に関連付けられる欠損を修正するための候補化合物として同定される方法。

【請求項 4 5】 請求項 4 4 に記載された方法であって、

ステップ (i i i) は、

化合物が、表 1 もしくは表 2 に列挙された 1 つ以上の他の成分、または、そのサブ複合体と相互作用する成分の能力を調節するか否かを判定するステップを含む方法。

【請求項 4 6】 請求項 4 3 乃至 4 5 の何れかに記載された方法であって、

学習的欠陥、精神医学的異常および / または神経学的異常に対する処置の効能に関する 1 つ以上のスクリーニングにおいて、試験化合物を試験するステップを含む方法。

【請求項 4 7】 中枢神経系における NMDA 受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法であって、

(i) 表 1 に列挙された成分の特性を調節すると知られている化合物を、選択し、

(i i) 中枢神経系における NMDA 受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置の効能に関するスクリーニングにおいて、前記化合物を試験する

ステップを含む

方法。

【請求項48】 化合物であって、

請求項43乃至47の何れかに記載された方法により得ることができるか、または得られる

化合物。

【請求項49】 薬学的組成物であって、

請求項48に記載された化合物もしくはその塩と、薬学的に受容される腑形剤もしくはキャリアとを含む

薬学的組成物。

【請求項50】 請求項48に記載された化合物であって、医学的使用のための化合物。

【請求項51】 請求項48に記載された化合物の使用方法であって、

中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための薬物を調製する

使用方法。

【請求項52】 請求項51に記載された使用方法であって、

異常または状態は、学習的欠陥、精神医学的異常および/または神経学的異常から選択される

使用方法。

【請求項53】 学習的欠陥、精神医学的異常および/または神経学的異常を呈する患者を処置する方法であって、

請求項45に記載された化合物を、前記患者に投与するステップを含む方法。

【請求項54】 表1に列挙された1つ以上の成分の特性を調節する化合物の使用方法であって、

中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための薬物を調製する

使用方法。

【請求項55】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付け

られる異常および状態を呈する患者を処置する方法であって、

表1に列挙された1つ以上の成分の特性を調節する化合物を、前記患者に投与するステップを含む方法。

【請求項56】 請求項51、52または54の何れかに記載された使用方法であって、

前記薬物は、学習的欠陥を処置するためのものである使用方法。

【請求項57】 請求項51、52または54の何れかに記載された使用方法であって、

前記薬物は、精神医学的異常を処置するためのものである使用方法。

【請求項58】 請求項57に記載された使用方法であって、

前記薬物は、精神分裂病を処置するためのものである使用方法。

【請求項59】 請求項51、52または54の何れかに記載された使用方法であって、

前記薬物は、神経学的異常を処置するためのものである使用方法。

【請求項60】 請求項59に記載された使用方法であって、

前記薬物は、脳卒中または癲癇を処置するためのものである使用方法。

【請求項61】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を診断するか、または、診断を補助する方法であって、

(i) 診断される被験体から、核酸を含有するサンプルを得、

(ii) 表1に列挙された成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする核酸と、被験体からの前記核酸とを接触させる

ステップを含む

方法。

【請求項62】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を予後診断するか、または予後診断を補助する方法であって、

(i) 診断される被験体から、核酸を含有するサンプルを得、

(ii) 表1に列挙された成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする核酸と、被験体からの前記核酸とを接触させる

ステップを含む

方法。

【請求項63】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する患者の罹患性を判定する方法であって、

(i) 診断される患者から、核酸を含有するサンプルを得、

(ii) 表1に列挙された成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする核酸と、患者からの前記核酸とを接触させる

ステップを含む

方法。

【請求項64】 請求項61乃至63の何れかに記載された方法であって、異常または状態は、学習的欠陥、精神医学的異常および/または神経学的異常から選択される

方法。

【請求項65】 請求項61乃至63の何れかに記載された方法であって、表1に列挙された成分をコードする核酸は、遺伝子である

方法。

【請求項66】 請求項61乃至65の何れかに記載された方法であって、表1および表2に列挙された成分の群から選択される成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする少なくとも1つのさらなる核酸と、被験体からの核酸とを接触させるステップを含む

であり、

被験体からの核酸にハイブリダイズする各核酸は、異なる成分をコードする方法。

【請求項67】 請求項61乃至66の何れかに記載された方法であって、表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする1つ以上の核酸は、検出可能な部分を含む方法。

【請求項68】 請求項61乃至67の何れかに記載された方法であって、表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする1つ以上の核酸は、1本鎖化される方法。

【請求項69】 請求項61乃至68の何れかに記載された方法であって、表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする1つ以上の核酸は、1000未満の塩基対（当該核酸が2本鎖である場合）もしくは塩基（当該核酸が1本鎖である場合）、例えば、100未満の塩基対もしくは塩基である方法。

【請求項70】 請求項61乃至69の何れかに記載された方法であって、患者からの核酸において、表1に列挙された成分をコードする核酸の配列改変体の存在を同定し、

1つ以上の試験母集団からの個体における等価な核酸の配列に対して前記配列改変体を比較するステップを含む方法。

【請求項71】 請求項70に記載された方法であって、1つ以上の試験母集団は、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を被らず、かつ、以前に被らなかった個体の集団を

含む

方法。

【請求項72】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する被験体の罹患性を診断し、予後診断し、および/または判定する方法であって、

(i) 試験対象の被験体から、抗体を含むサンプルを得、

(ii) 前記サンプルが、請求項1乃至6の何れかに記載された多タンパク質複合体、または、請求項7もしくは8に記載されたサブ複合体に反応するような抗体を含有しているか否かを判定する

ステップを含む

方法。

【請求項73】 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する患者の罹患性を診断し、予後診断し、または判定するのに有用なパーツ一式であって、

核酸間ハイブリダイゼーションを促進するための、かつ、それにより形成されたハイブリッドを検出するための酵素および試薬とともに、表1に列挙された成分をコードする核酸に選択的にハイブリダイズする核酸を含む

パーツ一式。

【請求項74】 本明細書に記載された任意の新規な多タンパク質複合体。

【請求項75】 本明細書に記載されたように、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する新規な方法。

【請求項76】 本明細書に記載されたように、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を呈する患者を処置するための新規な方法。

【請求項77】 本明細書に記載されたように、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対して診断し、予後診断し、または患者の罹患性を判定する新規な方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、多タンパク質複合体に関し、特に、NMDA受容体を含有する複合体、および、このような複合体と相互作用する化合物に関する。さらに本発明は、中枢神経系におけるNMDA受容体(および、このような受容体を含む複合体)の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための化合物を同定する方法、ならびに、このような化合物の使用方法に関する。

【0002】**(背景技術)**

アミノ酸L-グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質であり、グルタミン酸作動性のニューロンが哺乳動物の中枢神経系全体に延びている。解剖学的、生化学的および電気生理学的な分析によれば、グルタミン酸作動性系が、シナプス可塑性(すなわち、シナプスの再組織化およびデノボでのシナプス増殖)、神経伝達因子放出の調節、長期増強(LTP)、学習、記憶、低酸素性/虚血性のニューロン障害および細胞死を含む広範なニューロンプロセスに関係している旨、示唆される(BlissおよびCollingridge, 1993, Nature, 261:31~39; BearおよびMalenka, 1994, Curr. Opin. Neurobiol. 4:389-399)。更に、グルタミン酸は、精神分裂病(Carlssonら, 1999, Br. J. Psychiatry Supple. 37:2~6; Tamminga, 1999, Br. J. Psychiatry Supple. 37:12~15)、重篤な鬱病(Skolnick, 1999, Eur. J. Pharmacol. 375:31~40)、癲癇(Chapman, 1998, Prog. Brain Res. 116:371~383)、パーキンソン病(LoopuijtおよびSchmidt, 1998, Amino Acids 14:17~23)、低酸素性脳傷害(MishraおよびDelivoria-Papadopoulos, 1999, Brain, Res, Bull. 48:233~238)、学習的欠陥(Tangら, 1999, Nature 40:63~69)、および、脳卒中(SunおよびChen, 1999, Clin. Neuropharmacol. 22:164~171)を含む、いくつかの精神医学的および神経学的な異常の病原性に関係するとされている。

【0003】

グルタミン酸は、受容体を介してその神経伝達物質機能を媒介する。これらの

受容体は、2つの主要な群、すなわち、イオンチャネル型受容体および代謝調節型受容体に分類される(概説について、HolzmanおよびHeinemann, 1994, *Ann. Rev. Neurosci.* 17:31~108を参照のこと)。代謝調節型グルタミン酸受容体は、細胞内の第2のメッセンジャー系を介して細胞外シグナルを伝達するGタンパク質共役型受容体であるにもかかわらず、イオンチャネル型グルタミン酸受容体は、内在性カチオン特異的リガンド依存性イオンチャネルを含む。

【0004】

イオンチャネル型グルタミン酸受容体はさらに、それらのリガンド優先度を基準として、カイニン酸、 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾール-プロピオン酸 (AMPA)、およびN-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体に細分化される。これらのうち、NMDA受容体は間違いなく最も広く特徴づけられる。NMDA受容体は、活性化のためにコアゴニストのL-グルタミン酸およびグリシンを必要とし、ならびにポリアミン、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、pH、および酸化還元ポテンシャルによる複雑なアロステリック調節に供されるヘテロマーのタンパク質である。NMDA受容体のイオンチャネルを形成するために、6つの異なるサブユニット、すなわち、NR1、NR2A~NR2D、およびNR3(これらのそれぞれは異なる遺伝子によってコードされる)が合わさる。これらのうちで、NR1サブユニットは、これが、それ自身で機能的なイオンチャネルを形成し得る唯一のものであるので、重要であると考えられる(Schoepferら, 1994, *Prog. Neurobiol.* 42:353~357; Sucherら, 1996, *Trends Pharmacol. Sci.* 17:348~355を参照のこと)。残りのサブユニット(すなわち、NR2A~DおよびNR3)は、得られるNMDA受容体の動学的および薬理学的特徴を改変する補助サブユニットを構成する。しかしネイティブなNMDA受容体の正確な化学量論は解明されてないままである。

【0005】

NMDA受容体組成物に関する遺伝子レベルでの理解、特に、種々のNMDA受容体サブユニットをコードする遺伝子のクローニングが進歩することにより、組換えNMDA受容体の生成および研究が可能となった。このような研究により、NMDA受容体の機能および調節に関する理解が促進されたが、組換え受容体

の薬理学的特性はインビボで発現されるネイティブな受容体の特性とは異なることが示された(例えば、Sucherら、1996、Trends Pharmacol. Sci. 17:348~355を参照)。本発明者らの考えでは、このような不同性の効果は、今までNMDA受容体と会合されると認知されていないような多数の他の分子と、ネイティブなNMDA受容体との会合に少なくとも起因していると考えられ、これにより、NMDA受容体の、認知されている種々の機能を媒介することを担う精巧な多成分複合体が形成されると考えられる。NMDA受容体と、或る他の成分とを含んだ複合体の単離および部分精製は、WO97/46877に記載されている。

【0006】

ここで、インビボで存在するような受容体に更に類似しているNMDA受容体含有する大きな多タンパク質複合体(本発明者らはこれを「ヘボソーム(Hebosome)」と称する)の精製について述べる。これによって、NMDA受容体機能を妨げる候補薬物、つまり、NMDA受容体機能障害に関連付けられる精神医学的および神経学的な種々の異常および状態を処置するのに利用し得る候補薬物を同定する新規な方法が開発され得る。例えば、多タンパク質複合体を介したシグナル伝達が阻害されるか、または増強されるような方法で多タンパク質複合体の組み立て(assembly)および組成を妨げる化合物を同定することが可能となり得る。

【0007】

(発明の開示)

従って、本発明の目的は、機能的NMDA受容体のコアサブユニットを含有するのみならず、このような受容体にインビボで会合し、かつ、少なくとも、インビボで観測される幾つかの不同性効果を媒介する点で重要である多数の補助タンパク質も含有するような多タンパク質複合体を提供することである。

【0008】

本発明の第1の態様では、ポリペプチドサブユニットNR1と、表1に列挙された成分の群から選択される少なくとも1つの成分とを含有する多タンパク質複合体が提供される。

【0009】

好ましくは、複合体は、NMDA受容体、すなわち、機能的なNMDA受容体イオンチャネルを含有している。

【0010】

従って、本発明では、ポリペプチドサブユニットNR1と、表1に列挙された成分の群から選択される少なくとも1つの成分とを含有するNMDA受容体複合体が提供される。

【0011】

好ましくは、複合体は、1000kDaよりも大きい分子量、例えば、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000、または4000kDaよりも大きい分子量を有する。より好ましくは、複合体は、1800と2200kDaとの間の範囲の分子量を有する。最も好ましくは、複合体は約2000kDaの分子量を有する。

【0012】

表1では、多タンパク質複合体の成分のリストが与えられる。これらの成分bは、本発明者らが知る限りにおいて、NR1サブユニットに、直接的または間接的に、物理的に連結されることが以前には示されておらず、従ってNMDA受容体と会合されることが以前には示されていなかった。推定分子量(SDS-PAGEを使用して得られた)は、列挙された成分のそれぞれのマウス相同体について含めて考えられる。

【0013】

【表1-1】

タンパク質	分子量 (kDa)	アクセス番号 (SwissProt)	
		マウス	ヒト
グルタミン酸受容体 mGluR1 α ¹	200	P97772	Q13255
足場および アダプター			
NSF ²	83	P46460	P46459
Homer/Vesl-1 ³	28/45	Q9Z216	O95349
Shank ⁴	200	Q9WUE8(rat)	AAF02496-8
AKAP-150/79 ⁵	150	P24587(rat)	P24588
SAP97 ⁶	100	Q62696(rat)	Q12959
PKA			
PKA R2 ベータ (β) ⁷	53	P31324	P31323
PKC			
PKC ベータ (β) ⁸	80	P04411	P05771/P05127
PKC ガンマ (γ) ⁹	80	P05697	P05129
PKC エプシロン (ϵ) ¹⁰	90	P16054	Q02156
ホスファターゼ			
PP2A ¹¹	36	P13353	P05323/P11082
PP5 ¹²	50	Q60676	P53041
PTP1D ¹³	72	—	Q06124
PP1 ¹⁴	36	P37139	P08129 P37140 P36873
PP2B ¹⁵	61	P20652	Q08209
チロシンキナーゼ			
PYK2 ¹⁶	116	—	Q14289
MAP キナーゼ経路			
ERK1 ¹⁷	42/44	Q62844	P27361
ERK2 ¹⁸	42	P27703	P28482
MEK1 ¹⁹	45	P31938	Q02750
MEK2 ²⁰	46	Q63932	P36507
MKP2 ²¹	43	—	Q13524
Rsk-2 ²²	90	P18654	P51812

【表1-2】

タンパク質	分子量 (kDa)	アクセス番号 (SwissProt)	
		マウス	ヒト
c-Raf1 ²³	74	---	P04049
小G タンパク質 および調節因子			
Rac1 ²⁴	21	Q05144	P15154
Rap2 ²⁵	21	---	P10114/P17964
Ras ²⁶	21	Q61411 P32883 P08643 P08556	P01112 P01116 P01118
NF1GRP ²⁷	250	Q04690	P21359
Ra1A ²⁸	24	P05810	P11233
他のシグナル 伝達分子			
PI3 kinase ²⁹	85	P26450 O08908 Q64143	P27986 O00459 Q92569
PLC γ ³⁰	150	Q62077	P19174
cPLA2 ³¹	110	P47713	P47712
arg3.1 ³²	55	Q9WV31 Q63053 (rat)	AAF07185
細胞接着および 細胞骨格タンパク質			
N カドヘリン ³³	150	P15116	T19022/Q14923
β -カテニン ³⁴	92	Q02248	P35222
デスマグレイン ³⁵	165	Q61495	
L1 ³⁶	200	P11627	P32004
pp120CAS ³⁷	120	P30999	---
ミオシン ³⁸	205	P46735	P35580
ダイナミン ³⁹	96	Q61358	Q05193/P50570
クラスリン重鎖 ⁴⁰	192	P11442 (rat)	Q00610/P53675
HSP70 ⁴¹	70	P17879	P08107
チューブリン ⁴²	50	---	P05215
コルタクチン ⁴³	80/85	Q60598	Q14247
CortBP-1 ⁴⁴	180/200	O70470 (rat) O88864 (rat)	

【0015】

【表1-3】

タンパク質	分子量 (kDa)	アクセス番号 (SwissProt)	
		マウス	ヒト
他の成分 (MSにより規定される) バスーン ⁴⁵	418	O88778 O88778 (rat)	O43161
ミオシンB重鎖 (非筋肉型) ⁴⁶	229	P46735	P35580
P53結合タンパク質1 ⁴⁷ 密着帯	214	P70399	Q12888
タンパク質ZO-1 ⁴⁸	195	P39447	Q07157
Est525.7仮説の 97.8kDaタンパク質 ⁴⁹	98	---	CAB43675
筋肉細胞膜 関連性タンパク質-3 ⁵⁰	74	Q28623 (rabbit)	---
HSP70様の HS71タンパク質 ⁵¹	71	U73744/P08109	P11142
キネシン軽鎖2 ⁵²	67	O88448	Q07866/Q12840
α -インテルネキシン ⁵³	56	P46660	Q16352
RNA結合 タンパク質FUS/TLS ⁵⁴	53	---	P35637
ホスホフルクトキナーゼ ⁵⁵		P12382	P17858
Est700.75 ⁵⁶		AI428173*	---
Est763.26 ⁵⁷		AI047568*	---
Est536.68 ⁵⁸		AU050964*	---
Est621.15 ⁵⁹		AV153731*	---
Est571.14 ⁶⁰		---	---
Est762.20 ⁶¹		---	---

(* EMBL データベースからのアクセス番号)

【0016】

表1に対する要所

¹ mGluR1 は、代謝調節型グルタミン酸受容体のR1サブユニットのスプライス改変体である。

² N-エチルマレイミド感受性因子 (NSF) は、真核生物ベシクル形成に

必要不可欠な6量体ATPアーゼである。

³ Homer (VESL-1)は、代謝調節型グルタミン酸受容体と相互作用するHomer関連性タンパク質のファミリーの1つである。

⁴ Shankは、シナプス後肥厚における分子足場に関与されるタンパク質のファミリーである。

⁵ AKAP-150/79は、シナプス後肥厚にII型PKAを固着することに関係されるA-キナーゼアンカータンパク質である。

【0017】

⁶ SAP97は、シナプス関連性タンパク質である。

⁷ PKA-R2は、cAMP依存性プロテインキナーゼA(PKA)を複製する調節サブユニットの4つのタイプのうちの1つである。

⁸⁻¹⁰ PKC、およびは、プロテインキナーゼC(PKC)のアイソザイムである。

【0018】

¹¹ PP2Aは、普遍的に発現されるセリン/スレオニンホスファターゼである。

¹² PP5は、N末端でのタンパク質分解性切断により刺激され得る低活性のセリン/スレオニンホスファターゼである。

¹³ PTP1Dは、細胞質ゾルタンパク質のチロシンホスファターゼであり、またSHP2としても知られている。

^{14、15} PP1およびPP2B(カルシニューリン)は、シグナル伝達に関係する細胞質ゾルタンパク質ホスファターゼである。

【0019】

¹⁶ PYK2は、多様なGタンパク質共役型受容体によって、かつ、細胞内Ca²⁺濃度を増大させる細胞外シグナルによって活性化されるタンパク質チロシンキナーゼである。

^{17、18} ERK1およびERK2は、マイトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼシグナル伝達カスケードに関係する細胞外シグナル調節性キナーゼである。

^{19、20} MEK1およびMEK2は、MAPキナーゼキナーゼである。

【0020】

²¹ MKP2は、MAPキナーゼホスファターゼのイソ型である。

²² リボゾームS6キナーゼPsKは、ERKの基質である。

²³ c-Raf1は、MEK1をリン酸化し、かつ、PKCにより刺激されるキナーゼである。

²⁴ Rac1は、GTPアーゼのRhoファミリーのメンバーであり、アクチン細胞骨格の調節に関係する。

²⁵ Rap2は、細胞骨格と会合される低分子量のGTP結合タンパク質である。

【0021】

²⁶ Rasは、刺激性細胞表面受容体に対する非常に多様なリガンドの結合によって活性化される小さなGTPアーゼである。

²⁷ 核因子1(NF1GRP)は核転写因子である。

²⁸ RalAはRas関連性タンパク質である。

²⁹ ホスファチジルイノシトール(PI)-3キナーゼは、PIシグナル伝達経路内のキー酵素である。

³⁰ ホスホリパーゼCも、PIシグナル伝達経路内のキー酵素であり、PI-4,5-P₂からのIP₃およびDAGの形成を触媒する。

【0022】

³¹ 細胞質ゾルホスホリパーゼA2は、グルタミン酸刺激によって活性化される。

³² Arg3.1は即時型初期遺伝子産物である。

³³ N-カドヘリンは、Ca²⁺依存性細胞内接着分子のファミリーのメンバーである。

³⁴ -カテニンは、細胞間相互作用およびシグナル伝達に関係する細胞質ゾルタンパク質である。

³⁵ デスモグレイン(Desmoglein)は、細胞間接着に関与されるデスモソーム会合性糖タンパク質である。

【0023】

- ³⁶ L1は神経細胞接着分子(N-CAM)である。
- ³⁷ p p 1 2 0 C A Sは、カドヘリン-カテニン複合体の成分と相互作用することが知られている細胞接着タンパク質である。
- ³⁸ ミオシンは細胞骨格タンパク質である。
- ³⁹ ダイナミン(Dynamin)は、受容体エンドサイトーシスに関係する調節性タンパク質である。
- ⁴⁰ クラスリン(Clathrin)重鎖は、クラスリンのサブユニットであり、受容体の小胞輸送および内部移行に関係する。

【0024】

- ⁴¹ H S P 7 0は、主要な組織適合性複合体クラスII I Iに位置付けられる熱ショック誘導性タンパク質である。
- ⁴² チューブリンは、細胞骨格の微小管の主成分である。
- ⁴³ コルタクチン(Cortactin)は、糸状アクチン結合タンパク質であり、S r cチロシンキナーゼについての基質である。
- ⁴⁴ コルタクチン結合タンパク質(C o r t B P) 1は、プロリン-リッチシナプス会合性タンパク質である。
- ⁴⁵ バスーン(Bassoon)は、シナプス前神経伝達分子放出部位での細胞骨格の成分である。

【0025】

- ⁴⁶ ミオシンB重鎖は、ミオシンのサブユニットである(上述「32」を参照のこと)。
- ⁴⁷ P 5 3結合タンパク質1は、腫瘍抑制タンパク質P 5 3の調節因子である。
- ⁴⁸ Z O - 1は、C a ²⁺、リン脂質および細胞骨格の組成の変化に対する密着帯の応答を調節することに関係している密着帯タンパク質である。
- ⁴⁹ E s t 5 2 5 . 7は、脳に由来する、未知機能の発現性配列タグである。
- ⁵⁰ 筋肉細胞膜関連性タンパク質-3は、酸性の、両親媒性の膜タンパク質

である。

【0026】

⁵¹ HS71は分子シャペロンタンパク質である。

⁵² キネシン軽鎖2は、微小管ベースの運動タンパク質キネシンのサブユニットである。

⁵³ -インテルネキシンは、ニューロン中間体フィラメントタンパク質である。

⁵⁴ FUS/TLSは、RNA結合タンパク質である。

⁵⁵ ホスホフルクトキナーゼは糖溶解性酵素である。

⁵⁶⁻⁶¹ 未知の機能的相同性または機能を有する発現性配列タグ。

【0027】

表2では、NMDA受容体複合体と会合されると以前に判定された化合物のリストが与えられる。

【0028】

【表2-1】

<u>タンパク質</u>	<u>アクセス番号 (SwissProt)</u>	
	マウス	ヒト
グルタミン酸受容体 サブユニット		
NR1 ¹	P35438	Q05586
NR2A ²	P35436	---
NR2B ³	Q01097	Q13224
NR2C ⁴	Q01098	Q14957
NR2D ⁵	Q03391	---
NR3 ⁶	Q9Z2H0(rat)	Q12919
GluR6 ⁷	P39087	Q13002
GluR7 ⁸	P42264 (rat)	Q13003
足場およびアダプター		
PSD-95 ⁹	Q62108	P78352
ChapSyn110/PSD-93 ¹⁰	O88523	Q15700
Sap102 ¹¹	P70175	Q92796
GKAP/SAPAP ¹²	---	P78335
Yotiao ¹³	AAF27283(rat)	O14869
PKA		
PKA 触媒サブユニット ¹⁴	P05132	P17612
CaM キナーゼ		
CaM キナーゼ II β ¹⁵	P28652	Q13554
チロシンキナーゼ		
Src ¹⁶	P05480	P12931
Fyn ¹⁷	P39688	P06241
小G タンパク質および調節因子		
SynGAP ¹⁸	O88449 (rat)	O60889
他のシグナル伝達分子		
カルモジュリン ¹⁹	---	P02593
NNOS ²⁰	Q9Z0J4 P29476 (rat)	P29475
シトロン ²¹	P49025	O14578

【表2 - 2】

タンパク質	アクセス番号 (SwissProt)	
	マウス	ヒト
細胞接着および 細胞骨格タンパク質		
MAP2B ²²	P20357	P111637
アクチン ²³	O89054	902570
α -アクチン ²⁴	Q61063	P35609
スペクトリン ²⁵	P16546	Q13813
	Q62261	Q01082

【0030】

表2に対する要所

¹⁻⁶ NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2DおよびNR3は、NMDA受容体のサブユニットである。

^{7,8} GluR6および7は、代謝調節型グルタミン酸受容体のサブユニットである。

⁹⁻¹¹ シナプス後肥厚(PSD)-95タンパク質、カプシン110(PSD-93)およびSap102はPDZ-ドメインタンパク質の膜会合性グアニル酸キナーゼ(MAGUK)ファミリーのメンバーであり、NR2AおよびNR2Bサブユニットと相互作用する。

【0031】

¹² グアニル酸キナーゼ会合性タンパク質(GKAP/SAPAP)は、PSD-95を介してNMDA受容体のイオンチャネル特性を調節する。

¹³ Yotiaoは、NMDA受容体の細胞骨格付着に関わるNR1結合タンパク質である。

¹⁴ PKA触媒サブユニットは、調節性サブユニットと組み合わされて、活性プロテインキナーゼAを形成する。

¹⁵ カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKキナーゼ)IIは、LTPおよび記憶に関わるシナプス会合性タンパク質である。

【0032】

^{16、17} SrcおよびFynは、チロシンキナーゼのSrcファミリーのメンバーであり、NMDA受容体媒介性シグナル伝達経路に関係する。

¹⁸ SynGAPは、PSD-95およびSap102のPDZドメインと相互作用するRas-GTPアーゼ活性化タンパク質である。

¹⁹ カルモジュリンは、多数のタンパク質に結合し、かつ、その活性を調節することにより、多くの細胞事象に対する細胞内Ca²⁺濃度の変化のカップリングに関係するCa²⁺結合タンパク質である。

²⁰ nNOSは一酸化窒素合成酵素のイソ型である。

【0033】

²¹ シトロンは、Rhoシグナル伝達経路のエフェクターであり、グルタミン作動性シナプスにてPSD-95と相互作用する。

²² 微小管会合性タンパク質(MAP)2Bは、Aキナーゼアンカータンパク質である。

²³ アクチンは細胞骨格タンパク質である。

²⁴ -アクチン2は、ジストロフィン-糖タンパク質複合体の一成分である。

。

²⁵ スペクトリンは細胞骨格タンパク質である。

【0034】

好ましくは複合体は、表1および/または表2に列挙された成分の群から選択される3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の異なる成分を含有している。

【0035】

より好ましくは、複合体は、サブユニットNR1、NR2A、NR2B、PSD-95と、表1に列挙された成分の群から選択される少なくとも1つの成分とを含有している。

【0036】

最も好ましくは、複合体は、表1および表2に列挙された成分のすべてを含有している。

【0037】

従って、好ましい実施例において、複合体は、5つのカテゴリー、すなわち、神経伝達物質受容体タンパク質（例えば、NR1、NR2、mGluR1）、細胞接着タンパク質（例えば、N-カドヘリン、L1）、アダプタータンパク質（例えば、PSD-95）、シグナル伝達ペプチド（例えば、PKC、PKA、CaMキナーゼ、リン酸、チロシンキナーゼ）、および、細胞骨格タンパク質（例えば、アクチン）に分類され得る成分タンパク質を含有している。有利には、複合体は、これら5つのカテゴリーのそれぞれからの少なくとも1つの成分タンパク質を含有している。

【0038】

本発明に係る第1の態様の好ましい実施例において、複合体は、下記のステップを含むペプチド親和性クロマトグラフィー法により得ることができる。

(i) 動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集するステップ。

【0039】

PSD-95に結合するペプチドと、サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップ。

【0040】

組織のサンプルは、その中樞神経系(CNS)においてNMDA受容体を発現する任意の動物から採取され得る。簡便には、組織のサンプルは、本発明の第1の態様に従って多タンパク質複合体を発現する動物から採取される。

【0041】

好ましくは、組織のサンプルは哺乳動物から採取される。より好ましくは、組織のサンプルはヒト起源である。

【0042】

代替の実施例において、組織のサンプルはナマコ、*Aplysia californica*である。

有利には、組織サンプルは脳から採取される。

簡便には、組織サンプルは、脳内の解剖学的に慎重な領域またはサブ領域、例えば、規定皮質、海馬領域またはサブ領域から採取される。

【0043】

好ましくは、PSD-95に結合するペプチドは、SIESDVまたはKPL LDAQRGSFPWVQQTRVである。

【0044】

適切には、複合体はペプチド親和性クロマトグラフィーによって単離される。

【0045】

本発明の第2の態様では、本発明の第1の態様に係る複合体のサブ複合体が提供される。このサブ複合体は、表1および表2で同定される成分から選択される2つ以上のポリペプチド成分を含有し、少なくとも1つのポリペプチド成分は、表1に列挙された群から選択される。

【0046】

従って、本発明では、本発明の第1の態様に係るNMDA受容体複合体のサブ複合体が提供される。

【0047】

下記のサブ複合体は、本発明の範囲から除外される：

(i) 成分Ras、Raf、MEK、ERK、RSK、PI3K、Ral、およびcPLA2のうち2つ以上からのみ構成されるサブ複合体。

(ii) 成分N-カドヘリン、 γ -カテニン、HSP70、およびZ0-1のうち2つ以上からのみ構成されるサブ複合体。

【0048】

好ましくは、サブ複合体は、表1からの少なくとも1つの成分と、表2からの少なくとも1つの成分とを含有している。

【0049】

簡便には、サブ複合体は、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の成分を含有している。

【0050】

本発明のサブ複合体は、NMDA受容体を含有しなくてもよいことが理解されよう。従って、1つの実施例では、サブ複合体はNR1成分を含有していない。

【0051】

本発明の第3の態様では、本発明の第1の態様に係る多タンパク質成分を生成

する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 動物の中枢神経系から組織のサンプルを収集するステップ。

(i i) 表1および表2で同定される成分の任意の1つ以上に結合するペプチドと、サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップ。ここでペプチドは、抗体、またはその抗原結合フラグメントの何れでもない。

【0052】

従って、本発明では、NMDA受容体複合体を生成する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 動物の中枢神経系から組織のサンプルを収集するステップ。

(i i) 表1および表2で同定される成分の任意の1つ以上に結合するペプチドと、サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップ。ここでペプチドは、抗体、またはその抗原結合フラグメントの何れでもない。

【0053】

複合体は、ペプチドが結合する成分を含有していることが理解されよう。

【0054】

好ましくは、複合体を単離するために使用されるペプチドは、複合体の1つ以上の成分(PDZドメインを含む)に、前記成分のPDZドメインを介して結合する。PDZドメインを含有する代表的成分は、PSD-95、nNOS、SHANK、SAP-102、Chapsyn-110/PSD-93、Homer/Vesl-1およびCort-BP1、ZO-1を含む。

【0055】

「PDZドメイン」とは、多くのタンパク質で見出される約90残基の反復を含有するペプチドドメイン(DHRドメインまたはGLGF反復としても知られる)を意味するものとする。このようなドメインは、イオンチャネル、受容体クラスター化および、エフェクター因子に対する受容体の連結に関係している。PDZドメインは、タンパク質認識モジュールであり、PDZドメインのいくつかは、周知のカルボキシ末端トリペプチドモチーフS/TXVを非常に高い特異性で含有するタンパク質である。他のPDZドメインは同型2量体を構成し、ニューロン酵素-酸化窒素合成酵素のPDZドメインは、PSD-95のPDZドメ

インに結合し、相互作用はそのシナプス会合に関係している (Morais, Cabralら, 1996, Nature 382(6592); 649~52)。

【0056】

本発明に係る第3の態様の好ましい実施例において、複合体はペプチド親和性クロマトグラフィーを用いて単離される。この方法において、目的のタンパク質/複合体は、ペプチドリガンドについてその親和性を探索することにより回収される。典型的には、前記ペプチドは樹脂に固定化され、次に洗浄され、そしてクロマトグラフィーカラムに移される。目的のタンパク質/複合体を含有するサンプルはカラムにより洗浄されるので、タンパク質/複合体はペプチドに結合し、このように単離される。結合された目的のタンパク質/複合体は、次に、樹脂から取り出せばよい。取り出すには、例えば、遊離ペプチドで溶出させるか、または、固相の組成を変化(例えば、pHまたはイオン強度を変化することにより)させればよい。

【0057】

ペプチド親和性クロマトグラフィーによる組織サンプルからのタンパク質の単離および精製の例は、Murrayら(1998), J. Pept. Res. 52, 375~83およびNecinaら(1998), J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 715, 191~201に記載されている。

【0058】

好ましい実施態様において、PSD-95に結合する複合体はペプチドを用いて単離される。

【0059】

有利には、ペプチドはヒトNMDA-R2Bサブユニット(Swiss Protエントリーアクセス番号Q13224を参照のこと)のC末端の領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含有している。

【0060】

ヒトNMDA-R2BサブユニットのC末端における最後の100アミノ酸の配列は、次の通りである。

N P F I P T F G D D Q C L L H G S K S Y F F R Q P T V A G A S K A R P D

F R A L V T N K P V V S A L H G A V P A R F Q K D I C I G N Q S N P C V
P N N K N P R A F N G S S N G H V Y E K L S S I E S D V。

【0061】

好ましくは、ペプチドは、アミノ酸配列S I E S D V、例えば、アミノ酸配列K L S S I E S D Vを含有している。

【0062】

最も好ましくは、ペプチドはS I E S D Vである。

【0063】

あるいは、ペプチドは、SynGAPサブユニットのC末端の領域のアミノ酸配列（配列アクセス番号について表2を参照のこと）と同一であるアミノ酸配列を含有していてもよい。SynGAPの領域は、PSD-95の第3のPDZドメインに結合すると考えられる。

【0064】

ヒトSynGAPサブユニットのC末端残基の配列は、-R G S F P P W V Q Q T R Vであり、そのうちの少なくとも4アミノ酸（すなわち、Q T R V）はPSD-95への結合に関与することが考えられる。

【0065】

好ましくは、ペプチドはQ T R Vであるか、またはそれを含有している。

【0066】

より好ましくは、ペプチドは、R G S F P P W V Q Q T R Vであるか、またはそれを含有している。

【0067】

有利には、ペプチドは、ラットSynGAPサブユニットのC末端の配列、従ってK R L L D A Q R G S F P P W V Q Q T R Vであるか、またはそれを含有している。

【0068】

本発明の第4の態様では、本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体、または、本発明の第2の態様に係るサブ複合体を生成する別の方法が提供され、前記方法は下記のステップを含む。

(i) 動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集するステップ。

(i i) 多タンパク質複合体中の成分を保持する条件下で、表1に列挙された成分から選択される成分に結合する分子と、サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップ。

【0069】

従って、本発明では、NMDA受容体複合体を生成する方法が提供され、この方法は、下記のステップを含む。

(i) 動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集するステップ。

(i i) NMDA受容体を保持する条件下で、表1に列挙された成分から選択される成分に結合する分子と、サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップ。

【0070】

複合体は、分子が結合する成分を含有していることが理解されよう。

【0071】

本発明の第5の態様では、本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体、または、本発明の第2の態様に係るサブ複合体を生成する方法が提供され、前記方法は下記のステップを含む。

(i) 本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体を発現する動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集するステップ。ここで、表1に示された成分のうち、少なくとも1つの成分の発現が、野生型多タンパク質複合体を発現する動物との比較において改変される。

(i i) (異常な)複合体の成分に結合する分子と、サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップ。

【0072】

従って、本発明では、ポリペプチドサブユニットNR1と、表1に列挙された成分の群から選択される少なくとも1つの成分とを含有するNMDA受容体複合体を作製する方法が提供され、前記方法は下記のステップを含む。

(i) NMDA受容体複合体を発現する動物の中樞神経系から組織のサンプルを収集するステップ。ここで、表1に示された成分のうち、少なくとも1つの成分

の発現が改変される。

(i i) 複合体の成分に結合する分子と、サンプルとを接触させることにより複合体を単離するステップ。

【0073】

好ましくは、組織サンプルは、下記の動物の中樞神経系から採取することができる。

(i) 表1に示された1つ以上の成分を発現しないような遺伝子「ノックアウト」動物；

(i i) 表1に示された1つ以上の成分の変異体形態を発現するような動物；または

(i i i) 表1に示された1つ以上の成分を過剰発現するような動物（例えば、トランスジェニック動物）。

【0074】

従って、多タンパク質複合体の異常体は、正常な動物（例えば、遺伝子改変されていない非ヒト動物）から得られる複合体との比較において、成分を欠損するか、変異体成分を含むか、または、過剰な成分を含有するような複合体を含む。

【0075】

簡便には、動物は、トランスジェニック非ヒト動物であり、例えば、遺伝子改変された非ヒト動物である。この遺伝子改変非ヒト動物は、多タンパク質複合体に含まれる1つ以上の成分の変異体形態を発現するように、または、多タンパク質複合体に含まれる1つ以上の成分を過剰発現するように遺伝子改変されたものである。有利には、トランスジェニック動物は、げっ歯類、例えばマウスまたはラットである。

【0076】

トランスジェニック動物の生成および使用は今や当該分野において広く知られている（例えば、Cameron, 1997, Mol. Biotechnol. 7:253~65, およびCampbellら, 1996, Mol. Psychiatry. 1:105~20を参照のこと）。実際、いくつかのグループが、変異体、または、過剰発現されるNR2サブユニットを含む異常なNMDA受容体を発現するトランスジェニックマウスを生成した旨、報告している(S

uchanekら, 1997, Biol. Chem. 378:929~934; Okabeら, 1998, J. Neurosci. 18:4177~88; Tangら, 1999, Nature 401:63~60; Sprengelら, 1998, Cell 92:279~289)。

【0077】

本発明に係る第4および第5の態様の好ましい実施例において、多タンパク質複合体の成分に結合する分子は、抗体、またはその抗原結合フラグメントである。

【0078】

本発明の第5の態様に係る方法において、複合体の成分に結合する分子は、ペプチドでもよいし(例えば、ペプチド親和性クロマトグラフィーにおける使用のために)、または、抗体もしくはその抗原結合フラグメントでもよい(例えば、免疫親和性および/もしくは免疫沈降技術のために)ことが理解されよう。

【0079】

抗体の「抗原結合フラグメント」とは、Fab様分子(Betterら(1988)Science 240, 1041)、Fv分子(Skerraら(1988)Science 240, 1038)、1本鎖Fv(ScFV)分子(ここではV_HおよびV_Lパートナードメインが柔軟なオリゴペプチドを介して連結される(Birdら(1988)Science 242, 423; Hustonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879))、および、単離されたVドメイン(Wardら(1989)Nature 341, 544)を含有する単ドメイン抗体(dAbs)を含むものとする。特定の結合部位を保持した抗体フラグメントの合成に関する技術の一般的な概説は、Winter & Milstein(1991)Nature 349, 293~299に見出される。

【0080】

本発明の多タンパク質複合体を単離できる代表的な方法は、免疫沈降および免疫親和性クロマトグラフィーを含む。このような技術は、当該分野において広く知られている(例えば、Scopes, 1994, タンパク質精製:原理および実施, 第3版, Springer-Verlag, New York; HarlowおよびLane(編)抗体:実験室マニュアル, Cold Spring Harbor Pressを参照のこと)。

【0081】

多タンパク質複合体を生成するための本発明の方法において、多タンパク質複

合体が単離される組織のサンプルは、脳および脊髄を含む中枢神経系の任意の部分から得ることができる。

【0082】

好ましくは、組織は、脳から得られる。

【0083】

より好ましくは、組織は前脳を含むか、または前脳から（例えば海馬もしくは皮質から）得られる。

【0084】

当業者によれば、本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体、または、本発明の第2の態様に係るそのサブ複合体は、NMDA受容体を発現する任意のドナー動物から得られる成分を含んでいてもよいことが理解されよう。簡便には、NMDA受容体は、多タンパク質複合体の成分として発現される。

【0085】

好ましくは、複合体もしくはサブ複合体の成分は、ヒトから得られる。

【0086】

さらに当業者によれば、多タンパク質複合体が得られる組織のサンプルは、成体、若体、または新生仔の動物から採取できることが理解されよう。

【0087】

さらに、異なる年齢の動物から得られる多タンパク質複合体の組成には、差異が存在し得ることが理解されよう(例えば、Sansら, 2000, J. Neuroscience 20:1 260~71を参照のこと)。

【0088】

本発明の第3、第4および第5の態様の好ましい実施例において、多タンパク質複合体を生成する方法は、さらに、組織が採取される動物の年齢を選択するステップを（ステップ1の前に）含む。

【0089】

本発明の第6の態様では、本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体のサブ複合体を作製する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 表1および表2で同定される成分から選択される第1の成分をコードする

遺伝子構築物を、宿主細胞において発現させるステップ。

(i i) 表 1 および表 2 で同定される成分から選択される第 2 の成分をコードする遺伝子構築物を、宿主細胞において発現させるステップ。

(i i i) 宿主細胞培養物から成分を単離するステップ。

(i v) 成分を互いに接触させるステップ。

ここで、第 1 の成分と第 2 の成分とは異なり、少なくとも一方の成分が表 1 に示された成分から選択される。

【 0 0 9 0 】

従って、本発明では、NMDA 受容体のサブ複合体を作製する方法であって、上記ステップ (i) ~ (i v) を含む方法が提供される。

【 0 0 9 1 】

このような方法は、さらに、成分を互いに接触させるステップの前に、表 1 および表 2 で同定される成分から選択される少なくとも 1 つのさらなる成分をコードする遺伝子構築物を、宿主細胞において発現させるステップを含んでいてもよい。このようにして、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つ以上の異なる成分を含有するサブ複合体を生成することができる。

【 0 0 9 2 】

当業者によれば、遺伝子成分は、多タンパク質複合体に含まれる 1 つ以上の成分をコードしてもよいことが理解されよう (すなわち、複合体の各成分は、別々の遺伝子構築物によってコードされなくてもよい) 。

【 0 0 9 3 】

ステップ (i) における宿主細胞は、ステップ (i i) における宿主細胞と同じであってもよく、ステップ (i v) は、少なくとも 2 つの成分が同じ宿主細胞において発現されるときに生じ得る。従って、この場合、ステップ (i v) はステップ (i i i) よりも前に行うことができる。

【 0 0 9 4 】

宿主細胞において遺伝子成分を発現させる方法は、当該分野において広く知られている。従って、多タンパク質複合体の成分をコードする DNA は、公知の技術に従って使用され、本明細書中に含まれる技術を考慮して適切に改変され、発

現ベクターを構築し、これは次に、本発明のポリペプチドの発現および生成のために適切な宿主細胞を形質転換するために使用される。このような技術は、Rutterらに対して1984年4月3日に発行された米国特許第4,440,859号、Weissmanに対して1985年7月23日に発行された同第4,530,901号、Crowlに対して1986年4月15日に発行された同第4,582,800号、Markらに対して1987年6月30日に発行された同第4,677,063号、Goeddelらに対して1987年7月7日に発行された同第4,678,751号、Itakuraらに対して1987年11月3日に発行された同第4,704,362号、Murrayに対して1987年12月1日に発行された同第4,710,463号、Toole, Jr.らに対して1988年7月12日に発行された同第4,757,006号、Goeddelらに対して1988年8月23日に発行された同第4,766,075号、Stalkerに対して1989年3月7日に発行された同第4,810,648号で開示された技術を含んでおり、これらの全ては本明細書の内容をなすものとして援用される。

【0095】

多タンパク質複合体の成分をコードするDNAは、適切な宿主に導入させるために広範に多様な他のDNA配列に結合していてもよい。同伴のDNAは、宿主の性質、宿主へのDNAの導入の様式、および、エピソーム維持かまたは取り込みの何れが所望されるのかに拠るであろう。

【0096】

一般に、DNAは、発現させるため、適切な方向で、かつ、正確なリーディングフレームでプラスミドのような発現ベクターに挿入される。必要であれば、DNAは、所望の宿主により認識される適切な転写および翻訳調節制御ヌクレオチド配列に連結されてもよく、このような制御は一般に発現ベクター中で利用できる。次に、ベクターは標準的な技術により宿主に導入される。一般には、宿主の全てがベクターにより形質転換されるのではないであろう。従って、形質転換される宿主細胞を選択することが必要であろう。一つの選択技術としては、任意の必要な制御エレメントを伴って、抗体耐性のような形質転換細胞における選択可能な耐性をコードするDNA配列を、発現ベクターに導入することが含まれる。あるいは、このような選択可能な耐性についての遺伝子は別のベクター上に存在し得、これは所望の宿主細胞を同時形質転換するために使用される。

【0097】

成分をコードする組換えDNAによって形質転換された宿主細胞は、次に、本明細書で開示される技術を考慮し、当業者に知られている十分な時間および適切な条件下で培養され、ポリペプチドを発現させてやり、次に、ポリペプチドは回収される。

【0098】

多くの発現系が知られており、細菌(例えば、*E. coli*および*Bacillus subtilis*)、酵母(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状真菌(例えば*Aspergillus*)、植物細胞、動物細胞、昆虫細胞が含まれる。

【0099】

ベクターは、他の細胞型、例えば、非原核生物細胞型での発現のために用いられる場合でも、ベクターは、原核生物を増殖させるために、ColEI oriのような原核生物レプリコンを含んでいる。また、ベクターは、それで形質転換された*E. coli*のような細菌宿主細胞において遺伝子の発現(転写または翻訳)を指令する能力のある原核生物プロモータのような、適切なプロモーターを含んでいてもよい。

【0100】

プロモータは、RNAポリメラーゼの結合および転写が起こることを許容するDNA配列により構成される発現制御要素である。代表的な細菌宿主と共存し得るプロモータ配列は、典型的には、本発明のDNAセグメントの挿入に便利である制限部位を含んでいるプラスミドベクターに備えられる。

【0101】

典型的な原核生物ベクタープラスミドは、Biorad Laboratories(Richmond, CA, USA)から入手できるpUC18, pUC19, pBR322もしくはpBR329、または、Pharmacia, Piscataway, NJ USAから入手できるpTrc99AもしくはpKK223~3である。

【0102】

典型的な哺乳動物細胞ベクタープラスミドは、Pharmacia, Piscataway, NJ, USAから入手できるpSVLである。このベクターは、クローン化遺伝子の発現を生じさせるためにSV40後期プロモーターを用いており、最も高いレベルの発

現が、COS-1細胞のようなT抗原生成細胞において見出される。

【0103】

誘導性の哺乳動物発現ベクターの例はpMSGであり、Pharmaciaからまた入手できる。このベクターは、クローン化遺伝子の発現を生じさせるためにマウス乳腫瘍ウイルス長期反復のグルココルチコイド誘導性プロモーターを用いている。

【0104】

有用な酵母プラスミドベクターは、pRS403~406およびpRS413~416であり、一般に、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USAから入手できる。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405およびpRS406は、酵母取り込みプラスミド(Yeast Integrating plasmid)(YIps)であり、酵母選択マーカのHIS3、TRP1、LEU2およびURA3を組み込む。プラスミドpRS413~416は、酵母セントロメアプラスミド(YCp)である。

【0105】

相補的な突出末端を介してベクターに作動可能にDNAを連結する方法として、多様な方法が開発されている。例えば、相補的なホモポリマーラクトが、DNAセグメントに付加され、ベクターDNAに挿入され得る。次に、ベクターとDNAセグメントとは、相補的なホモポリマーテイル間の水素結合を介して結合されて、組換えDNA分子を構成する。

【0106】

1つ以上の制限部位を含んでいる合成リンカーによれば、ベクターにDNAセグメントを結合する別の方法が提供される。先に述べたようにエンドヌクレアーゼ制限消化により作製されるDNAセグメントは、バクテリオファージのT4 DNAポリメラーゼ、または、E.coli DNAポリメラーゼI、突出する3'-単鎖の末端をそれらの3'-5'-エンドヌクレアーゼ活性で除去し、それらのポリメラーゼ活性で陥凹された3'末端を充填する酵素で処理される。

【0107】

従って、これらの活性の組み合わせによって、平滑末端化されたDNAセグメ

ントが生成される。平滑末端化されたセグメントは、次に、バクテリオファージ T4 DNAリガーゼのような平滑末端化DNA分子のライゲーションに触媒作用を及ぼすことができる酵素の存在下で、モル大過剰のリンカー分子とともに温置(incubate)される。従って、反応の生成物は、末端にポリマーリンカー配列を備えるDNAセグメントである。次に、これらのDNAセグメントは、適切な制限酵素で切断され、そして発現ベクターに連結される。発現ベクターは、DNAセグメントの末端に適合する末端を生成する酵素で切断されている。

【0108】

多様な制限エンドヌクレオチドを含有する合成リンカーは、International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, USAを含む多くの供給源から市販されている。

【0109】

多タンパク質複合体の成分をコードするDNAを改変するための望ましい方法は、Saikiら(1988)Science 239, 487~491において開示されるようにポリメラーゼ連鎖反応を利用することである。

【0110】

この方法において、酵素的に増殖されるDNAは、2つの特定のオリゴヌクレオチドプライマーで挟まれる。これら特定のオリゴヌクレオチドプライマーは、増殖されたDNAにそれ自身取り込まれる。この特定プライマーは、当該分野で知られた方法を用いて発現ベクターにクローニングするために使用され得る制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含んでもよい。

【0111】

サブ複合体の成分は、当該分野で知られた方法(例えば、Scopes, 1994, タンパク質精製:原理および実施、第3版、Springer-Verlag, New Yorkを参照のこと)によって、宿主細胞培養物から単離することができる。例えば、サブ複合体の成分は、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用または親和性方法を利用することにより宿主細胞培養物から単離できる。

【0112】

望むなら、サブ複合体は、公知の方法を用いることにより脂質2重層で再構成

してもよい。

【0113】

本発明の第7の態様では、本発明に係る第5の態様の方法で用いるための宿主細胞が提供され、この宿主細胞は、表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードする1つ以上の遺伝子構築物を含んでいる。

【0114】

さらに本発明では、表1および表2に列挙された成分の群から選択される2つ以上の成分をコードする1つ以上の遺伝子構築物を含む宿主細胞が提供される。

【0115】

好ましくは、宿主細胞は、さらに、表2に列挙された成分の群から選択される成分をコードする1つ以上の遺伝子構築物を含んでいる。

【0116】

例えば、宿主細胞は、表1および表2に列挙された2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の成分をコードする遺伝子構築物を含んでいてもよい。

【0117】

代表的な宿主細胞としては、原核生物細胞株（例えば、E. coli 発現系）のほかに、哺乳動物細胞株、昆虫細胞株、酵母および他の真核生物細胞株からなる群より選択される細胞が挙げられる。

【0118】

好ましくは、宿主細胞は哺乳動物細胞であるか、または、このような細胞、例えばヒト細胞から得られるものである。

【0119】

より好ましくは、宿主細胞は、ニューロンであるか、または、ニューロンから得られる細胞（例えば、一次ニューロン培養物や、幹細胞から得られるニューロン（幹細胞は、ニューロスフェアにおいて見出される細胞のように、ニューロン幹細胞であるのみならず、多様性胚細胞でもある））であり、かつ、PC12細胞のような一般に使用されている細胞株である。

【0120】

本発明の第8の態様では、本発明の宿主細胞から単離される亜細胞画分が提供

され、この亜細胞画分はその中に、本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体、または、本発明の第2の態様に係るサブ複合体を含有している。

【0121】

従って、本発明では、本発明の宿主細胞から単離される亜細胞画分が提供され、この亜細胞画分はその中に、NMDA受容体複合体またはそのサブ複合体を含有している。

典型的には、亜細胞画分は原形質膜であるか、またはそれを含んでいる。

【0122】

簡便には、亜細胞画分は、シナプトソーム、シナプス前および/もしくはシナプス後の末端、または、ソーマ(soma)を含有するか、またはそれを含んでいる。

【0123】

あるいは、亜細胞画分は細胞質ゾル画分を含有するか、またはそれを含んでいる。

【0124】

原形質膜は、当該分野で知られた方法により形質転換された宿主細胞から精製することができる。

【0125】

本発明の第9の態様では、本発明の第2の態様に係る多タンパク質複合体のサブ複合体を作製する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) タンパク質 - タンパク質間相互作用を妨げる薬剤と、本発明の第1の態様に係る複合体とを接触させるステップ。

(ii) それにより形成されるサブ複合体を単離するステップ。

【0126】

従って、本発明では、本発明の第2の態様に係るNMDA受容体複合体のサブ複合体を作製する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) タンパク質 - タンパク質間相互作用を妨げる薬剤と、本発明の第1の態様に係る複合体とを接触させるステップ。

(ii) それにより形成されるサブ複合体を単離するステップ。

【0127】

本発明に係る第9の態様の好ましい実施例において、多タンパク質複合体が、上述の方法を用いることにより単離される。サブ複合体が、複合体に含まれる2つの成分の規定相互作用について競合する競合ペプチドを、複合体に添加することによって構成され、それにより、元来の複合体から1つ以上の成分が放出され、1つ以上のサブ複合体が構成される。

【0128】

本発明の第10の態様では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常または状態を処置するための候補化合物を同定する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 試験される化合物を選択するステップ。

(ii) 本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体、または、本発明の第2の態様に係るサブ複合体の何れかと、試験化合物とを接触させるステップ。

(iii) 試験される化合物が、複合体またはサブ複合体と相互作用するか否かを判定するステップ。

【0129】

ここで、複合体またはサブ複合体と相互作用する試験化合物は、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害の徴候を軽減する、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害の発病を防止もしくは遅延する、ならびに/または、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる欠損を修正するための候補化合物として同定される。

【0130】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法が提供され、前記方法は、上記ステップ(i)~(iii)を含み、ここで、複合体またはサブ複合体と相互作用する試験化合物は、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害の徴候を軽減する、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害の発病を防止もしくは遅延する、ならびに/または、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる欠損を修正するための候補化合物として同定される。

【0131】

例えば、本発明の多タンパク質複合体は、薬物スクリーニングのための96ウェルプレートまたは他の適切な容器に固定化される複合体を与えるように適合させてもよい。従って、抗体またはペプチドが（直接的または間接的に）プレートに連結されるようにペプチド親和性法または抗体親和性法を適合させることができる。次に、脳抽出物、または複合体の他の供給源を、プレート中で温置(incubate)することができ、その結果、多タンパク質複合体が固定化される。そして、このような複合体と会合されない分子は、例えば、洗浄により除去される。多タンパク質複合体における特定の成分の存在は、ELISA技術（標的に抗体を結合し、酵素結合2次抗体を用いて、結合された抗体を観察する）によって検定することができる。あるいは、特定の基質を用いて酵素試験法を行ってもよい。（例えば、適切な反応成分を伴って96ウェルプレート中の多タンパク質複合体に、PKAについてのペプチド基質を適用すると、ペプチドのリン酸化が標準的な方法（例えば、加水分解化ATPの比色試験法）を用いて観測されるであろう。複合体に含まれる特定成分の解離（固定化多タンパク質複合体に試験化合物を適用して生じる）は、同じ方法を用いて観測され得る。）

上述の方法は、高処理量分析のための一次スクリーニングの代表例である。二次スクリーニングは、クロマトグラフィー、SDS-PAGE法（例えば、ウェスタンブロット検出）および酵素試験法のような相補的な試験法を含んでいてもよい。

【0132】

スクリーニングの後の段階は、本発明の多タンパク質複合体、サブ複合体またはそれらの成分を発現する細胞（トランスジェニックマウスから単離されるニューロンを含む）の使用を含んでいてもよい。

【0133】

「中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態」とは、NMDA受容体を含有する多タンパク質複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を含むものとする。代表的な異常および状態としては、学習的欠陥、ならびに、NMDA受容体に関わる多数の精神医学的および神経学

的な異常（例えば、精神分裂病、鬱病、脳卒中、癲癇および神経変性異常）が含まれる。さらに、学習拳動、集団内の自然変分に関わる注意および記憶獲得における異常を含めて考えることにする。また、直接的な頭部外傷、脳手術、脳卒中から生じるような傷害後の異常な脳機能を含めて考えることにする。

【0134】

多タンパク質複合体またはそのサブ複合体と「相互作用する」とは、多タンパク質複合体、サブ複合体もしくはそれらの成分の特性を、ポジティブもしくはネガティブの何れかに調節すること、ならびに/または、多タンパク質複合体、サブ複合体もしくはそれらの成分の解離を誘導することを含むことにする。

【0135】

本発明に係る第10の態様の好ましい実施例において、試験される化合物は、多タンパク質複合体またはそのサブ複合体と接触され、そして、多タンパク質複合体またはサブ複合体の酵素成分の活性が測定される。例えば、試験される化合物が多タンパク質複合体またはサブ複合体のプロテインキナーゼ成分またはホスファターゼ成分の活性を、ポジティブまたはネガティブの何れかに調節する能力を判定することによって、候補化合物を同定することができる。このような酵素の活性を測定するための方法は当該分野において公知である（上述を参照のこと）。

【0136】

あるいは、試験される化合物が多タンパク質複合体またはそのサブ複合体の解離を誘導する能力を判定することによって、候補化合物を同定することができる。複合体またはサブ複合体の解離は、幾つかの方法を用いて評価することができる。例えば、解離される特定の成分に対する抗体、または、放射標識されたタンパク質および他の方法を用いることができる。

【0137】

本発明の第11の態様では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 試験される化合物を選択するステップ。

(i i) 表 1 に列挙された群から選択される成分と、試験化合物とを接触させるステップ。

(i i i) 試験される化合物が、前記成分の特性を調節するか否かを判定するステップ。

【 0 1 3 8 】

ここで、成分の特性を調節する試験化合物は、中枢神経系における N M D A 受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態の徴候を軽減する、中枢神経系における N M D A 受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態の発病を防止もしくは遅延する、ならびに / または、中枢神経系における N M D A 受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に関連付けられる欠損を修正するための候補化合物として同定される。

【 0 1 3 9 】

従って、本発明では、中枢神経系における N M D A 受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法が提供され、この方法は上述のステップ (i) ~ (i i i) を含む。ここで、成分の特性を調節する試験化合物は、中枢神経系における N M D A 受容体の複合体機能障害に関連付けられる異常および状態の症状を軽減する、中枢神経系における N M D A 受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態の発病を防止もしくは遅延する、ならびに / または、中枢神経系における N M D A 受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態に関連付けられる欠損を修正するための候補化合物として同定される。

【 0 1 4 0 】

例えば、表 1 からの下記成分の活性 / 機能は、活性を測定するための一般的な方法を用いて試験することができる。

成分	リン酸化 試験 *1	活性依存性 結合試験 *1	脂質 試験 *2
PKA(R2 触媒サブユニット)	+		
PKC(ベータ ガンマ エpsilon)	+		
PP2A	+		
PP5	+		
PTP1D	+		
Pyk2	+		
ERK (1/2)	+		
MEK (1/2)	+		
MKP2	+		
RSK2	+		
PI3K	+		
c-RAF1	+		
RAC-1		+	
RAP2		+	
RAS		+	
NF1GRP		+	
HSP-70		+	
PLC-ガンマ			+
cPLA2			+

* 1 Gille & Downward (1999) J. Biological Chemistry 274(31):22033~22040を参照のこと。

* 2 Heinzら (1998) J. Mol. Biol. 275:635~650 および Othmanら (1996) Biochim. Biophys. Acta. 1303:92~102 を参照のこと。

【 0 1 4 1 】

「成分の特性を調節する」とは、酵素成分の触媒活性を（ポジティブまたはネガティブの何れかに）調節すること、および、酵素成分が多タンパク質複合体またはサブ複合体に含まれる1つ以上の他の成分と相互作用する能力を（ポジティブまたはネガティブの何れかに）調節することを含むことにする。1つ以上の他の成分は、表1または表2に列挙された成分の何れかであり得ることが理解されよう。

【0142】

本発明に係る第11の態様の好ましい実施例において、ステップ(iii)は、試験化合物が、多タンパク質複合体またはそのサブ複合体に含まれる1つ以上の他の成分と相互作用する成分の能力を(ポジティブまたはネガティブの何れかに)調節するか否かを判定するステップを含む。

【0143】

有利には、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための化合物を同定するための本発明の方法は、学習的欠陥、精神医学的異常および/または神経学的異常に対する処置の効能についての1つ以上のスクリーニングにおいて、試験化合物を試験するステップを含む。

【0144】

例えば、試験化合物は、さらに、下記のタイプのスクリーニング試験を用いて評価することができる。

【0145】

1. 培養されたニューロン、組織切片または外殖片を使用する神経機能のインビトロ分析。

【0146】

化合物は、ニューロン膜特性、遺伝子発現および神経伝達因子放出に対する効果について公知の方法(例えば、神経伝達因子の電気生理学、インサイチュハイブリダイゼーション、HPLC測定)を用いて試験することができる。

【0147】

1次スクリーニング試験において、本発明の多タンパク質複合体を調節する化合物の効果は、ニューロン細胞に対して試験されるであろう。但し、試験法は、NMDA受容体に関わる生物学的機構を反映させる。また、NMDA受容体機能に依存していない生理学的機構を観測することにより、化合物作用の特異性について行う制御試験法もあるであろう。NMDA受容体機能依存性の試験法の例としては、下記の測定が含まれるであろう。

【0148】

本発明の多タンパク質複合体の発現成分を測定すること。

パッチクランピングおよび他の電気生理学的方法を用いてNMDA受容体チャネル特性を測定すること。

NMDA受容体または他の神経伝達因子受容体に結合する化合物（アゴニストおよびアンタゴニスト）を適用したときにおける、細胞および多タンパク質複合体成分の応答を測定すること（これらの応答としては、神経伝達因子により誘導される細胞死、ならびに、シナプス、軸索、および樹状細胞における構造変化が含まれ得るであろう）。

シナプス伝達における変化を測定すること。

そして、NMDA受容体依存性生理学を調節する化合物は、無傷の動物におけるスクリーニングに用いられるであろう。

【0149】

2. 動物モデルにおけるニューロン機能のインビボ分析

化合物は、公知の方法（例えば、電気生理学、微小透析、迷路における学習および記憶）を用いることにより、ニューロン膜特性、神経伝達因子放出、および挙動に関する効果について試験することができる。例えば、げっ歯類および霊長類について、認知機能に及ぼす候補化合物の効果を試験できるであろう。このような試験では、注意が、多タンパク質複合体においてNMDA受容体および他の成分を含むことが知られている表現型に集中されるであろう。例えば、学習試験、慢性的な痛みに対する応答、および、薬物習慣性試験が採用できるであろう。

【0150】

3. 変異体/トランスジェニックげっ歯類を用いた研究

動物におけるスクリーニングとしては、変異体マウスにおけるスクリーニングが含まれるであろう。例えば、薬物が、PSD-95に結合するタンパク質を調節することが知られている場合、この薬物により、PSD-95変異体マウスが得られるであろう。薬物が単一のタンパク質に特異的に結合する場合、インビボでの薬物特異性に関する有用な制御は、そのタンパク質についての遺伝子変異を保有するマウスに及ぼされる薬物の効果を試験することであろう。試験法は、細胞の供給源が変異体マウスにより得られる点を除き、上述の試験法と同一であろう。具体的には、本発明者らは、PSD-95変異体マウスの例において、PS

D - 95 結合タンパク質を妨げる化合物により生理学的な変化が生じるか否かを試験するであろう。

【0151】

4. CNSに対する障害を有する動物における回復のインビボ解析

また、スクリーニングは、(例えば、脳卒中、薬物、脳腫瘍または手術損傷により)神経系に対する障害または損傷を受けた動物について行うことができるであろう。このタイプのスクリーニングにおいては、未処置とされた動物が、脳機能の回復(学習塑性の態様)について観察され、試験化合物が、回復または学習を増強する能力について評価されるであろう。

【0152】

本発明のもう一つの態様では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 表1に列挙された成分の特性を調節すると知られている化合物を、選択するステップ。

(ii) 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置の効力に関するスクリーニングにおいて、前記化合物を試験するステップ。

【0153】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定する方法であって、上記ステップ(i)、(ii)を含む方法が提供される。

【0154】

表1に列挙された成分の特性を調節すると知られている代表的な化合物を、次の通り列挙する。

成分	アンタゴニスト	アゴニスト
mGluR1	LY367385	L-キスカル酸
PKC β	C1	ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート
PKC γ	C1	ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート
PKC ϵ	C1	ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート
PP2A	ホカダ酸	セラミド C2
PP5		セラミド C2
PP1	ホカダ酸	セラミド C2
PP2B	CsA	セラミド C2
Erk1	ラボスタチン	
Erk2	ラボスタチン	
Mek1	UO126	
Mek2	UO126	
PI3キナーゼ	ウォルトマニン	
PLC γ	U-731122	
CPLA2	OBAA	
チューブリン	ビンブラスチン	タキソール

【0155】

本発明の別の態様では、上記方法の使用方法が提供され、この使用方法では、本発明の多タンパク質複合体またはサブ複合体と相互作用する化合物を同定することにより、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置において有用であり得る薬剤を選択する。

【0156】

従って、本発明では、上記方法の使用方法が提供され、この使用方法では、本発明のNMDA受容体複合体またはサブ複合体と相互作用する化合物を同定することにより、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置において有用であり得る薬剤を選択する。

【0157】

当業者によれば、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定するための本発明の上記方法において、上記方法において用いられる多タンパク質複合体、そのサブ複合体およびそれらの成分は、動物組織サンプルから得られるか、または、組換え技術を用いることにより宿主細胞において発現され得ることが理解されよう。さらに、多タンパク質複合体、そのサブ複合体およびそれらの成分は、単離された状態（すなわち、組織サンプルもしくは宿主細胞からの分離）であってもよいし、再構成された状態、例えば、脂質2重層の状態であってもよい。

【0158】

さらに本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定するためのスクリーニング試験において、本発明の第7の態様に係る宿主細胞、または、本発明の第8の態様に係る亜細胞画分を用いる方法が提供される。

【0159】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定するためのスクリーニング試験において、本発明の第7の態様に係る宿主細胞、または、本発明の第8の態様に係る亜細胞画分を用いる方法が提供される。

【0160】

さらに本発明では、変異体またはトランスジェニック動物の使用方法が提供され、この使用方法は、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定するためのスクリーニング試験において、本発明に係る第5の態様の方法に用いられる。

【0161】

従って、本発明では、変異体またはトランスジェニック動物の使用方法が提供され、この使用方法は、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定するためのスクリーニング試験において、本発明に係る第5の態様の方法に用いられる。

【0162】

本発明の多タンパク質複合体に含まれる成分の変異または欠失を伴っているトランスジェニックマウスは、表現型を有してもよく、これにより、その変異と同様な方法で正常な複合体の生物学的機能を妨げる薬物が、医学的に有用であろうと示唆される。事実、PSD-95変異体マウスは、増強されたシナプス可塑性を示し、この効果を生じる薬物は有用であろう（実施例4を参照のこと）。この実施例において、NMDA受容体を含有する多タンパク質複合体は、本明細書に開示された方法、および、研究された組成物を用いることにより、PSD-95変異体マウスから単離された。予期されなかったことには、他の成分の多くが依然として存在するにもかかわらず、特定の成分(Arg3.1/Arc)は多タンパク質複合体中に存在しないことがわかった。従って、Arg3.1/PSD-95相互作用を妨げる薬物を同定することは有用であろう。このようにして、組成物に関する知識が、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するための候補化合物を同定するために利用され得る。

【0163】

単離された多タンパク質複合体は、別々のステップとして、次のような少なくとも2つの方法で使用でき、これにより、Arg3.1相互作用について競合する薬物をスクリーニングできるであろう。

(i) 正常なマウスからの多タンパク質複合体を単離（本明細書に記述されるように）し、そして候補薬物とともに温置(incubate)し、その後、Arg3.1会合を測定する。

(ii) さらに、PSD-95変異体マウスからの多タンパク質受容体複合体について、変化された結合があるか否かを確認するためにこの薬物の結合を試験する。

【0164】

最後に、選択された薬物はPSD-95変異体マウスに対して試験でき、これにより、選択薬物が、多タンパク質複合体の外側における細胞事象により変化する任意の「付加的な」または「副次的な」効果を有するか否かを確認できるであろう。

【0165】

本発明の第12の態様では、化合物を同定するための本発明の方法により得ることができるか、または得られる化合物が提供される。

【0166】

当業者によれば、このような化合物が、薬物様化合物であるか、または薬物様化合物の開発のためのリード化合物であり得ることが理解されよう。

【0167】

用語「薬物様化合物」は、当業者に周知であり、例えば、薬剤に含まれる有効成分のように、医学的使用に適合させ得る特性を有する化合物を含むものとして考えられる。

【0168】

従って、例えば、薬物様化合物は、有機化学、分子生物学または生化学の技術により合成され得る分子であってもよい。好ましくは、薬物様化合物は小分子であり、5000ダルトン未満でもよく、水溶性であってもよい。さらに薬物様化合物は、特定のタンパク質との選択的な相互作用の特性を示し、かつ、生体利用可能であり、かつ/または標的細胞膜に浸透してもよいが、これらの特徴は必要不可欠ではないことが理解されよう。

【0169】

用語「リード化合物」は、同様にして当業者に周知であり、薬物としての使用にはそれ自身適していない化合物ではあるが（例えば、意図される標的に対する効果が弱い、作用が非選択的であるか、不安定であるか、可溶性が不十分であるか、合成が困難であるか、または、生体利用可能性が不十分であるだけの理由で）、より所望される特性を有し得る他の成分の設計のための開始点を提供するような化合物を含んでいてもよい。

【0170】

NMDA受容体（および、このような受容体を含有している本発明の多タンパク質複合体）の活性をインビボで調節し得る化合物を同定することが望ましいと理解されるよう。従って、候補化合物を同定する上記方法で用いられる試薬または条件は、化合物と、多タンパク質複合体（またはサブ複合体またはそれらの成

分)との間の相互作用が実質的にインビボと同じであるように選択できることが理解されよう。

【0171】

さらに本発明では、本発明の化合物もしくはその塩と、薬学的に受容される賦形剤もしくはキャリアとを含有する薬学的組成物が提供される。

【0172】

本発明の薬学的組成物は簡便には、単位剤形として与えることができ、薬学分野で周知である方法の何れかにより調製することができる。このような方法は、1つ以上の附属成分を構成するキャリアと、有効成分(本発明の化合物)とを会合させるステップを含む。一般に、薬学的組成物/処方物は、液体キャリアまたは微細に分割された固体キャリアまたはその両方と、有効成分とを、均一にかつ親密に会合させることによって調製され、次に、必要であれば産物を成型する。

【0173】

薬学的組成物は、当該分野で公知な投与経路を介して、例えば経口または非経口投与を介して送達され得る。

【0174】

経口投与に適した本発明の処方物は、カプセル、カシエ、錠剤のような分散単位として、または、水性液体もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として、または水中油液体乳濁液もしくは油中水乳濁液として与えられ得る。また、有効成分は、ボーラス、舐剤、またはペーストとして与えられ得る。。

【0175】

錠剤は、必要に応じて1つ以上の補助成分とともに、加圧または成型により作製され得る。加圧された錠剤は、必要に応じて結合剤(例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、潤滑剤、不活性な希釈剤、保存剤、分解剤(例えば、ナトリウムスターチグリコレート、架橋されたポビドン、架橋されたナトリウムカルボキシメチルセルロース)、界面活性または分散剤と混合された、粉末または顆粒のような自由流動形態における有効成分を、適切な機械において加圧することによって調製され得る。成型された錠剤は、不活性な液体希釈剤で湿潤化された粉末化合物の混合物を、適切な機械において成型す

ることによって作製され得る。錠剤は、必要に応じてコートされ得るか、またはスコアされ得る。そして、錠剤は、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用い、所望の放出プロフィールを実現するようにヒドロキシプロピルメチルセルロースの比率を変化させることにより、錠剤における有効成分の放出を遅延させるか、または制御するように処方され得る。

【0176】

非経口投与に適した処方物は、対象となるレシピエントの血液と等浸透圧である処方物をもたらす溶質、抗酸化剤、緩衝液および静菌剤を含み得る水性および非水性の滅菌注射溶液、ならびに、懸濁化剤および濃縮剤を包含し得る水性および非水性滅菌懸濁液を含む。処方物は、単位用量または多用量容器、例えば密封されたアンプルおよびバイアルとして与えられ得、そして使用の直前に滅菌液体キャリア、例えば注射用の水を加えさえすればよい凍結-乾燥（凍結乾燥）状態において保存され得る。間に合わせの注射溶液および懸濁液は、前述された種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。

【0177】

好ましい単位投薬処方物は、有効成分の、毎日の用量または単位、毎日のその副用量または適切な画分を含有する単位投薬処方物である。

【0178】

本発明の第13の態様では、医学的使用のための本発明の化合物が提供される。

【0179】

本発明の化合物（およびその薬学的組成物）は、NMDA受容体が関わる多数の異常を、治療的および/または予防的に処置するときに使用され得る。

【0180】

好ましくは、本発明の化合物は、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置するために使用される。

【0181】

より好ましくは、本発明の化合物は、学習的欠陥、精神医学的異常および/または神経学的異常を処置するときに使用される。従って、本発明では、学習的欠

陥、精神医学的異常および/または神経学的異常を呈する患者を処置する方法であって、前記患者に本発明の化合物を投与するステップを含む方法が提供される。

【0182】

「学習的欠陥」とは、情報の獲得または回顧において異常性がある異常または状態を含むことにする。最も簡単な症例は、正常な子供の速度で学習できないかもしれない子供における。学習的欠陥は、数学的技能を学習することから区別されるように、ある様相、例えば言語の学習、に特異的であり得る。通読に対する学習における障害は、失読症のサブセットとして記載され得る。また、学習的欠陥は「脳障害後の学習における障害」を含み得る。例えば、脳卒中を罹患し、明らかに脳組織の破壊がある患者は、しばしば、経時的に低減する深在性の障害を示すであろう。この回復は、脳の他の部分が機能を引き継ぐように「学習」するからである。しかし、このような回復は、或る人々においては不十分なものとなるかもしれない、障害された学習として考慮されるであろう。従って、本発明の化合物は、外科的処置、脳卒中、または他のCNSに対する外傷の結果として、それらの中枢神経系（例えば、脳/脊柱）に対する障害を呈する患者の処置に有用であり得る。

【0183】

また、学習的欠陥は、進行中の疾患プロセスにも関連付けられ得る。例えば、脳における（アルツハイマー病における）変性は、上述のように、残りの脳領域の「学習」に対してバランスを保たれる。従って、学習障害を呈する患者は、神経変性疾患においてより漸進性の悪化を示し得る。

【0184】

「精神医学的異常」とは、精神分裂病、アルツハイマー病、慢性疼痛症候群、癲癇、パーキンソン病、ハンチントン病、習慣性異常（アルコール依存症を含む）、主要な鬱病異常、不安異常を含むものとする。

【0185】

「神経学的異常」とは、虚血性脳傷害（例えば、脳卒中）、慢性疼痛症候群、癲癇、神経変性異常（CJD）、脳腫瘍からの障害、および、免疫学的起源を有

する病変（例えば、A I D S 関連性疾病における）を含むものとする。

【0186】

患者は、任意の種の動物からであり得ることが理解されよう。好ましくは患者はヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシのような哺乳動物である。

【0187】

より好ましくは患者はヒトである。

【0188】

さらに、化合物は、単回の処置（すなわち、急性）、または、長期間にわたる反復性処置（すなわち、慢性的）の何れかとして患者に投与され得ることが理解されよう。

【0189】

さらに本発明では、本発明の化合物の使用方法であって、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置のための薬物を調製する使用方法が提供される。

【0190】

従って、本発明では、本発明の化合物の使用方法であって、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置のための薬物を調製する使用方法が提供される。

【0191】

さらに本発明では、表1に列挙された1つ以上の成分の特性（例えば、触媒活性）を調節する化合物を使用する方法であって、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置のための薬物を調製する使用方法が提供される。従って、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置する方法であって、表1に列挙された1つ以上の成分の特性を調節する化合物を、患者に投与するステップを含む使用方法が提供される。

【0192】

従って、本発明では、表1に列挙された1つ以上の成分の特性（例えば、触媒活性）を調節する化合物を使用する方法であって、中枢神経系におけるNMDA

受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する処置のための薬物を調製する使用方法、ならびに、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を処置する方法であって、表1に列挙された1つ以上の成分の特性を調節する化合物を患者に投与するステップを含む使用方法が提供される。

【0193】

表1に列挙された1つ以上の成分の特性を調節する化合物の例は、上記で列挙されている。

好ましくは、薬物は、学習的欠陥を処置するためのものである。

簡便には、薬物は、精神医学的異常を処置するためのものである。例えば、本発明の化合物は、精神分裂病を処置するために使用することができる。

あるいは、薬物は、脳卒中、癲癇、神経変性異常のような神経学的異常を処置するためのものである。

【0194】

NMDA受容体を含有する多タンパク質複合体の成分の（および、これゆえ、前記成分をコードする核酸の）改変体と、学習的欠陥、精神医学的異常および/または神経学的異常の罹患性との間には関係があると考えられる。従って、多タンパク質複合体の成分をコードする核酸の特定の配列改変体（被験体の保有する遺伝子多型）を検出することは、診断および/または予後診断の目的のために有用であり得る。

【0195】

「配列改変体」とは、本発明の多タンパク質複合体の成分をコードする遺伝子のような、別形態の核酸の集合（例えば、対立遺伝子）のような配列改変体を含むものとする。

【0196】

「関連付けられる」とは、対象となる成分の改変体を表現する（すなわち、前記改変体をコードする核酸の対立遺伝子を保有している）被験体について、CNSにおけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常または状態（例えば、学習的欠陥、精神医学的異常および/または神経学的異常）を発症または被る

尤度が、一般的な母集団についての平均尤度と比較して大きいことを意味するものとする。

【0197】

NMDA受容体を含む多タンパク質複合体の成分をコードするような核酸の特定の配列改変体は、NMDA受容体の機能が異常である特定の異常および状態に関連付けられ得る。このような異常および状態が、NMDA受容体を含有する多タンパク質複合体の成分をコードするような複数の核酸の特定の配列改変体に関連付けられ得ることが理解されよう（例えば、異常は、このような複数の遺伝子における複数の多型体に関連付けられ得る）。

【0198】

本発明のもう一つの態様では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を診断するか、または診断を補助する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 診断される被験体から、核酸を含有するサンプルを得るステップ。

(ii) 被験体からの当該核酸と、表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードする核酸に選択的にハイブリダイズする第2の核酸、またはその変異体対立遺伝子、またはそれらの成分とを接触するステップ。

【0199】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を診断するか、または、診断することを補助する方法であって、上記のステップ(i)、(ii)を含む方法が提供される。

【0200】

好ましくは、表1に列挙された核酸をコードする核酸は、遺伝子（例えば、ゲノムDNAの1部分）であるが、あるいは、このような成分をコードするRNAまたはcDNAであってもよい。

【0201】

例えば、表1からの成分をコードする遺伝子における特定の多型体の存在は、学習的障害などの指標であり得る。従って、このような多型体の存在について試験することにより、診断試験が提供され得る。

【0202】

当業者によれば、試験対象の被験体からの核酸サンプル内に含まれるものは、NMDA受容体を含有する天然存在の多タンパク質複合体の成分をコードするような核酸であることが理解されよう。これらの核酸の塩基配列は、天然に存在する多タンパク質複合体の成分をコードする核酸に選択的にハイブリダイズする第2の核酸(標的核酸)で、被験体からの核酸サンプルをプローブすることにより分析することができる。標的核酸は、DNA、cDNAまたはmRNAを含み得る。

【0203】

診断される被験体は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシなどのような任意の種の動物からであり得る。

好ましくは、被験体はヒトである。

【0204】

また、ハイブリダイゼーション実験によれば、NMDA受容体を含有する天然存在の多タンパク質複合体の成分をコードする遺伝子が発現するパターンについての情報が得られる。

【0205】

「選択的にハイブリダイズする核酸」とは、中程度にまたは高度に限定された条件下でハイブリダイズできる上記標的核酸に対して十分なヌクレオチド配列類似性を有するような核酸を意味する。当該分野において周知であるように、核酸ハイブリダイゼーションの限定性(stringency)は、ハイブリダイゼーションが生じる核酸の長さ、ハイブリダイズする配列の同一性の程度のような因子、ならびに、温度、イオン強度および配列のCGもしくはAT含量のような因子に依存する。従って、選択的にハイブリダイズできるような任意の核酸が、本発明の実施において有用である。

【0206】

上記標的核酸に選択的にハイブリダイズし得る核酸は、当該核酸の少なくとも一部分にわたり、上記標的核酸に対して>95%の配列同一性、好ましくは>98%の配列同一性、より好ましくは>99%の配列同一性を有するような核酸を

含む。周知であるように、ヒト遺伝子は、通常、上記標的核酸内の遺伝子に由来するmRNAまたはcDNAが、その全長にわたり完全には上記標的核酸に対し適合しないようなイントロンを含んでいるが、それにもかかわらず、ヒト遺伝子は、標的核酸に選択的にハイブリダイズできる核酸であるであろう。

【0207】

選択的なハイブリダイゼーションを導くような、中程度にまたは高度に限定されたハイブリダイゼーション条件の典型例は、当該分野において公知であり、例えばこれらはMolecular Cloning, a laboratory manual, 第2版, Sambrookら(編), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USAに記載されている。この文献は本明細書の内容をなすものとして援用される。

【0208】

核酸がナイロンメンブレン上に固定化され、プローブ核酸が > 500 塩基もしくは塩基対である場合の典型的なハイブリダイゼーション溶液の例は、下記の通りである。

【0209】

6 × S S C (生理食塩水クエン酸ナトリウム)

0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)

100 μg/ml 変性化、フラグメント化サケ精子DNA

ハイブリダイゼーションは、68℃で実施される。核酸が固定化されたナイロンメンブレンは、68℃にて、1 × S S C中で、または高限定(high stringency)では0.1 × S S C中で洗浄され得る。

【0210】

20 × S S Cは、次のような方法で調製され得る。800 mlのH₂O中に175.3 gのNaClおよび88.2 gのクエン酸ナトリウムを溶解する。数滴のNaOHの10 N溶液により、pHをpH 7.0に調節する。水で容量を1リットルに調節する。アリコートに取り分ける。オートクレーブを用いて滅菌する。

【0211】

核酸がナイロンメンブレン上に固定化され、プローブが15 ~ 50塩基のオリ

ゴヌクレオチドである場合の典型的なハイブリダイゼーション溶液の例は次の通りである。

【0212】

3.0 M 塩化トリメチルアンモニウム (TMA Cl)

0.01 M リン酸ナトリウム (pH 6.8)

1 mm EDTA (pH 7.6)

0.5% SDS

100 µg/ml 変性化、フラグメント化サケ精子DNA

0.1% 脱脂粉乳。

【0213】

ハイブリダイゼーションに最適な温度は、通常、与えられた鎖長についての T_i よりも5℃低くなるように選択される。 T_i は、プローブとその標的配列との間で形成されるハイブリッドの不可逆性融解温度である。Jacobsら(1988) Nucl. Acids Res. 16:4637 は T_i の決定について論じている。3 M TMA Cl 中の17マーについての推奨ハイブリダイゼーション温度は48~50℃であり、19マーについての推奨ハイブリダイゼーション温度は55~57℃であり、20マーについての推奨ハイブリダイゼーション温度は58~66℃である。

【0214】

「選択的にハイブリダイズする核酸」は、標的核酸の当該領域からDNAを増幅する核酸も含むものとする。このDNA増幅は、詳細に後述される増幅系のような周知の増幅系の何れかにより、特にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)下で行われる。PCR増幅のための適切な条件は、適切な1×増幅緩衝液における増幅を含む：

10×増幅緩衝液は、500 mM KCl; 100 mM Tris.Cl (室温でpH 8.3); 15 mM MgCl₂; 0.1%ゼラチンである。

【0215】

適切な変性剤または手順(例えば95℃に加熱する)が2本鎖DNAの鎖を分離するために使用される。

【0216】

適切には、増幅のアニール部分は、37 と60 との間であり、好ましくは37 と50 との間にある。

【0217】

本発明の方法で有用な核酸は、RNAまたはDNAであり得るが、DNAが好ましい。本発明の方法で有用な核酸は、2本鎖または1本鎖であり得るが、1本鎖核酸が、核酸増幅反応におけるような幾つかの基準下で好ましい。

【0218】

本発明の方法で有用な核酸は、これが2本鎖である場合、100kbのように非常に大きいものであり得る。例えば、このような大きな核酸は、FISH（蛍光インサイチュハイブリダイゼーション）分析で用いられるプローブを作製するための鋳型として有用である。典型的には、FISHで用いられるような、標識されたプローブは、一般的に、ゲノムクローン（例えば、適切なPACクローン中に挿入される）からのニック-翻訳またはランダムプライミングによって作製される。一旦作製されると、これらのプローブは約50～1000ヌクレオチド長である。しかし、診断するか、プローブするか、または増幅する目的のためには、核酸は、10000未満の塩基対（核酸が2本鎖である場合）もしくは塩基（核酸が1本鎖である場合）を有する場合が好ましく、より好ましくは1000未満の塩基対もしくは塩基、より一層好ましくは、10～100の塩基対もしくは塩基、さらにより一層好ましくは、15～30の塩基対もしくは塩基を有する。1本鎖DNAプライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応で使用するために適切であり、特に好ましい。

【0219】

上記標的核酸が、本発明の多タンパク質複合体の成分をコードする遺伝子（またはそのフラグメント）であり得ることが理解されるよう。「遺伝子」とは、イントロンおよびエクソンを含むのみならず、イントロンおよびエクソンに関連付けられ、かつ、イントロンおよびエクソンに物理的に密接する調節領域、特に、最も5'のエクソンに対して5'である調節領域も含むものとする。「物理的に密接する」とは、50kb以内、好ましくは10kb以内、より好ましくは5kb以内、より一層好ましくは2kb以内である旨の意味である。さらに、調節領

域を同定するために、連続欠失およびフットプリンティング技術を利用できる。

【0220】

特に好ましくは、本発明の方法で使用するための核酸は、標的核酸の一部を増幅するために使用され得るオリゴヌクレオチドプライマーである。一旦増幅されると標的核酸の部分は、当該分野で公知な方法(Molecular Cloning, a laboratory manual, 第2版, Sambrookら(編), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USAを参照のこと)によって、例えばゲル電気泳動、プロットイングおよびハイブリダイゼーション技術によって検出できる。

【0221】

中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を診断するか、または診断を補助する方法が、別に提供され、この方法は下記のステップを含む。

- (i) 診断される被験体から、タンパク質を含有するサンプルを得るステップ。
- (ii) 前記サンプルから、本発明の第1の態様に係る多タンパク質複合体を単離するステップ。
- (iii) 前記複合体の組成、および/または、前記複合体の1つ以上の成分の活性を判定するステップ。

【0222】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を診断するか、または診断を補助する方法であって、上記ステップ(i)~(iii)を含む方法が提供される。

【0223】

さらに本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を予後診断するか、または予後診断を補助する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

- (i) 予後診断の対象となる被験体から、核酸を含有するサンプルを得るステップ。
- (ii) 表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする第2の核

酸と、被験体からの前記核酸とを接触させるステップ。

【0224】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態を予後診断するか、または予後診断を補助する方法であって、上記ステップ(i)、(ii)を含む方法が提供される。

【0225】

さらに本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する患者の罹患性を判定する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 試験の対象となる患者から、核酸を含有するサンプルを得るステップ。

(ii) 表1に列挙された成分の群から選択される成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする第2の核酸と、被験体からの前記核酸とを接触させるステップ。

【0226】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対する患者の罹患性を判定する方法であって、上記ステップ(i)、(ii)を含む方法が提供される。

【0227】

当業者によれば、診断し、予後診断し、および罹患性を判定する上記方法は、さらに下記のステップを含み得ることが理解されよう。

【0228】

表1および表2に列挙された群から選択される成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする少なくとも1つのさらなる核酸と、被験体からの核酸とを接触させるステップ。但し、被験体からの核酸にハイブリダイズする各核酸が、異なる成分をコードする。

【0229】

上述の場合、さらなるステップで用いられる被験体からの核酸は、必ずしも、元来使用されたサンプルと同じサンプルから得られたものでなくてもよいが、同じ被験体から採取されなくてはならないことがさらに理解されよう。

【0230】

従って、本発明の方法によれば、1つ以上の遺伝子における異常に起因する異常を診断することができる。

【0231】

好ましい実施態様において、本発明の多タンパク質複合体もしくはサブ複合体の成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする1つ以上の核酸は、さらに、検出可能な部分を含む。適切な検出可能部分は、放射性ヌクレオチド、蛍光標識、金粒子を含む。

【0232】

本発明の多タンパク質複合体もしくはサブ複合体の成分をコードする遺伝子もしくはcDNA、またはその変異体対立遺伝子、またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする1つ以上の核酸は、2本鎖または1本鎖であり得ることが理解されよう。

【0233】

好ましくは、本発明の多タンパク質複合体もしくはサブ複合体の成分をコードする核酸、その変異体対立遺伝子、またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズする1つ以上の核酸は、1000未満の塩基対（当該核酸が2本鎖である場合）または塩基（当該核酸が1本鎖である場合）、例えば、100未満の塩基対または塩基である。

【0234】

ハイブリダイゼーション研究で核酸を用いることは、当該分野で公知であり、例えば、Sambrookら(1989)Molecular Cloning, a laboratory manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USAを参照すればよい。

【0235】

中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を診断するか、予後診断するか、または、それに対する被験体の罹患性を判定する上記方法の好ましい実施態様において、方法は、さらに下記のステップを含む。

【0236】

多タンパク質複合体の成分をコードする核酸の配列改変体の存在を、患者からの核酸で同定し、1つ以上の試験母集団からの等価な核酸における配列に対してこの配列改変体を比較するステップ。

【0237】

例えば、上記比較は、次のように見出される等価な核酸における配列に対して行えばよい。

(i) 中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態を被らず、かつ、以前に被らなかった個体の集団；

(ii) 精神分裂病、脳卒中または癲癇などを被らないか、または以前に被らなかった患者の集団；

(iii) 精神分裂病、脳卒中または癲癇の家族病歴を呈する個体の集団；または

(iv) 患者の家族と同じ家族からの個体の集団（例えば双子）。

【0238】

このようなタイプの典型的な多遺伝子解析研究は、Human Molecular Genetics (第2版), Strachan & Read(編), Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK および Principles of Medical Genetics(第2版), Gelehrter, Collins & Ginsburg(編), Williams & Wilkins, USA に記載されている。

【0239】

本発明のもう一つの態様では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対して診断し、予後診断し、および/または被験体の罹患性を判定する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 試験対象の被験体から、抗体を含有するサンプルを得るステップ。

(ii) 前記サンプルが、本発明の多タンパク質複合体、サブ複合体、またはそれらの成分に反応するような抗体を含有しているか否かを判定するステップ。

【0240】

従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる異常および状態に対して診断し、予後診断し、および/または被

験体の罹患性を判定する方法が提供され、この方法は下記のステップを含む。

(i) 試験対象の被験体から、抗体を含有するサンプルを得るステップ。

(i i) 前記サンプルが、本発明のNMDA受容体複合体、サブ複合体、またはそれらの成分に反応するような抗体を含有しているか否かを判定するステップ。

【0241】

従って、本発明に係る多タンパク質複合体、サブ複合体、またはそれらの成分に反応するような抗体の存在は、NMDA受容体に関連付けられる異常の指標となるであろう。

好ましくは、抗体のサンプルは、被験体からの血清のサンプルを含む。

【0242】

上記方法の好ましい実施態様において、本発明の多タンパク質複合体、サブ複合体、またはそれらの成分は、プラスチックのディッシュ(dish) (例えば、96ウェルプレート) 上に固定化され、次いで血清が添加される。固定化された複合体、サブ複合体または成分に対する、血清中の抗体の結合は、標準的なELISA法を用いることにより判定される(例えば、Reen, 1994, Methods Mol. Biol. 32:461~466を参照のこと)。

【0243】

本発明の更にもう一つの態様では、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる学習異常および状態に対して診断し、予後診断し、または患者の罹患性を判定するのに有用なパーツ一式が提供される。従って、本発明では、中枢神経系におけるNMDA受容体複合体の機能障害に関連付けられる学習異常および状態に対して診断し、予後診断し、または患者の罹患性を判定するのに有用なパーツ一式が提供される。

【0244】

簡便には、パーツ一式は、核酸間ハイブリダイゼーションを促進するための、かつ、それにより形成されたハイブリッドを検出するための酵素および試薬とともに、表1に列挙された成分をコードする核酸に選択的にハイブリダイズする核酸を含んでいる。

【0245】

好ましい実施態様において、パーツー式は、さらに、表1および表2に列挙された群から選択される成分をコードするような1つ以上のさらなる核酸を含んでおり、各核酸は異なる成分をコードする。このようなパーツー式によれば、中枢神経系におけるNMDA受容体の機能障害に関連付けられる異常および状態と関連付けられ得る複数の遺伝子多型を検出することができる。

【0246】

次に、以下の図および実施例を参照し、本発明をより詳細に説明する。

【0247】

【実施例】

実施例1：マウス脳からのNMDA受容体を含有する多タンパク質複合体の単離

<実験手順>

材料

本研究において使用された樹脂は、BioRad (Hemel Hempstead, UK)からのA f f i g e l - 1 0樹脂、Pierce (Chester, UK)からのP h a r m a L i n k樹脂およびアビジンアガロース、Pharmacia (Little Chalfont, UK)からのP r o t e i n G - S h e p h a r o s e、ならびに、Qiagen (Crawley, UK)からのN i - N T Aアガロースであった。複数の抗原ペプチド(MAP)MAP-NR1ペプチドは、NR1((H - R R A I E R E E G Q L Q L C S R H R E S) 8 - M A P)アミノ酸部位919~938、NR1直鎖状ペプチド(R R A I E R E E G Q L Q L C S R H R E S) 919~938、NR2A(E H L F Y W K L R) 837~846、NR2A、B、C、(S R G I Y S C) NR2Aの864~870もしくはNR2Bの925~931、NR2B-C末端(K L S S I E S D V) 1474~1482、NR2B-C末端(S I E S D V) 1477~1482、およびNR2B(K A G N L Y D I S E D) 1247~1257の最後の20個のアミノ酸からなった。ペプチドは全て、Research Genetics (Huntsville, U.S.A.)からであった。

【0248】

NR1、NR2A、およびNR2Bについての残余の部分は、それぞれ、アク

セス番号P35438、P35436、およびQ01097において使用される番号付け系に従って番号付けされる。

【0249】

ウェスタンブロットティングについての使用される抗体は、J.H.Morrison博士 (Mt. Sinai School of Medicine, New York, U.S.A.)からのマウスモノクローナル54.1抗NR1であり、抗PSD-95、抗NR2B、抗nNOS、抗eNOSは、全てTransduction Laboratories (Lexington, U.S.A.)からであり、抗アクチンはRoche Molecular Biochemicals (Lewes, UK)からであり、ウサギポリクローナル抗NR2AはUpstate Biotechnology (Lake Placid, U.S.A.)からであり、抗ChapsynはM. Watanabe博士(Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan)からの贈与であり、および抗SynGAPはR.L.Huganir博士(John Hopkins School of Medicine, Boston, U.S.A.)からであった。

【0250】

ペルオキシダーゼ結合2次抗体はAmersham(Little Chalfont, UK)からであった。L-アスパラギン、L-グルタミン、およびD-AP5は、Fluka (Gillingham, UK)からであり、ならびにアルカイン、イフェンプロジル、NMDA、デキストロメトファン、グリシン、(+)-HA966(3-アミノ-1-ヒドロキシ-2-ピロリドン)、およびコナントキニンGは全て、Sigma(Poole, UK)からであった。酵素結合ビオチンヒドラジドはPierce (Chester, UK)からであった。他の化学薬品は全て、入手できる最高の等級のものとした。

【0251】

抗体産生および精製

NR1サブユニットについて特異的な抗体は、MAP-NR1ポリクローナルIgGを生じるヒツジへのMAP-NR1ペプチドの注入によって(Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, UK)、または、抗体356を作製するためにウサギへの注射によって(内部で産生された)で産生された。PSD-95に対する抗体138は、より以前に記載された(Migaud, M.ら、1998, Nature, 396, 433~9)ようにウサギから得られた。MAP-NR1抗体は、上述で概説されるようなアミノ酸配列を伴う、直鎖状NR1がN末端に結合されるペプチドを含有す

る樹脂を使用するペプチド親和性クロマトグラフィーによって血清から精製され、そして抗NR1 356および抗PSD-95 IgG138は、Protein G-Sepharose洗浄工程によって富化された。

【0252】

MAP-NR1 IgGのビオチン化

20mgの親和精製されたMAP-NR1 IgGを、PBS中に写し、そしてPBS中の20mM 冷却メタ-過ヨウ素酸ナトリウムとともに混合した。暗所下、氷上で30分間温置した後にグリセロール(23μl)を添加した。サンプルを、氷上でのさらなる5分間の温置後にPBS中に移し、そしてEZ結合ビオチンヒドラジドを、5mMの最終濃度に添加し、続いて室温で2時間温置した。ビオチン化材料は次いで、PBS中で透析され、濃縮され、そして-20℃にて保存された。

【0253】

リガンド親和性樹脂の合成

アルカイン(8mg)、L-アスパラギン(1mg)、L-グルタミン(2mg)、NMDA(2mg)、D-AP5(2mg)、グリシン(2mg)、および(+)-HA966(1mg)を溶解し、そしてメタノール中で室温にて24時間、0.5ml affigel-10に結合し、続いて150mM Tris pH8.8を添加し、そしてさらに室温で24時間温置して、任意の残余の活性側鎖をブロックした。コナントキンG(0.1mg)を同一の条件であるが、メタノールをPBSで置き換えて、同じ樹脂に結合した。イフェンプロジル(5mg)、D-AP5(2mg)、デキストロメトロファン(10mg)、および(+)-HA966(2mg)を、製造業者の指示に従って0.5ml Pharmalink樹脂上に固定化した。

【0254】

免疫親和性樹脂の合成

精製された356、138、およびMAP-NR1抗体を透析によってPBS中に移し、そして2日間、4℃にて、連続的な混合を伴って、1mlの樹脂当たり2mg(356および138)または5mg(MAP-NR1)IgGの濃度

にてPBS中のaffigel-10に結合した。未反応の側鎖は、4 にて一晚、0.5M Tris pH7.5とともに樹脂を温置することによってブロックされた。

【0255】

ペプチド樹脂の合成

ペプチドを可溶化し、そして3日間、4 にて、連続的な振盪を伴って、5mg/ml樹脂にてメタノール中のaffigel-10に結合し、および残りの活性な側鎖を、1日間、4 にて0.5M Tris pH8.8でブロックし、続いてPBSに樹脂を移した。

【0256】

タンパク質抽出

全野生型マウス前脳を、50mM Tris pH9.0、1% デオキシコール酸ナトリウム、50mM フッ化ナトリウム、20μM 塩化亜鉛、1mM オルトバナジン酸ナトリウム、0.5mM PMSF、2μg/ml アプロチニン、および2μg/ml ロイペプチンからなる1%デオキシコール酸緩衝液(DOC緩衝液)、または50mM Tris pH8.0、1mM オルトバナジン酸ナトリウム、150mM NaCl、1% Nonident P-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、0.5mM PMSF、2μg/ml アプロチニン、および2μg/ml ロイペプチンからなるSDS含有緩衝液(SDS緩衝液)のいずれか中で、7ml冷却緩衝液当たり0.38g湿潤重量で氷上においてホモジナイズした。抽出物を、4 にて30分間の13,000×gでの遠心分離による氷上で1時間の温置後に清澄化し、続いて小規模の調製物について5μm濾過工程を、または大規模抽出物について4 で30分間の50,000×gでの遠心分離を行った。

【0257】

免疫沈降

小規模の実験を、0.2ml抽出物と、当量の同じ抽出物緩衝液とを混合し、そして図において概説されるように抗体を添加することによって行った。20μ

1のProtein G-Sepharoseを、2時間4℃での温置後に添加し、続いてさらに2時間～一晩、4℃にて、一定の振盪を伴って温置した。次いで、樹脂を4サイクルの各0.5ml抽出緩衝液で洗浄し、そしてSDS-PAGE分析に供した。大規模実験を、50mlマウス脳DOC抽出物を、2時間4℃にて、一定の振盪を伴って0.5ml Protein-G Sepharoseで予め洗浄することによって行った。次いで樹脂を除去し、そして0.5mgの親和精製されたMAP-NR1 IgGを上清に添加した。0.5ml Protein G-Sepharoseを、4時間4℃での、一定の振盪をともなった温置後に添加し、続いて、一晩、4℃にて、一定の振盪を伴ってさらに温置した。次いで樹脂をクロマトグラフィーカラムに移し、そして100ml DOC緩衝液でベースラインに洗浄した。タンパク質を、0.75ml 4% SDS-ゲルサンプル緩衝液中で30分間煮沸することによって樹脂から分離し、そして20µlアリコートでゲル分析およびウェスタンブロットングのために使用した。

【0258】

免疫親和性クロマトグラフィー

大規模実験を、50ml 脳DOC抽出物および0.5mlのaffigel-10に固定化された抗NR1 356 IgG、MAP-NR1 IgG、または抗PSD-95 138抗体を使用して行った。未結合の材料を、一定の振盪を伴った4℃での一晩の温置後に、安定なベースラインが得られるまで、約100ml DOC緩衝液を使用するカラムクロマトグラフィーによって除去した。次いで、樹脂を0.75mlの4% SDS-ゲルサンプル緩衝液中で30分間煮沸し、そして上清の20µlのアリコートをSDS-PAGEおよびウェスタンブロットング分析のために使用した。あるいは、タンパク質を6M 尿素または50% DOC緩衝液を用いるpH12へのpH移行で、樹脂から溶出した。

【0259】

リガンド親和性クロマトグラフィー

上記のように、25µlの誘導体化されたリガンド親和性樹脂を、0.2ml

マウス脳DOC抽出物に添加し、そして一定の振盪を伴って、4にて2時間温置した。次いで樹脂を、各0.5ml DOC緩衝液で5回洗浄し、そして25μlのSDS-PAGEサンプル緩衝液中に再懸濁し、続いてSDS-PAGE分析およびウェスタンブロッティングを行った。

【0260】

ペプチド親和性クロマトグラフィー

最初の小規模実験を、0.5ml脳DOC抽出物および25μl affigel-10固定化ペプチドを使用して行った。樹脂を、一定の振盪を伴って4にて4時間の温置期間後、0.5mlの冷却DOC緩衝液で4回洗浄し、続いてSDS-PAGE分析した。大規模のサンプルを、50ml DOC抽出物に0.5ml NR2B 1477~1482ペプチド誘導体化affigel-10を添加し、続いて一定の振盪を伴って4で一晩温置することによって調製した。次いで樹脂をクロマトグラフィーカラムに移し、そして約100mlの冷却DOC緩衝液でベースラインに洗浄した。結合されたタンパク質を、4% SDS含有緩衝液中で30分間煮沸することによって樹脂から放出し、そして20μlのアリコートをして、SDS-PAGE分析およびウェスタンブロッティングのために使用した(実施例2を参照のこと)。

【0261】

ウェスタンブロッティング

タンパク質サンプルを、還元SDS-PAGEに供し、そして10%(v/v)メタノール、10mM CAPS pH11.0中75Vにて、4にて90分間、PVDFメンブレン(BioRad)にトランスファーした。1次抗体の希釈は、1:100と1:1000との間であり、IgGの質に依存した。シグナルの検出は、ペルオキシダーゼ結合二次IgG、および増強された化学発光を使用して行った。

【0262】

<結果>

可溶化

シナプス後肥厚の部分としてのNMDA受容体はその抽出困難性が周知であり

、これは必須条件として高量の洗浄剤を包含しなくてはならない。最初の研究は、図1において示されるように2つの緩衝液系におけるNMDA受容体および付着される分子の挙動を判定するために行われた。DOCまたはSDS緩衝液を使用するマウス脳の抽出は、SDSを含有する緩衝液を使用する抽出物においてわずかにより高い量のNR1免疫反応性を生じ、これはまた免疫沈降された材料において明らかである。しかし、全抽出物において類似であったNR2AおよびPSD-95の量にもかわらず(結果は示さず)、DOC抽出物に比較してSDS緩衝液ベースのアプローチにおいて、このNR1-沈降される材料に付着されるNR2AおよびPSD-95の明らかな減少があった。単一の洗浄剤として1.5%(w/v)CHAPSに基づく代替の方法は、ラット脳シナプトソームからNMDA親和性を有するグルタミン酸受容体が可溶化されたことが報告されたが(Kumarら, 1991, Nature 354, 70~73)、NMDA受容体を含有する多タンパク質複合体の定量的な抽出を生じなかった(結果は示さず)。開始材料としてマウス脳の膜調製物が異なるNR1親和性パターンを生じるか否かがまた試験され、およびこれらは全脳抽出物を使用して得られるのと非常に類似の結果を生じた(データは示さず)。

【0263】

免疫沈降

多タンパク質複合体の首尾よい単離は全て、チャンネルの種々のエピトープに対する特異的な抗体の使用を包含したが、これらの研究は、低いレベルのタンパク質量に対して行われ、およびウェスタンブロッティングのみによって分析された。それゆえ、本発明者らは、このように抽出された材料の複雑性の指標を与え得るゲル染色によって分析のために単離された材料を付加することを試みた。このアプローチのために選択されたIgGは、図2において示されるようにNR1のC末端に対して(抗体356およびMAP-NR1)およびPSD-95(138)に対して試行された。全てのIgGは、ウェスタンブロッティングによって可視化されるようにNMDA受容体およびPSD-95を結合および単離し得たが、ゲル解析は精製された材料のレベルが低すぎたことを示した。図2におけるゲルは、抗体356を使用することによって、IgG重鎖以外はなんらバンドは

可視できないが、MAP-NR1抗体は90および140kDaにていくつかの散在性のバンド、ならびに42kDaの領域においていくらかより強いバンドを示した。約90~100kDaでの2つのバンドは、抗PSD-95 IgG138を使用して明らかに可視でき、そのうちの1つはおそらくPSD-95である、同じレーンにはまた、IgG重鎖と200kDaとの間にいくらかのより弱いバンドを示し、これはNMDA受容体および付随される分子で非常にあり得る。

【0264】

ウェスタンブロッティング結果に基づいて、最も見込みのあるIgGはMAP-NR1であり、それゆえこれは精製され、および図3、パネルAにおいて示されるように力価試験のために使用された。小規模免疫沈降が、MAP-NR1 IgGの不在下(0μg)および存在下(0.1~30μg)で行われた。これにより、本研究者らは、混入物と、単離された多タンパク質複合体とを区別することができた。なぜなら、後者はより高量のMAP-NR1が使用された際にバンド強度を増加したからである。さらに、後のスケールアップ調製物についての抽出物対抗体の至適な比率を見出すことが重要であった。コントロールレーンは、IgG調製物または樹脂に由来する任意のバンドを可視化するために添加される抽出物を伴わないIgG単独の実験を示す。30μg IgGを伴うレーンを、1μg未満の抗体を使用するレーンと比較することは、多くのタンパク質バンドが富化され、ゲルの底部にて45kDa~200kDaにわたることを示した。Protein G-Sepharoseについての親和性を有する開始材料に存在する抗体および他の分子がバックグラウンドバンドを生じる(レーン0μg MAP-NR1 IgG)ことはアクリルアミドゲル分析において明らかに可視でき、これは特異的な多タンパク質複合体成分と非特異的なタンパク質との間の区別を困難にし得る。それゆえ、改変されたIgGを使用する別のアプローチが、図3Bにおいて示されるように試みられた。MAP-NR1 IgGをビオチン化し、そして多タンパク質複合体をアビジン-アガロースで単離した。再度、いくつかの非特異的バンド、すなわち約75kDaでの二重バンドおよび120kDaでの強力なバンドが全てのレーンにおいて観察され得た。コントロールレーンは、これらの分子のいずれも、IgG調製物に存在せず、およびアビジ

ン-アガロースからもなかったことを示す。しかし、ビオチン化されたMAP-NR1は、未変更のIgGに比較して非常に少ない複合体タンパク質プールを結合したことは明白である。この段階で、これがNMDA受容体の亜集団の単離に起因するのか、またはビオチン化様立体阻害に基づく立体束縛の導入に起因するのかは明らかではない。後者は、ビオチンタグがグリコシル化されたFc領域に付着されたので問題でないべきであり、これはProtein-G結合MAP-NR1のような類似の遊離分子の移動を許容するべきである。しかし、IgG重鎖の全体の量は、未変更のIgGに比較して、ビオチン標識されたMAP-NR1について減少されることがクマシー染色ゲルにおいて明らかに可視できる。材料のいくつかは煮沸工程後であってもアビジンアガロースから放出されず、およびおそらくいくつかの多タンパク質複合体成分はまた放出されなかったことは排除され得ない。

【0265】

免疫親和性

次の段階として、上記の抗体を、固体支持体にこれらを直接的に固定化することによって使用すること、および図4において示されるように、サンプルのpH 9.0 ~ pH 12へのpH移行によるか、または6M尿素を使用する変性化条件下のいずれかで、単離された材料を溶出することを試みることが可能である。抗NR1 affigelからの尿素による結合化タンパク質の溶出は(356-尿素)、非常に複雑な複合体タンパク質バンドパターンを示し、これはウェスタンブロットティングによって分析され、NR1およびNR2Aの両方およびPSD-95の存在を実証する。類似の結果が、結合化抗PSD-95 IgG(138-尿素)を使用して得られるが、ここではSDS-PAGEバンドパターンはほとんど明白ではなかった。驚くべくことではないが、より高量のPSD-95が、356-樹脂に比較してこの調製物に存在したが、NR2Aの量は僅かに減少された。138-尿素サンプルにおいて約90kDaで可視できるバンドはPSD-95である可能性がある。さらに、IgGのかなりの量がまた、樹脂から放出され、これは50kDaでの主要なバンドによって見られ得ることがゲルから明白である。この抗体の破断は、pH 12溶出によって減少されるが、ゲル

におけるタンパク質バンドパターンはまた、356-affigelについて変化されるが、138-樹脂について僅かに損なった。ウェスタンブロットティングシグナルはまた、ほとんど同一であったが、抗PSD-affigelについて僅かに減少された。pH12によって溶出された356-樹脂はPSD-95に関して完全に变化され、これはこのタンパク質サンプルに不在であった。しかし、NR1およびNR2Bの両方はこの様式において溶出され得た。

【0266】

リガンド親和性

リガンド親和性ベースの方法が元来、クローニングストラテジーの前にNMDA受容体を単離するために使用され、クローニングストラテジーは単離されたタンパク質がグルタミン酸受容体の異なるクラスに属したことを示したが、NMDA受容体(E. K. Michaelis, 1994: Cirrhosis, Hyperammonemia and Hepatic Encephalopathy, S. GrisoliaおよびV. Felipo(編), Plenum Press, New York, 119~128)と、薬物について類似の親和性を示した。しかし、その時のサブユニット特異的抗体の欠損に起因して、NMDA受容体がそれらの調製物中で同時精製された場合は実験されなかった。本発明者らは、図5において示されるようにチャンネルの異なる公知の相互作用部位で指向される種々の固定化リガンドを使用して、NMDA受容体および付着される分子を単離することが可能か否かを調査した。

【0267】

NMDA受容体のポリアミン部位と相互作用することが知られる、この研究において試験された薬物は、アルカイン、イフェンプロジル、およびペプチドコナントキニンGであった。NR1、NR2B、およびPSD-95を含む、実質的な量のタンパク質が、固定化されたアルカインと相互作用し、ならびにゲル上で視できる最も強力なバンドは、35、40、および50kDaの大きさであり、これは全て現在のところ知られていない。PharmaLinkに結合されたイフェンプロジルはまた、多タンパク質複合体および多くの他の分子を結合し得たが、アルカイン樹脂よりも僅かに低い程度にであった。これはまた、これらの2つの実験のウェスタンブロットティング結果のシグナル強度において反映される。

しかし、コナントキンG樹脂は、ゲル上で可視できるバンドを全く生じず、およびウェスタン分析は、微量のNR1およびNR2Bをのみを示し、およびPSD-95を示さなかった。

【0268】

本発明者らはまた、グルタミン結合部位に対して検出されるリガンドが多タンパク質複合体の単離のために使用され得たか否かを試験した。L-グルタミンおよびNMDA樹脂は、40および50kDaでの2つのみの分子に対する弱い結合を示し、およびウェスタンブロットング結果は、多タンパク質複合体の最小限の量のみがこれらの樹脂に保持されたことを示した。L-アスパラギン *affigel-10* 支持体、およびPharmaLink結合D-AP5は両方ともにタンパク質種の配列に結合し、再度、40および50kDaでの主要なバンドを伴った。NR1およびPSD-95のウェスタンブロット分析はシグナル強度において非常に類似したが、NR2Bシグナルは、D-AP5についての僅かなシグナルに比較して、L-アスパラギンで単離されたサンプルについて非常に強力であった。*affigel-10*に結合された薬物D-AP5は、任意のタンパク質の単離において無効であった。

【0269】

オープンチャネルブロッカーのデキストロメトर्फアンは、クマシー染色ゲルにおいて見られるようにいくつかのタンパク質を結合するにおいて効果的であった。このサンプルのウェスタンブロットングは、NR1およびNR2Bの両方の僅かな量のみが存在したが、驚くべきことにPSD-95の比較的大きな量が存在したことを示した。

【0270】

グリシンは正確なNMDA受容体チャネル機能について必要である必須アミノ酸である。しかし、固定化グリシンは50kDaタンパク質のみに非常に弱く結合し、およびウェスタン分析においてプローブされた3つの分子は全て不在であった。これは、PharmaLinkまたは*affigel-10*樹脂のいずれかに結合されたグリシン部位調節因子HA-966と対照的であった。両方の例において結果は同一であり、両方ともSDS-PAGEにおいて僅かにより複雑

なパターンを示し、およびNMDA受容体チャネル成分および付着されるPSD-95についてポジティブであることが見出された。NR1が他のリガンドベースの方法に比較して特異的に富化されたことに注意することは注目に値する。

【0271】

NMDA受容体機能は、 Zn^{2+} によって調節されることが知られ、および公知の多タンパク質複合体成分の配列解析はヒスチジン反復の存在を示した。それゆえ、本発明者らは、本発明者らがキレート化 Ni^{2+} を使用することによってチャネルを保持し得るか否かを調査した(レーンNi-NTA)。クマシー染色されたゲルは、本質的に40および50kDaにて2つのバンドのみを示したが、驚くべきことにウェスタンブロット分析は、NR1、NR2B、およびPSD-95の存在を示し、完全なNMDA受容体チャネルの存在について議論する。

【0272】

しかし、これらのリガンドベースの精製法から、大部分の樹脂において保持された主なタンパク質は、40および50kDaタンパク質種であったことが明白であり、この両方とも現在のところ知られていない。これらのタンパク質がまたNMDA受容体を結合および調節する薬物に対して親和性を保有することが知られるので(Kumar, K. N., Tilakaratne, N., Johnson, P. S., Allen, A. E. & Michaelis E. K., 1991, Nature 354, 70~73; Ikin, A. F., Kloog, Y. & Sokolovsky, M., 1990, Biochemistry 29, 2290~2295)、これらのタンパク質は同定されたおよび特徴づけされたグルタミン酸受容体の成分である可能性がある。

【0273】

ペプチド親和性

抗体ベースの単離ストラテジーは、最終サンプル中に通常高量の添加されたIgGを含有する不利益を有し、これは多く方法において分析を妨害し得る。それゆえ、本発明者らは多タンパク質複合体またはそのサブ成分を単離および富化するための他の方法について探索した。1つの方法は、NR2-PSD-95相互作用の場合におけるようなC末端配列に結合し得るPDZ-ドメインのようなタンパク質の部分またはドメインを使用するか、または標的ドメインに結合し得るかもしくは基質として使用され得るペプチドを使用した。図6は、NMDA受容

体チャンネルサブユニットのいくつかのペプチドが、結合対についての基質として作用する能力を示す。本発明者らは、本発明者らがMAP-NR1 IgGを作製および精製するために以前に使用したNR1 C末端ペプチドを選択した。なぜならこの領域がまた、IgGベースの多タンパク質複合体精製プロトコルにおいて妨害し得る他の分子の結合部位について使用されるか否かが明らかでなかったからである。他のペプチドNR2A(837~846)、NR2A、B、C、およびNR2B(1247~1257)が、チロシンキナーゼについてのつなぎ合わせ点として作用し得るチロシン残基に起因して選択された。NR2B C末端ペプチドNR2B(1474~1482)および(1477~1482)は、PSD-95のようなタンパク質を含有するPDZ-ドメインについての公知の結合配列を含む。全てのペプチド樹脂は45および55 kDaのタンパク質+いくつかのさらなる60 kDaを超える少数のバンドとの相互作用を示した。このパターンは、Trisブロックされたaffigel-10を使用して観察されず、これは、これらの分子が、ペプチド樹脂と、選択されたペプチドに起因して特異的に、またはTrisブロックされたaffigelによって得られない樹脂の荷電関係に起因して非特異的な方法においてのいずれかで、相互作用することを意味する。NR2B(1477~1482)ペプチド-affigel(これは75および100 kDaでいくつかのバンドを示した)以外のいずれのペプチド樹脂も、任意の特定の富化を示さなかった。驚くべきことに、固定化されたNR2B C末端ペプチドNR2B(1474~1482)は、僅かにより短いペプチド(NR2B 1477~1482)に類似する任意の結合パターンを示さなかったが、理由は未だ知られていない。この富化された100 kDaバンドは、シナプス関連性タンパク質(SAP)分子のPSD-95、ChapSyn110、SAP97、およびSAP102(これらの全てはNR2のC末端に結合することが十分に記載され、およびこれらの全ては非常に類似の分子量を有し、それゆえSDS-PAGE上で非常に密接してともに移動する)の結合について考慮され得る。しかし、75 kDaで観察されるバンドは、この段階で任意のタンパク質に割り当てられ得ず、およびこれは同定されていないままである。それにもかかわらず、本発明者らは、NMDA受容体チャンネルおよび他の生体分子

を含有するより大きな網の部分であり得るタンパク質を、固体支持体上に固定化されるNR2B C末端ペプチドを使用して単離する別の方法を同定し得た。

【0274】

3つの単離法の比較分析

図7は、マウス脳抽出物のMAP-NR1抗体を使用する免疫沈降、affigel-10に固定化されたMAP-NR1 IgGでの免疫親和性クロマトグラフィー、およびNR2B(1477~182)ペプチド親和性クロマトグラフィーによる多タンパク質複合体の大規模単離を示し、クマシー染色SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングの両方によって分析された。両方のIgGアプローチは、染色されたゲルにおいて莫大な量のIgG重鎖(50kDa)および軽鎖(25kDa)を示し、これはそれらの領域におけるタンパク質移行の解釈を妨げる。これは、ペプチドベースのストラテジーにおける55kDaでの結合の不在によって実証され、これは存在しないか、または他の2つの方法において抗体の重鎖によって不明瞭であるかのいずれかである。さらに、固定化されたIgGマトリクスはまた、80kDaで強力なバンドを示し、これは免疫沈降されたサンプルにおいて僅かにより弱く、およびペプチドベースの方法においてさらに弱かった。このバンド、またはこの画分は、両方の抗体ベースのストラテジーにおいてウェスタンブロット分析によって免疫グロブリン、IgH、または架橋されたIgGとして割り当てられ得たが、ペプチド樹脂についての場合において割り当てられ得なかった。

【0275】

選択された分子がこれらの3つのサンプルに存在するか否かを同定するために、本発明者らは、図7の下節において示され、および実施例2において詳細に記載されるようなウェスタンブロッティングを使用して、それらの分析を進めた。

【0276】

<考察>

NMDAの単離は、免疫沈降法を使用して過去に達成されたが、さらなる特徴づけおよび詳細な分析を妨げる低いレベルにおいてのみであった。イオン交換クロマトグラフィーのような標準的な精製アプローチは、これは多タンパク質複合

体の定量的な可溶化についての絶対必要要件である1%デオキシコール酸のような荷電された洗浄剤の取り込みに起因して実現可能性がない。SDSによるデオキシコール酸の部分的な置き換えは、より高い可溶化の程度を達成するが、NMDA受容体結合対の付着を部分的に破壊し、およびNR1/NR2複合体についての異なる可溶化パターンを少なくともある程度生じる。主な洗浄剤としての1% Triton X-100の代替の選択は、クロマトグラフィー手段について適切であったが、この方法がNR2を含有する受容体を可溶化しないことが報告された(Chazot, P. L. & Stephenson, F. A., 1997, J. Neurochem. 68, 507~516)。これはまた、単離された成分が、SDSまたはTriton X-100を含有する緩衝液中で凝集する傾向があり、それゆえ多タンパク質複合体の部分の抗体認識または沈降についていずれのエピトープも接近可能ではなく、全多タンパク質複合体プールの偶然に枯渇されたサブ画分が生じたという可能性がある。これは実際に、カラムからの溶出によって単離された材料の可溶性を分析することによって支持される。明らかに、少なくともPSD-95は、pH移行に基づく興味深い挙動を示し、ここではこの分子集団の部分が、pH12にて樹脂上に保持される。亜集団がこのような疎水性シフトを受けることは知られていないが、これはNMDA受容体の存在が重要な要素でなければならないことを結論づけ得る。しかし、本研究における全ての実験が4で行われたので、上昇された温度に基づいて洗浄剤の選択がどのように多タンパク質複合体の抽出可能性および可溶性に影響し得るのかは知られていない。

【0277】

固定化された薬物またはアミノ酸のようなリガンド親和性ベースの方法は、NMDA様受容体を含むグルタミン酸結合タンパク質の単離について過去に使用され(Kumar, K. N., Tilakaratne, N., Johnson, P. S., Allen, A. E. & Michaelis E. K., 1991, Nature 354, 71~73)、また本研究において、多タンパク質複合体を結合し得ることが示され得た。驚くべきことに、固定化グルタミン酸のような、他の研究者らによって過去に使用された樹脂は、多タンパク質複合体について低い親和性を示した。残念なことに、Arcaine-affigelおよびHA-966 PharmaLinkまたはHA-966 affigelの

ような単離目的のために適切な確実な薬物-基質のほとんどは、他のイオンチャネル型のグルタミン酸受容体および他のタンパク質に結合することが予測され得る。なぜならこれらの薬物はNMDAチャネルについてより高い親和性を有するが、KainateおよびAMPA受容体のようなチャネルをまた結合および調節し得るからである。

【0278】

本発明者らは、ペプチドが多タンパク質複合体の単離に使用され得るか否かを調査した。NR1 C末端ペプチドは、明白な結合パターンを示さず、それゆえ、この部位が、他のタンパク質についての結合ドメインとして使用されず、およびMAP-NR1 IgG法による多タンパク質複合体の単離はNR1が付着される分子を混乱しないことが推定され得る。NR2A、B、およびCの内部配列からの他のペプチドは、SDS-PAGE分析に基づいて任意の観察可能な富化されたタンパク質パターンを生じなかった。これはまた、おそらく、低い豊富さにおいて存在する分子のみがこれらのペプチドに対して親和性を示し、それゆえ可視化され得なかったことを説明し得た。しかし、NR2B(1477~1482)ペプチド樹脂が、PSD-95およびこのファミリーの他のメンバーのみでなく、NMDA受容体自身もまた精製し得たことはいくらか驚きである。これは、シナプス後肥厚内で受容体によって実際に使用されるよりも利用可能なより多くのNR2付着点が存在すること、およびSAP分子間で結合が存在するかもしれないことを説明し得た。この見解は、PSD-95およびChapSyn110を含むを含有するSAPタンパク質が、N末端ジスルフィド架橋を介して互いに多重化され得るという知見によって支持される。本発明者らが驚いたことに、本発明者らは、首尾よいNR2B(1477~1482)ペプチドの3アミノ酸が伸長されたバージョンを使用して脳タンパク質の任意の富化を検出し得なかった。これは、より長いペプチドが、PDZドメインに結合し得ない配座を適合し、および接近可能になるための修飾工程を受けなくてはならないことを示し得た。このような修飾は、配列内の2つのセリン残基のうちの1つにおけるリン酸化であり得た。現在、PDZドメインタンパク質に接近可能になるために、インピボでNR2Bがこの領域においてリン酸化されるか否かは知られていない。

【0279】

本研究において示される免疫沈降、免疫親和性、およびペプチド親和性ストラテジーの最も首尾よい方法の比較分析は、多タンパク質複合体が多数のタンパク質から構成されることを示した。全ての3つの方法は、ウェスタンブロッティングによって類似の結果を与えたことは顕著であるが、ゲルバンドパターンは異なり、主に、2つのストラテジーが、ゲル分析およびバンド認識を妨げるIgGを含んだからである。Protein-Gベースの免疫沈降を使用する代替は、ビオチン化抗体およびアビジンアガロース沈降を使用して、本研究において実証され得た。

【0280】

実施例2：多タンパク質複合体の特徴づけ

<材料および方法>

抗体

親和精製されたNR1特異的ヒツジポリクローナル抗体(MAP-NR1)を、NR1の最後の20アミノ酸の多抗原ペプチド(MAP)((H-RRAIEREEGQLQLCSRHRRES)8-MAP)(Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, UK)を使用して作製した。他の抗体は表3において記載される供給源から得られた。

【0281】

NMDA受容体複合体の精製

受容体複合体を、共有結合的に結合されたMAP-NR1免疫親和性樹脂、同じ抗体での免疫沈降、またはNMDA-R2B C末端の6ペプチド(SIESDV)でのペプチド親和性クロマトグラフィーマウスのいずれかを使用して、実施例1において記載されるように前脳抽出物から単離した。簡潔には、サンプルをpH9.0にて1%(w/v)デオキシコール酸を含有する緩衝液中にホモジナイズし、30分間、50,000×gで4にてスピンド、続いてMAP-NR1抗体とともに温置し、その後Protein G-Sepharose沈降するか、またはMAP-NR1抗体置換化affigel-10(BioRad)(5mg抗体/ml樹脂)、もしくはNR2Bペプチド樹脂(5mgペプチ

ド/ml affigel-10樹脂)を使用する免疫親和性クロマトグラフィーのいずれかを行った。4 にて一晚の温置後、樹脂を100~1000カラム容量の抽出緩衝液で4 にて洗浄し、そしてタンパク質を4% SDS中で30分間煮沸することによって樹脂から分離した。

【0282】

ウェスタンブロッティング

(i) タンパク質のトランスファー

緩衝液組成：10mM CAPS pH11.0@4

10%(v/v)メタノール

- メタノール中にPVDFメンブレンを1分浸漬し、次いで緩衝液に移す
- 2つのフィルター紙、メンブレン、および2つのフォームパッドを10分間、緩衝液中で温置する。
- 約5分間緩衝液中でゲルを温置する

【0283】

- ゲルサンドイッチを、以下の順(下から上)：

カセットの黒色側

フォームパッド

フィルター紙

ゲル

PVDFメンブレン

フィルター紙

フォームパッド

カセットの透明側

においてアセンブリされたサンドイッチを覆うのに十分な緩衝液を含有するトレイ中のカセットにアセンブリする。

【0284】

- サンドイッチの層間にトラップされた空気泡が無いことを確実にする
- サンドイッチを固定し、そして緩衝液で充填されたゲルトランスファー装置に挿入する

- 泡のトラップを回避するための穏やかな攪拌を伴って、タンパク質を90分間4にて75Vでトランスファーする

- サンドイッチを取り外し、そしてタンパク質を表面上に有するPVDFメンブレンをPBSを含有する容器中に移す。

【0285】

(ii) ウェスタンブロッティング検出

緩衝液 0.05% (v/v) Tween 20を含有するPBS

- PVDFメンブレンを、5%脱脂粉乳を含有する緩衝液で一晩、4にて、一定の振盪下でブロックする

- メンブレンを3回、緩衝液で、各5分間洗浄する

- メンブレンを希釈された1次抗体(1:100~1:5000、各抗体について別々に評価されることを必要とする)を含有する緩衝液とともに、2時間、室温で、一定の振盪を伴って温置する。

- メンブレンを3回、緩衝液で、各5~10分間洗浄する。

【0286】

- メンブレンを希釈された2次抗体(1:1000~1:5000、各抗体について別々に評価されることを必要とする)を含有する緩衝液とともに、2時間、室温で、一定の振盪を伴って温置する。

【0287】

- メンブレンを緩衝液で、5、5、および30分間洗浄する

- メンブレンをECL検出試薬(Amersham Pharmacia)とともに温置し、そして1秒間~5分間、X線フィルムに露光する。

【0288】

サンプルをSDS-PAGEに供し、そして10%(v/v)メタノール、10mM CAPS pH11.0中PVDFメンブレンに4にて90分間、75Vにてトランスファーした。1次抗体の希釈は、1:100と1:1000との間であり、IgGの質に依存した。シグナルを、ペルオキシダーゼ結合2次抗体IgGおよび増強された化学発光を使用して検出した。

【0289】

質量分析サンプル調製

多タンパク質複合体サンプルを、SDS-PAGEによって分離し、クマシーブルーまたは銀染色(Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. 1996, Anal Chem 68, 850~8)によって染色し、および60~300 kD間の個々のタンパク質バンドを切り出し、還元し、アルキル化し、そしてトリプシン(Wilm, M. ら, 1996, Nature 379, 466~9)で消化した。得られるペプチド混合物を、先ず、Delayed Extraction Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (DE-MALDI) Time of Flight (TOF)質量分析によって分析し、ペプチド質量フィンガープリント(Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V. & Mann, M. 1997, Anal Chem 69, 4741~50)を生成し、そして続いてオンライン液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC/MS/MS)によってペプチド配列情報(Link, A. J. ら, 1999, Nat Biotechnol 17, 676~82)を作製した。

【0290】

DE-MALDIによる分析

MALDI質量スペクトルを、337 nm窒素レーザーと適合されたToF Spec SE機器(Micromass, Manchester, UK)を使用して得た。個々の質量スペクトルを、 m/z 2163.0570にてトリプシン自己融解ペプチドを使用し、ロック質量ルーチンを介して検量した。モノ等張性ペプチド質量が割り当てられ、そしてPeptideaプログラム(Protana, Denmark)を使用する内部の非重複性タンパク質配列データベース(nrpep)をサーチするために使用した。タンパク質起源の種に対して、およびその等電点に対して、何の制限も置かれず、および0~300 kDaのタンパク質質量範囲が許容された。タンパク質が曖昧でないように同定されるために、最小の15%配列適用範囲を示す、少なくとも5ペプチドを、50 ppmの質量精度内に適合した(Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V. & Mann, M. 1997, Anal Chem 69, 4741~50)。

【0291】

オンラインLC-MS/MS分析

ペプチド混合物のクロマトグラフィー分離を、ギ酸(0.05%)およびアセトニトリルに勾配を送達するUltimate LC系(LC Packings, The Neth

erlands)を使用する180 μm PepMapカラムに対して行った。溶出ペプチドを、Zスプレー供給源と適合されたQ-TOFハイブリッド質量分析器(Micromass, U.K.)上でのエレクトロスプレー電離によって電離した。機器を、自動化機能切り替え態様において操作するようにセットし、それによって前駆体イオンは、フラグメント化タンデムMSを誘導する衝突によるペプチド配列決定についての強度に基づいて選択される。MS/MS分析は、分析下での前駆体の m/z に基づいて選択された衝突エネルギープロファイルを使用して行われた。合計9個のMS/MSスキャンが、各前駆体について獲得された。数百のMS/MSスペクトルが、操作当たり作製され、任意の以前の解釈を伴わずに複合体混合物の解析を許容する。質量分析データは、Mascotソフトウェア(Matrix Science, UK)を使用する、 m/z 値、親イオンの荷電状態、フラグメントイオン質量および強度、ならびにタンパク質および核酸配列データベースとの相関を含むピークリストにプロセスされた。タンパク質は、ペプチドの選択されるイオン総数について算定される質量値とMS/MSデータとの適合に基づいて同定された。非重複性タンパク質データベース、およびdbEST、NCBI/EBI(National Centre for Biotechnology Information/European Bioinformatics Institute, UK)によって編集される多数の生物からの発現される配列タグを含有するヌクレオチドデータベースに対するサーチが、分子量および起源の種に対する任意の制限を適用しないで行われた。大部分のタンパク質は、いくつかのペプチド適合を伴って同定されたが、いくつかのタンパク質は、ほとんど完全なペプチド配列が得られたとすると単一ペプチドに基づいて割り当てられた。

【0292】

<結果および考察>

表3. 多タンパク質複合体の分子組成のまとめ。

【0293】

多タンパク質複合体および多タンパク質複合体内の公知の結合対の免疫プロテオミクススクリーニング。

【0294】

欄: タンパク質、タンパク質のクラスが四角で囲まれ、および特定の分子名が

示され、番号を同定する(1~106); Mr [kDa]、相対的な分子量; E x、マウス脳抽出物; I A、MAP-NR1免疫親和性によって単離される複合体; I P、MAP-NR1免疫沈降によって単離される複合体; P e p、NR2 Bペプチド親和性によって単離される複合体; A b、抗体供給源; 結合対、発表されたインビトロ研究からの同定された相互作用。

【0295】

特定の脳タンパク質が、免疫ブロッティングを使用して複合体の3つの調製物(I A、I P、P e p)において試験され、そして検出可能なシグナルが強力(+++)、中程度(++)、および弱い(+)シグナル、ならびに検出できないシグナル(-)としてスコアされた。いくつかのタンパク質は、I gの共遊走(c h、共遊走重鎖I g; c l、共遊走軽鎖I g)のために、I AまたはI Pにおいて分析され得なかった。

【0296】

複合体において見出される各タンパク質について、報告される関連性タンパク質が、第1のカラムにおける番号付けスキームを参照して示される(結合対)。

【0297】

抗体供給源(欄A b): a, J. H. Morrison; b, Upstate Biotech; c, Chemicon; d, Pharmingen; e, R. Huganir; f, Transduction Labs; g, M. Watanabe; h, Alomone Labs; i, H. Kreienkamp; j, K. Inokuchi; k, E. Ziff; l, J. Scott; m, J. Henley; n, Promega, o, P. Chohen; p, Oncogene Sci; q, New England Biolabs; r, Santa Cruz, s, Calbiochem; t, D. Kuhl; u, D. Coleman; v, Sigma; w, Roche Molecular Biochemicals; x, J. Parsons

【0298】

表4. 多タンパク質複合体タンパク質の質量分析のまとめ

60~300kDの間の可視化されたタンパク質バンドが、記載されるように調製および分析された(上述および図9を参照のこと)。欄: タンパク質名; Mr [kDa]、相対的な分子量; アクセス番号; MS事象、MS/MSによって配列決定される適合するペプチド。

【0299】

【表3-1】

タンパク質		Mr[kDa]	Ex	IA	IP	Pep	Ab	結合対
グルタミン酸受容体								
1	NR1	120	+++	+++	+++	+++	a	2, 3, 18, 35, 68, 95, 96, 101
2	NR2A	180	+++	+++	+++	+++	b	1, 3, 10, 11, 12, 35, 73, 96
3	NR2B	180	+++	+++	+++	+++	c	1, 2, 10, 11, 12, 35, 43, 95, 73, 96, 101
4	GluR1	108	+++	-	-	-	d	
5	GluR2	102	+++	-	-	-	d	
6	GluR2/3	102	+++	-	-	-	e	
7	GluR4	108	+++	-	-	-	d	
8	GluR 6 + 7	117	+++	+	+	+	b	10, 12
9	mGluR1α	200	++	++	++	+	d	15, 68, 73, 101
足場およびアダプター								
10	PSD-95	95	+++	+++	+++	+++	f	2, 3, 8, 10, 11, 12, 13, 65, 59, 75
11	カプシン-110/PSD-93	110	+++	+++	+++	+++	g	2, 3, 10, 69
12	Sap102	115	+	-	-	+++	h	2, 3, 8, 10, 13, 65, 68
13	GKAP / SAPAP	95-140	+++	+++	+++	+++	e	10, 12, 14
14	Shank	200	+	++	++	++	i	13, 15, 102
15	Homer	28/45	+++	++	++	++	j	9, 15, 14
16	GRIP	120	+++	-	-	-	e	
17	ABP (GRIP2)	95-130	+	-	-	-	k	
18	Yotiao	200	++	++	++	++	l	1, 25, 37
19	AKAP150	150	+++	+++	+++	+++	l	25, 26-34, 39, 68
20	NSF	83	+++	++	++	+++	m	5, 20
PKA								
21	PKA 触媒サブユニット	40	+++	++	++	++	f	18, 19, 92
22	PKA-R1αおよびβ	48	+++	ch	ch	-	f	
23	PKA-R1α	49	+++	ch	ch	-	f	
24	PKA-R2α	51	++	ch	ch	-	f	
25	PKA-R2β	53	+++	++	++	++	f	
PKC								
26	PKC α	82	+++	-	-	-	f	19, 105
27	PKC β	80	+++	++	++	++	f	
28	PKC γ	80	+++	+++	+++	+++	f	
29	PKC δ	78	++	-	-	-	f	
30	PKC ε	90	+++	++	++	++	f	
31	PKC η	82	++	-	-	-	f	
32	PKC θ	79	++	-	-	-	f	
33	PKC ι	74	++	-	-	-	f	
34	PKC λ	74	++	-	-	-	f	
CaMキナーゼ								
35	CaMキナーゼIIβ	60	+++	+++	+++	+++	f	1, 2, 3, 65, 68, 69
36	ホスホ-CaMキナーゼII	60	+++	++	++	++	n	
ホスファターゼ								
37	PP1	36	+++	+++	+++	+++	f	18
38	PP2A	38	+++	+++	+++	+	f	
39	PP2B (カルシニューリン)	61	+++	+	+	+	f	19
40	PP5	50	+++	++	++	++	o	
41	PTP1B	50	+	ch	ch	-	b	
42	PTP1C	68	+++	-	-	-	b	
43	PTP1D	72	+++	++	++	++	f	3
チロシンキナーゼ								
44	Src	60	+++	+	+	+	p	47, 59, 60, 90, 101
45	Fyn	59	++	-	-	-	f	
46	FAK	125	++	-	-	-	f	
47	PYK2	116	+++	+	+	+	f	44

【0300】

【表3-2】

タンパク質		Mr.kDa	Ex	IA	IP	Pep	Ab	結合対
MAPキナーゼ経路								
48	ERK (pan ERK)	42/44	+++	++	++	++	f	
49	ERK1	42/44	+++	++	++	++	f	
50	ERK2	42	+++	++	++	++	f	57
51	ERK3	62	++	-	-	-	f	
52	ホスホ-ERK1/2	42/44	++	-	-	-	q	
53	MEK1	45	+++	++	++	+	f	59
54	MEK2	48	+++	++	++	+	f	59
55	MKP2	43	+	++	++	+	f	
56	JNK1/MKK4	44	+	-	-	-	f	
57	Rsk	90	+++	++	++	++	f	50
58	Rsk-2	90	+++	++	+++	+	f	50
59	c-Raf1	74	+++	++	+++	+	f	44, 53-54, 60
小G-タンパク質および調節因子								
60	H-Ras	21	+++	d	d	+	f	44, 59, 65, 66, 71
61	Rac1	21	+++	++	+	+	f	75, 101, 102
62	Rap1	21	+	-	-	-	f	
63	Rap2	21	+++	++	++	+	f	
64	RalA	24	+++	d	d	+	f	
65	SynGAP	150	+++	++	++	++	e	10, 12, 35, 60
66	NF1	250	+++	+	+	+	r	60, 101
67	p120GAP	120	++	-	-	-	f	
他のシグナル伝達分子								
68	カルモジュリン	15	+++	+++	+++	+++	b	1, 9, 12, 19, 35, 69, 92
69	nNOS	155	++	+	+	+	f	10, 11, 35, 68
70	eNOS	140	++	-	-	-	f	
71	PI3キナーゼ	85	+++	+	+	+	f	60, 101
72	カルバイン	30	+	-	-	-	s	
73	PLC γ	150	++	+	+	+	r	2, 3, 9, 94, 101
74	cPLA2	110	++	++	+	+	r	
75	シトロン	183	++	++	++	+	r	10, 61
76	VAV	95	++	-	-	-	f	
77	arg3.1	55	+	++	++	+++	t	
78	CREB/CREM	48/26	-	ch	ch	-	f	
79	NCK	47	++	-	-	-	f	
80	SHC	52/66	++	-	-	-	f	
細胞接着および細胞骨格タンパク質								
91	N-カドヘリン	150	++	+	+	++	u	81, 87, 88, 90
92	E-カドヘリン	120	++	-	-	-	f	
93	P-カドヘリン	120	++	-	-	-	f	
94	カドヘリン-5	130	+++	-	-	-	f	
95	デスマogleイン	165	+++	++	++	+	f	85, 88
96	α -カテニン	102	+++	-	-	-	f	87, 88, 95
97	β -カテニン	92	+++	++	++	+	f	81, 86
98	γ -カテニン	82	+++	-	-	-	f	85, 86
99	L1	200	++	++	++	+	f	89
100	p120cas	120	+++	+++	++	+	f	44, 81
101	パキシリン	68	+++	-	-	-	f	
102	MAP2B	280	+++	++	+	+	f	25, 68, 101
103	ピンクリン	117	+++	-	-	-	v	
104	アクチン	45	+++	+++	+++	+++	w	73, 95, 96, 97, 102
105	α -アクチン2	110	++	+++	++	++	v	1, 3, 86, 94
106	スペクトリン	240/280	+++	++	++	++	v	1, 2, 3, 94, 96
107	ミオシン	205	++	++	++	+	v	94
108	tau	50-68	+	-	-	-	f	
109	テンシン	215	+	-	-	-	f	
110	エズリン	80	+++	-	-	-	f	
111	チューブリン	50	+++	+++	+++	+++	v	1, 3, 9, 61, 66, 71, 72, 90, 91, 101
112	コルタクチン	80/85	+++	+	+	++	x	14, 44, 61, 94, 103
113	ContBP-1	180/200	+++	+	++	+++	x	102
114	クラスリン連鎖	180	+++	++	++	+++	f	106
115	ダイナミン	100	+++	++	++	+++	f	26-34
116	Hsp-70	70	+++	++	++	+++	f	101, 104

【0301】

【表4】

タンパク質名	Mr [kDa]	アクセス番号	MS事象
バスーン	418	Q88778	1
ミオシンB重鎖(非筋肉型)	229	P35580	27
p53結合タンパク質	214	Q12888	2
密接帯タンパク質ZO-1	195	P39447	13
クラスリン重鎖	192	P11442	1
NR2B	166	Q01097	55
NR2A	165	P35436	36
SynGAP	143	AAC08071	9
NR1	105	P35438	208
α -アクチン2	103	Q62744	25
Sap97	100	Q12959	3
Est525.7 仮説の97.8kDaタンパク質	98	CAB43675	3
ダイナミン	96	Q61358	4
カプシン-110	95	Q63622	108
Sap102	93	P70175	9
ホフホフルクトキナーゼ	86	P12382	7
NSFベシクル融合タンパク質	83	P46460	1
PSD-95	80	Q62108	112
筋細胞膜関連性タンパク質-3	74	Q28623	3
GKAP/Sapap	74	P97841	4
HSP70様HS71タンパク質	71	U73744	24
キネシン軽鎖2	67	Q88448	2
PP2A調節R1 α 鎖	65	P30153	1
CaMキナーゼII β	60	P28652	1
PP2B(カルシニューリン) α 鎖	59	P20652	3
α -インテメキシン	56	P46660	2
CaMキナーゼII α	54	P11798	4
RNA結合タンパク質FUS/TLS	53	P35637	-
チューブリンアルファ-4鎖	50	P05215	3
Est700.75		A1428173	1
Est736.26		A1047568	2
Est536.68		AU050964	1
Est621.15		AV153731	1
Est571.14		AA982950	1
Est762.20		AA592427	1

【0302】

学習の普及する細胞モデルは、訓練の間のニューロン活性のパターンによって誘導されるシナプス強度の改変を包含し、これは神経網における情報をコードする(Bliss, T. V. & Collingridge, G. L., 1993, Nature 361, 31~9; Bear, M. F. & Malenka, R. C., 1994, Curr Opin Neurobiol 4, 389~99)。発火の変化されたパターンを検出するためにシナプターゼによって使用される分子機構を理解すること、および次いでどのようにシグナル伝達事象が、シナプス伝達の強度を変化するかは、このモデルに基本的な洞察を与え、およびヒト学習的欠陥において生じる病理学的機構を解明する。かなりの注目が、グルタミン酸受容体の

NMDAサブタイプに集中された(Hollmann, M. & Heinemann, S., 1994 *Annu Rev Neurosci* 17, 31~108)。なぜなら海馬におけるその遮断が、シナプス可塑性および学習の両方を障害したからである(Bliss, T. V. & Collingridge, G. L., 1993, *Nature* 361, 31~9)。この受容体チャネルは、シナプス後脊椎へのカルシウム流入を許容し、キナーゼ、ホスファターゼ、および他の酵素を調節し、これらは次いでAMPA (L-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾール-4-プロピオン酸)受容体、脊椎細胞骨格変化、翻訳、転写、および他の事象を調節することが示された。さらに、生理学的設定において、これらのシグナルは海馬のCA3-CA1シナプスにおける電気生理学的研究によって示されるように巧妙に取り込まれなくてはならず、ここでは低頻度のシナプス刺激がNMDA受容体依存性の長期抑制(LTD)およびシナプス強度における増強のより高い頻度(LTP)を生じる(Bear, M. F. & Malenka, R. C., 1994, *Curr Opin Neurobiol* 4, 389~99)。NMDA受容体シグナル伝達の役割の明白な多様性に加えて、接着タンパク質を、複数の第2のメッセンジャー、および構造タンパク質を含む多くの分子が、シナプス可塑性において関与されるという観察が考え出された(Sanes, J. R. & Lichtman, J. W., 1999, *Nat Neurosci* 2, 597~604)。

【0303】

大きな多タンパク質複合体へのシグナル伝達タンパク質との受容体のアセンブリが、細胞シグナル伝達の一般的な機構として明らかになった(Pawson, T. & Scott, J. D., 1997, *Science* 278, 2075~80)。NMDA受容体はシナプス後タンパク質(Kim, J. H. & Hunganir, R. L., 1999, *Curr Opin Cell Biol* 11, 248~54)を結合し、シナプス後肥厚95(PSD-95)を包含し、これは変異体におけるシナプス可塑性に必要であることが示された(Migaud, M.ら, 1998, *Nature* 396, 433~9)。このモデルをさらに探索するために、本発明者らはNMDA受容体PSD-95複合体を、マウス脳から単離し、そして免疫プロットティング、質量分析、および大きなタンパク質複合体の解析についての強力な道具であるプロテオミック技術を使用してそれらの特性を分析した(Jensen, O. N., Larsen, M. R. & Roepstorff, P., 1998, *Proteins 増刊*, 74~89; Mendelsohn, A. R. & Brent, R., 1999, *Science* 284, 1948~50; Neubauer, G.ら, 1998, *Nat Genet* 2

0, 46~50)。この生化学的なアプローチは、PSD-95におけるように、リン酸化および脂質修飾のような翻訳後修飾を必要とするタンパク質相互作用(Craven, S. E., El-Husseini, A. E. & Brecht, D. S., 1999, Neuron 22, 497~509)、および2-ハイブリッドスクリーニングによって検出されない三元のまたは弱い相互作用(Mendelsohn, A. R. & Brent, R., 1999, Science 284, 1948~50)の検出を可能とし、これは、NMDA受容体およびPSD-95結合対を同定するために広範囲に使用された(Kim, J. H. & Huganir, R. L. 1999, Curr Opin Cell Biol 11, 248~54; Hsueh, Y. P. & Sheng, M., 1998, Prog Brain Res 116, 123~31)。さらに、脳からの生化学的分析ならびに他のインビボ解析は、複合体に影響する変異を保有するマウスを解析するために必要とされる。

【0304】

NMDA R1サブユニットに対して指向される抗体での免疫親和性クロマトグラフィーおよび免疫沈降、ならびにNMDA受容体結合タンパク質PSD-95に結合するNMDA R2BサブユニットC末端の構造に基づくペプチド親和性を含む3つの方法が、図8において示されるような最も明らかな結果を生成した。個々の画分のSDS-PAGE分析は、精製された材料が、免疫沈降において使用されたProtein G-Sepharose(レーンWT/G)または抗体およびペプチド親和性精製において使用されたaffigel-10との、抽出されたタンパク質の非特異的な相互作用に比較して非常に複雑であることを示した(図8A、およびB、レーンIA、IP、およびPeptide)。複合体の完全性およびタンパク質相互作用の特異性が試験された。NRサブユニット(NR1、NR2A、NR2B)およびそれらの報告される相互作用タンパク質(Kim, J. H. & Huganir, R. L., 1999, Curr Opin Cell Biol 11, 248~54; Hsueh, Y. P. & Sheng, M. 1998, Prog Brain Res 116, 123~31)(PSD-95、カプシン-110/PSD-93、カルモジュリン、 α -アクチニン、カルシウム/カルモジュリンキナーゼII(CamKII)、ホスホリパーゼC)が容易に検出され(図8Cおよび表3)、ならびにnNOS、SynGAP、SAPAP/GKAP、およびシトロンを含むPSD-95結合タンパク質がまた見出された(図8D)。本発明者らは次に、AMPAサブユニット(GluR1~4)およ

びそれらの同族のアダプタータンパク質GRIIPを試験し、これらは抽出物中のそれらの豊富さにもかかわらず、多タンパク質複合体中で検出されなかった(図8E)。Kainate受容体サブユニット(GluR6/7)が検出され、PSD-95がこれらのサブユニットを結合するという以前の報告(Garcia, E. P. ら, 1998, Neuron 21, 727~39)と一致する。代謝調節型(mGluR1)受容体およびそれらの同族結合対Homer/Vesl-1が、多タンパク質複合体において見出され(図8F)、Homerが、PSD-95に対してGKAPを結合し得るSHANKを結合することを示す2-ハイブリッドスクリーニングを使用する最近の報告(Tu, J. C. ら, 1999, Neuron 23, 583~92)と一致する。それゆえ、NRおよびmGluR受容体は、AMPA受容体に異なる複合体において会合される。

【0305】

本発明者らは次に、2つのストラテジー：NRシグナル伝達および足場と関係される候補タンパク質(表3)についてのウェスタンブロットングスクリーニング、および質量分析を使用するタンパク質同定(図9および表4)を使用して多タンパク質複合体の新規な成分を同定した。図8Gにおいて示されるタンパク質は、MALDI-ペプチド質量フィンガープリンティングおよびオンラインLC-MS/MS(図9)によって分析された。

【0306】

NRおよびmGluR受容体は、第2のメッセンジャー経路の活性化を介してシナプス可塑性の誘導において関係された(図10)。本発明者らは、多タンパク質複合体における広範囲の異なるキナーゼおよびホスファターゼを試験し、そしていくつかの特異的なセリン-スレオニンキナーゼおよびホスファターゼファミリーメンバーを見出した。プロテインキナーゼA(PKA)触媒サブユニットおよび調節サブユニットR2(R1、R1、およびR2は検出されなかった)、プロテインキナーゼC(PKC)イソ型の、
、
、
、
、
、
イソ型は検出可能ではなかった。以前に報告されたように(Leonard, A. S., Lim, I. A., Hemsworth, D. E. Horne, M. C. & Hell, J. W., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96, 3239~44)、(CamKII)の および

サブユニットが会合され、およびまた、リン酸化された活性な形態にあることが見出された。これらのキナーゼの存在は、シナプス可塑性の誘導と関与されることが示され、対応するホスファターゼがまた、多タンパク質複合体に存在し得ることを示唆する。本発明者らは、PP1およびPP2Aが強力に会合され、ならびにPP2B（カルシニューリン）およびPP5がまた会合されることを見出した。PKAおよびPP1は、アダプタータンパク質（Yotiao）を介してNR1サブユニットに連結され、およびNR電流をインビトロで調節し得ることが近年見出された(Westphal, R. S.ら, 1999, Science 285, 93~6)。本発明者らは、Yotiaoおよび別のPKAアダプターAKAP150を見出し、PKAが複数の位置で多タンパク質複合体に連結され得、おそらく異なる経路を作用することを示唆する。

【0307】

チロシンリン酸化はまた、NMDA受容体(Wang, Y. T. & Salter, M. W., 1994, Nature 369, 233~5)およびシナプス可塑性(O'Dell, T. J., Kandel, E. R. & Grant, S. G., 1991, Nature 353, 558~60)と関与される。原形質チロシンキナーゼの調査は、多タンパク質複合体と会合されるSrc（しかしFynではない）およびカルシウム活性化キナーゼPyk2（しかしPyk2ホモログのFocal接着キナーゼ、FAKではない）を示した。チロシンホスファターゼインヒビターはNRチャンネルに影響する(Wang, Y. T. & Salter, M. W., 1994, Nature 369, 233~5)、関連のチロシンホスファターゼの同一性は未だ明らかでないままである。本発明者らはPTP1Dを検出し、これはNR2Bと会合するが、多タンパク質複合体における関連されるPTP1BおよびPTP1Cのいずれとも会合しないことが近年記載され(Lin, S. Y.ら, 1999, Brain Res Mol Brain Res 70, 18~25)、この多タンパク質複合体調節にチロシンホスファターゼを関連づける。

【0308】

NR媒介性キナーゼおよびホスファターゼシグナル取り込みがどのように生じるのかは明らかでない。本研究において、本発明者らは、多タンパク質複合体においてH-RasおよびRap2小Gタンパク質の両方、ならびにそれらのGT

Pアーゼ活性化タンパク質NF1およびSynGAP(これはPSD-95を結合する)を見出したが、p120GAPは見出さなかった。Rap1は、PKAをc-Raf1に結合し得、多タンパク質複合体において検出可能ではなかった。Rasは、c-Raf1-MEK-ERK/MAPK経路、PI3キナーゼおよびRalAを含むいくつかの下流エフェクター経路の異なる活性化によってこの効果を媒介する(Gille, H. & Downward, J. 1999, J Biol Chem 274, 22033~40)。異なるMAPK経路が、そのカスケードを生成する重要な酵素から構成されるモジュールに組織化され、シグナル特異性を生成するように細胞内でつなぎ合わされることが今や認識されている(Schaeffer, H. J. & Weber, M. J., 1999, Mol Cell Biol 19, 2435~44)。これはまた、ERK1およびERK2ならびにそれらの上流の活性化キナーゼMEK1、MEK2、およびc-Raf1が、JNKK1/MKK4およびERK3に対照的に見出されたので、多タンパク質複合体についての場合であり得る。さらに、ERKを不活性化するERKホスファターゼ(MKP2)がまた同定された。他のRasエフェクター、PI3KおよびRalAが検出された観察とあわせて、これらのデータは、多タンパク質複合体内の異なる下流経路に結合するRasを駆動するグルタミン酸受容体シグナルと一致する。

【0309】

シナプス可塑性および学習におけるERK/MAPK経路の役割は、かなりの注目を受けた。なぜならERKのリン酸化がMEKのインヒビターによってまた破壊されるこれらのプロセスを付随するからである(Impey, S., Obrietan, K. & Storm, D. R., 1999, Neuron 23, 11~4)。ERKのリン酸化は主に、転写因子CREBおよびCREMをリン酸化するために核に転位されるRSK2のリン酸化を介して、転写を調節するにおいて関係された。興味深いことに、ホスホERKは多タンパク質複合体に存在しないが、抽出物中に容易に検出され、リン酸化の際に多タンパク質複合体から転位するその能力と一致する。さらに、RSK2が多タンパク質複合体内で見出されたが、転写因子CREBおよびCREMは多タンパク質複合体中に検出可能ではなかった。本発明者らは、多タンパク質複合体タンパク質のいくつか(Homer、NR1、NR2B、PKCガンマ、ER

K2、c-Raf1、HSP70)が活性依存性遺伝子によってコードされることに気づき、および本発明者らはそれゆえ、Arg3.1/Arc(Link, W.ら, 1995, Proc, Natl Acad Sci USA 92, 5734~8)、LTPによってまた迅速に調節される未知の機能のシナプス後タンパク質を試験した。Arg3.1は、多タンパク質複合体中で容易に検出され、これが多タンパク質複合体のシグナル伝達および動力学的組織化に関係され得ることを示唆する。従って、多タンパク質複合体が、シナプス活性化後の転写活性化に寄与し得、次いで変化された遺伝子発現への二次的な構造変化にそれ自身が供され得るシグナル伝達機構を含む。cPLA2は、PSD-95を結合するシトロンによってまた調節された別の潜在的なERKエフェクターであった(Lin, L. L.ら, 1993, Cell 72, 269~78)。cPLA2変異体マウスは、虚血性ニューロン障害に対する耐性を示し(Bonventre, J. V.ら, 1997, Nature 390, 622~5)、およびcPLA2はアラキドン酸、候補トランス-シナプス逆行シグナル伝達分子を作製した。

【0310】

シナプス構造における変化は、長期間の記憶の保存に重要であり得、ならびに細胞接着分子および細胞骨格構造タンパク質についての役割が示される(Murase, S. & Schuman, E. M., 1999, Curr Opin Cell Biol 11, 549~53)。上記のシグナル伝達タンパク質の多くは、細胞骨格および細胞接着の公知の調節因子である。アクチン細胞骨格は以前に、NRチャネル特性(Rosenmund, C. & Westbrook, G. L., 1993, Neuron 10, 805~14)、NR媒介性LTP(Kim, C. H. & Lisman, J. E., 1999, J Neurosci 19, 4314~24)、およびNR局在性(Allison, D. W., Gelfand, V. I. Spector, I. & Craig, A. M., 1998, J Neurosci 18, 2423~36)における機能を有することが示され、および神経活性を伴って脊椎中で動力学的に調節される(Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D. & Matus, A., 1998, Neuron 20, 847~54)。本発明者らは、多タンパク質複合体において以前に受容体サブユニットに結合することが見いだされた(Wechsler, A. & Teichberg, V. I., 1998, Embo J 17, 3931~9) -アクチニン2およびスペクチン(Fodrin)、ならびにアクチン結合タンパク質(コルタクチン、コルタクチン結合タンパク質(CortBP1およびSHANK)およびMAP2を含むが、エズリン、テ

ンシン、またはピンクリンを含まない)を見出した。細胞接着タンパク質のN-カドヘリンおよびデスモグレインの2つのカドヘリンファミリーメンバーおよびそれらの原形質相互作用タンパク質の β -カテニン、ZO-1およびp120^{cas}が検出されたが、E-カドヘリン、P-カドヘリン、カドヘリン-5、 β -カテニン、ZO-1はネガティブであった。L1接着タンパク質は、学習およびシナプス可塑性に必要であり(Luthi, A., Laurent, J. P., Figurov, A., Muller, D. & Schachner, M., 1994, Nature 372, 777~9)、これはまた多タンパク質複合体中で検出された。これらの接着タンパク質は、シナプスでの多タンパク質複合体の構造的組織化において役割を果たし得るが、シナプス可塑性におけるカドヘリン(Tang, L., Hung, C. P. & Schuman, E. M., 1998, Neuron 20, 1165~75)およびL1(Luthi, A., Laurent, J. P., Figurov, A., Muller, D. & Schachner, M. 1994, Nature 372, 777~9)の関与は、このグルタミン酸受容体細胞接着タンパク質複合体が複数のトランスシナプスシグナル伝達経路を提供し得るといふ推測にこれを誘惑し、ここで接着媒介性のシグナル伝達は、伝達因子シグナル伝達機構に合わされる。

【0311】

大規模に単離された多タンパク質複合体の質量分析(MS)は、酵母2ハイブリッド試験および免疫ブロットィングよりも多タンパク質複合体成分の同定を確認および拡張した(表3および表4)。いくつかの多タンパク質複合体成分は、MSによって検出されず、およびこれは選択されたゲルフラグメントにおけるタンパク質の低いレベルに考慮され得る。以前に予測されなかった公知のタンパク質の同定に加えて、MSアプローチはまた、dbESTデータベースにおいて示される7個のペプチドを同定した。これらのESTクローンのうちの2つは、マウス海馬から起源した(AU050964およびAV153731)、一方その他のうちの1つは97kDa仮説タンパク質(CAB43675)に対応した。いくつかのタンパク質複合体が数ダースのタンパク質を含むことが明らかであるが(例えば、Jensen, O. N., Larsen, M. R. & Roepstorff, P., 1998, Protein S増刊, 74~89; Mendelsohn, A. R. & Brent, R. 1999, Science 284, 1948~50; Neubauer, G. ら, 1998, Nat Genet 20, 46~50)、本研究において同定され

た多数の多タンパク質複合体タンパク質は単一の同種複合体に存在する全てのタンパク質を示さなかった。異型遺伝子性が、異なったシナプスで見出され得るように、開始材料における異なる複合体から生じ得た。さらに大きなサイズの複合体は、シグナル伝達する複合体の動力学的アセンブリまたは一過性のタンパク質間相互作用を反映し得、これは多タンパク質複合体におけるタンパク質を含む多くのシグナル経路の特徴である(Pawson, T. & Scott, J. D., 1997, Science 278, 2075~80)。

【0312】

マウス脳から単離された多タンパク質複合体の構造は、神経伝達因子受容体、細胞接着タンパク質、アダプター、2次メッセンジャー、および細胞骨格のサブセットがともに、シグナル伝達経路を含む物理学的単位に組織化されることを意味する(図10)。多タンパク質複合体についての最も単純な一般的な機能は、電気生理学的実験において記載されるように「発現期」に対照的に、シナプス可塑性の「誘導期」においてであり得る。誘導は、NMDA受容体、mGluR、 Ca^{2+} 流入、および第2のメッセンジャーシグナル伝達の活性化を包含し、そして1時間未満続き、この際のNMDA受容体または第2のメッセンジャーの阻害はシナプス強度の新規なレベルを変化せず、これはAMPA受容体によって媒介または発現される。誘導装置としての多タンパク質複合体のこのモデルは、標的化マウス変異、トランスジェニック発現、およびシナプス可塑性の誘導を変化する多タンパク質複合体タンパク質の薬理的阻害：標的化マウス変異；NR1、NR2A、mGluR1、PSD-95、PKA触媒および調節サブユニット、PKC、CamKII、nNOS、NF1、H-Ras；NR2B、CamKII、カルシニューリン、PKAインヒビター、L1を発現するトランスジェニックマウス；ならびにNR、mGluR、PKA、PKC、CamKII、MEK、チロシンキナーゼ、PP1、PP2A、PP2B、カドヘリン、L1、アクチンポリマー化、カルモジュリン、nNOS、PI3K、およびcPLA2の薬理的インヒビターによって強力に支持される。多タンパク質複合体はまた、キナーゼおよびホスファターゼを伴う多くのカルシウム感受性タンパク質が、微小ドメインにおいてNMDA受容体カルシウム孔の下にあるので、双方向性(L

TPおよびLTD)のシナプス可塑性を誘導するために十分に適切にされる。キナーゼおよびホスファターゼ活性化、およびRas調節のような、複体内へのシグナル伝達事象の取り込みは、LTPおよびLTDについての閾値を設定するために、ならびに翻訳および転写活性化を包含するLate-LTPの活性化を調節するために必要な等級付けされた出力を提供し得た。

【0313】

実施例3：サイズ排除クロマトグラフィーによる多タンパク質複合体のサイズの決定

<材料および方法>

多タンパク質複合体の精製

多タンパク質複合体を、実施例1において記載されるように免疫親和性クロマトグラフィーによってマウス前脳から精製した。

【0314】

サイズ排除クロマトグラフィー

50mlマウス脳抽出物および0.5mgのMAP-NR1ヒツジ IgGを使用する大規模な抗NR1 IPサンプルを、樹脂からの結合された材料を競合するために、1.5mLの全容量中、4にて1時間、10mg MAP-NR1ペプチドとともに温置した。次いで上清を取り出し、そして樹脂をさらに1mlのDOC緩衝液で洗浄した。両方の上清を合わせ、そしてDOC緩衝液中4にて1ml/分での、FPLCに連結されるXK16/70カラム中の120ml Toyopearl HW-65F樹脂を介するゲル濾過に供した(両方ともにAmershamPharmacia, Amersham, UK)。サンプルを1.5分間の間隔で採取し、そして溶出物の吸光度を280nmでモニターした。サンプルを、NR1に対するウェスタンブロットティングによる分析に供した。カラムをHMWゲル濾過キットからの標準を使用して検量した。

【0315】

<結果>

マウス前脳から抽出された多タンパク質複合体のゲル濾過解析の結果は、図11において示される。

【0316】

NMDA受容体が位置される多タンパク質複合体の絶対的なサイズは、シナプスでの受容体の機能を理解するために重要な意味を有する。実施例1において記載される単離方法を使用して、本発明者らはNMDAR受容体を含有する多タンパク質複合体の組成が、約75タンパク質を含むことを決定した。成分のこの大きな数は、大きな「超複合体」または複数のより小さな異種複合体のいずれかと一致する。本発明者らは、この問題に取り組むためにゲル濾過を使用し、そして複合体のサイズの見積もりを得ることを選択した。複合体は、NR1親和性手順を使用して単離され、ペプチド競合を使用して溶出され、次いでゲル濾過に供され、ここでは回収された画分は、NR1に対する抗体を使用してウェスタンブロットされた。結果は、凝集が生じなかったことを、これがNR1免疫反応性材料を、空隙容量(v_0)で生じるので、示した。さらに、全カラム容量(v_t)の直前の領域におけるモノマーNR1サブユニットの不在が、複合体が回収されたという見解を支持する。2000kDaマークを横切るサンプルを含有するNR1のガウス分布は、多タンパク質複合体が類似のサイズからなるというさらなる指標である。

【0317】

<考察>

NMDA受容体チャネルの化学量論は明らかでないが、これがNR1およびNR2サブユニットの4量体または5量体であるという可能性は、600~900kDaの範囲のチャネルのサイズを予測する。対照的に、実施例1において単離された多タンパク質複合体は、約2000kDaの分子量を有することが決定された。従って複合体は、NMDA受容体が亜成分である大きなシグナル伝達実体であるようである。

【0318】

NMDA受容体および関連のタンパク質、および神経伝達因子受容体、細胞接着タンパク質、アダプター分子、シグナル伝達タンパク質、および細胞骨格タンパク質への複合体の詳述される組成物を含む、2000kDa複合体の実証は、どのようにシナプス後末端が機能するかを決定するために重要である。特定の神

経伝達因子受容体が特異的なシグナル伝達事象、それによって細胞機能を媒介することが知られるが、より伝統的なPSDタンパク質同定研究とともに、2ハイブリッド相互作用データの増加する実体は、PSDが相互作用するタンパク質の大きな足場または網から構成されるという見解を導く。本研究は、シナプス後神経伝達因子が、物理的に単離可能な複合体にあることを示し、NMDA受容体は、AMPA複合体のような、他の重要なPSD神経伝達因子受容体の複合体に対して区別される、非常に大きな多タンパク質複体内に位置される。従って、シナプス後構築は、電子顕微鏡を使用して観察されるより非特異的な実体またはオルガネラであるPSDの異なる亜成分である大きな多タンパク質複合体から構成されなくてはならない。

【0319】

PSD-95がシナプス可塑性および学習におけるNMDA受容体の機能に必須であるという実証は(Migaudら, 1998, Nature 396:433~439)、生理学的設定において特定の複合体が機能的な実体であることを示す。これらの多タンパク質複合体は非常に多数の分子を含み、薬理的にまたは遺伝子的に摂動される場合、シナプス強度における長期変化への、または動物における学習のための点火のパターンを検出および変換するシナプスの能力における障害を導く。シナプスの強化を導くパターンの検出のこれらの特性は、Hebb(1949)によって記載され、本発明者らが「Hebbosome」と呼ぶこれらの2000kDa複合体の生理学的役割によって十分に説明される。

【0320】

実施例4：シグナル伝達、シナプス可塑性、および学習における多タンパク質複合体の役割の調査

<材料および方法>

遺伝子標的化

-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子上流の内部リボゾーム実体部位が、細胞発現パターンをモニターするために導入された(Migaudら、前出)。標的化構築物は、胚性幹(ES)細胞にエレクトロポレーションされ、そしてサザンブロット解析は、相同組換えがSynGAPについて180個のクローンの

うちの18個(10%)、およびH-Rasについて72個のうちの58個(81%)で生じ、および生殖系列伝達が確立されたことを示した(図1a、b)。SynGAP PHおよびC2ドメインの部分をコードする565塩基対cDNAフラグメントが、RT-PCRによってマウス脳RNA抽出物から作製された。このcDNAは、129/O1aマウスゲノムライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして使用され、そして22kbのSynGAP遺伝子座を覆う重複するクローンが単離された。SynGAP標的化ベクターを構築するために、8.1kb SmaI-XhoIフラグメントおよび3.8kb SpeI-SpeIフラグメントが、5'および3'ホモロジーアームとしてそれぞれ使用された。ヘマグルチニン(HA)エピトープタグについてのコード配列が、5'ホモロジーアームの3'末端にてC2ドメイン(Kim, J. H.ら, Neuron 20, 683~91(1998), Chen, H. J.ら, Neuron 20, 895~904(1998))のXhoI部位にインフレームで挿入され、続いて停止コドンおよびIRES-lacZ-polyA MC1neo-polyAカセット(Morris, R. G.ら, Nature 319, 774~6, 1986)が続いた。得られたベクターは、C2およびGAPドメインをコードするエクソンを欠失する。ジフテリアトキシンA遺伝子(MC1-DT-A)が、ネガティブな選択マーカーとして使用された。標的化ベクターを直鎖化し、そしてE14TG2a ES細胞にエレクトロポレーションした。ネオマイシン(neo)耐性クローンを、700bp 3'隣接プローブ(EcoRIまたはXbaI消化)および354bp cDNA内部5'プローブ(BglII消化)を使用するサザンプロット解析によって相同組換えについてスクリーニングした。H-Ras I遺伝子座についての標的化ベクターは、ポジティブな選択マーカーneoを含有するカセット(TAG3-IRES-geo-polyA)を隣接する5'および3' DNAの1.9kbおよび5.5kbバンドから構成された。このカセットの5'末端は、エクソン4におけるSpeI部位にてH-Rasの翻訳を終結するための全てのリーディングフレームにおける停止コドン、続いて-geoレポーター遺伝子がH-Ras 1プロモーターの制御下で発現されることを許容するリボゾーム侵入部位(IRES)を含んだ。標的化構築物は線状化され、そしてHM1 ES細胞にエレクトロポレーションされた。ネオマイシ

ン耐性クローンが、相同な領域を隣接する1.1 kbフラグメント(5'プロンプ)、および1.2 kbゲノムDNA(3'プロンプ)を使用するサザンブロット分析によって相同組換えについてスクリーニングされた。キメラマウスが、標的化ES細胞をC57BL/6胚盤胞に注入することによって生成され、および異種接合体変異体は、以前に記載されるように(Papayioannou V.およびJonson R., 1999, 標的化ES細胞の胚盤胞および桑実胚注入によるキメラの生成, Gene Targeting A Practical Approach 第2版(Joyner A. L.編)4, 第133~175頁, Oxford University Press, IRL Press, New York)。SynGAP^{+/+}および野生型マウスの全ての比較が、F2 MF1遺伝子背景おける同腹仔を使用して行われた。動物は、UK Animal Scientific Procedures Act(1986)およびNIHガイドラインに従って試験された。

【0321】

生化学

海馬を、50 mM Tris-HCl、1% デオキシコール酸ナトリウム、50 mM NaF、20 mM ZnCl₂、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、0.5 mg/ml PMSF、Protease Inhibitors Complete (商標) (Roche Molecular Biochemicals)中でホモジナイズした。タンパク質をSDS-PAGE(25 μg/レーン)によって分離し、そして標準的な手順をウェスタンブロッティングについて使用した。抗体: SynGAP、NR2A(Upstate Biotechnology); NF1、SynGAP、HA(Santa Cruz Biotechnology); p120 Ras GAP、H-Ras、NR1、NR2B、PSD-95、ERK、MEK(Transduction Laboratories); pan Ras(Oncogene); phosphoMAPK、phosphoMEK(New England BioLabs)。

【0322】

形態学

マウスを心臓を介して固定されたマウスを、ヘパリン処置した生理食塩水、続いて0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)中の2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドで灌流した。脳を取り出し、そしてさらに

2時間固定液中に置いた。70 μm 冠状切片を振動するミクロトーム (Vibratome, Lancer) を使用して海馬の前側部分を介して採取した。3連続の切片ごとに、1つをEMプロセッシングのために、そして残りをゴルジ含浸のために採取した。切片を脱水し、そして樹脂中にマウントし、その後光学顕微鏡において観察した。背側CA1の一貫した領域を再切片化し、そして電子顕微鏡 (Philips CM12) において観察した (Morrison, B. M. ら, J Comp Neurol 395, 523~34, 1998; Bolam J. P., 1992, 光学および電子顕微鏡についての中樞神経系組織の調製。Experimental Neuroanatomy A Practical Approach (Rickwood D., Hames B. D. 編), 1, 第1~29頁, Oxford University Press, IRL Press, New York)。放射状層を試験し、および最初の20個の明らかに規定される非対称性の軸索脊椎シナプスが撮影された。X-gal染色: 新鮮な脳を、5mmの矢状切片に切開し、1時間4にて0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中の1%ホルムアルデヒド、0.01% グルタルアルデヒドに固定化し、次いでX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ガラクトシダーゼ) (Gibco BRL) (Migaudら、前出) について一晩染色した。免疫蛍光染色: 脳組織を、6時間、10%緩衝化ホルマリン中で固定化し、脱水し、次いでワックス包埋した。8 μm 冠状切片をミクロトーム上で切断した。免疫蛍光染色、マウントおよびカバースリップ (Morrisonら、前出) について標準的な手順に従った。1次抗体は以下のものであった: 抗シナプトフィシン mAb (1/100; Boehringer); MAP2B、mAb (1/100; Transduction Labs)。2次抗体は以下のものであった: Cy3結合抗体 (1/200; Jackson Lab)。

【0323】

電気生理学

海馬切片 (400 μm の厚さ) を、標準的な方法を使用して調製し、そして124mM NaCl、4.4mM KCl、25mM Na_2HCO_3 、1mM NaH_2PO_4 、1.2mM MgSO_4 、2mM CaCl_2 、および10mM グルコースからなる加温された (30)、酸化された (95% O_2 / 5% CO_2) 人工的な脳脊髄液 (ACSF) で、一定速度 (1~3 mL / 分) にて

灌流された接触面型記録チャンバー中に維持した。ACSFで充填された低い抵抗性のガラス微小電極を、海馬CA1領域の放射状層中に配置して、双極性のニクロムワイヤ刺激電極を介して50秒毎に1回、Schaffer側枝/交連線維に送達されるシナプス前刺激パルスによって誘起される場興奮性シナプス後ポテンシャル(fEPSP)を記録した。各実験の開始時に、シナプス前繊維刺激の強度を強力な強度刺激によって誘起され得る最大fEPSP増幅の約半分であったfEPSPを誘起するように調節した。高頻度刺激で誘導されるLTPは、10秒の連続内間隔を伴って送達される2連続の100Hz刺激(1秒の持続時間)を使用して誘発された。LTPの飽和レベルを誘発するために、本発明者らは6の1秒長連続の100Hz刺激を、5分間の連続間隔で送達した。静電的な比較(非対合性t検定、2試行、N=動物の数)について、本発明者らは、第1の高頻度の刺激の連続の55~60分後、または低頻度の刺激の連続の40~45分後に存在する電位の平均量を比較した。全細胞電流クランプ記録を、シナプス後脱分極化と対にされる、低い頻度のシナプス前線維刺激によるLTPの誘導を研究するために使用した。これらの実験において、CA3領域が除去されたスライスを、上昇されたレベルのCaCl₂、およびMgSO₄(各4mM)、低レベルのKCl(2.2mM)、および100μMピクロトキシンを含有する改変されたACSF中に浴した。0.05Hzシナプス前線維刺激によって誘起されるEPSPを、122.5mM Cs-グルコン酸、17.5mM CsCl、10mM TEA-Cl、0.2mM EGTA、10mM HEPES、2mM Mg-ATP、および0.3mM GTP(pH7.2)を含有する溶液で充填された低い抵抗性(2~5Mohm)のパッチ-クランプ電極を使用して、個々のCA1錐体細胞から記録した。定電流注入を使用して、細胞を-80と-85mVとの間に過分極し、そして50ミリ秒長の0.1nAパルスの過分極化電流を、EPSPの各誘起の150ミリ秒後に注入され、実験を通じてインプットおよび接触抵抗性をモニターした。シナプス前線維刺激の強度は、5と10mV増幅との間でEPSPを誘起するように設定された。ベースラインを記録する10分間の期間後、LTPを、シナプス後細胞を、記録電極を介して注入される電流を使用して、およびこの脱分極化を0mV近くに脱分極化し、そして

2 Hzにて送達される100シナプス前線維刺激パルスと対にすることによって誘導した。不對のt検定(2試行)を、野生型および変異体動物からの細胞において対合後25~30分間誘導されるLTPの平均量を比較するために使用した。全細胞電圧クランプ記録を、シナプス後膜電位の範囲を横切る興奮性シナプス後電位(EPS C)のNMDA受容体媒介性成分を試験するために使用した。これらの実験において、切片は上記の改変されたACSF中で浴され、CA1錐体細胞が、Csグルコール酸ベースの電極充填液、または120mM CsMeSO₃、20mM CsCl、8mM NaCl、0.2mM EGTA、10mM HEPES、4mM Mg-ATP、および0.3mM GTP(pH=7.2)を含有する溶液のいずれかで充填されたパッチ-クランプ電極(2~4Mohm、14~22Mohmの範囲の接近抵抗性)を使用して電圧をクランプ化された。類似の結果が、両方の内部溶液で得られ、および結果が合わされた。EPS CのAMPAおよびNMDA受容体媒介性成分を、EPS Cの開始後それぞれ、5および50ミリ秒後に測定されたEPS Cの増幅から見積もった、全ての実験および初期のデータ解析は、3H-Ras^{-/-}変異体マウスに対して行われた以外は盲目的に行われた。これらの実験からの結果は、盲目的な様式でこれらの動物に対して行われたさらなる実験から異ならず、それゆえ結果が合わされた。全ての値は、平均±SEMとして報告される。

【0324】

拳動

本発明者らは、オープンフィールド水迷路(直径2m、不透明な水、 25 ± 1 、自動化泳路モニター)を使用した。合図課題において、マウスを円筒系合図でマークされたランダムに配置した台座位置に対して訓練した(3日間、1日当たり4試行; 30cm台座直径; 余分な迷路合図を排除するためにプールの周りにカーテンが引かれた; 最大試行持続時間は90秒であった; 試行間の間隔(ITI)、10分間)。空間的訓練について、本発明者らは、余分な迷路合図が可視できる隠された台座を使用した(5日間、1日当たり4試行、30cm台座直径; 台座/プール面積は1/44であった; 30秒が各試行の終わりに台座に対して費やされた; 最大試行持続時間90秒、ITI 10分間)。移動試験1を

、以前の訓練試行の10分後に行い、マウスを60秒間プールに配置した(台座なし; 開始部位は各個々の動物について使用された試行区画がなんであれ反対であった)。移動試験試行の2つの測定が算定された: 1) プールの標的区画において費やされた時間のパーセント、および2) 台座なしの面積(半径=15cm)に対応する地帯において費やされた時間、全ての4つの可能な地帯において費やされた全時間のパーセントとして表される(図16d、fを参照のこと)。より小さな隠された台座(20cm直径; 台座面積/プール面積は1/100であった)を使用して、再度余分な迷路合図を可視化して、動物が20秒未満で各試行を行う2連続日を完了するまで、または32試行が完了するまで、基準に対する試行が包含された。基準に達した際、および以前の訓練試行から10分後、個々のマウスを60秒間プールに配置した(台座なし、移動試験2)。この訓練プロトコルは、PSD-95^{-/-}マウスについて使用されたプロトコル(Migaudら、前出)と同一であり、従ってPSD-95^{-/-}およびSynGAP^{-/-}変異体マウスの行動の比較を可能にする。2つの複製が、この点を試験することを完了した(SynGAP^{-/-}全n=21; 野生型全n=21)。最初の複製のみが、以下のような保持試験を受けた(SynGAP^{-/-}n=12; 野生型n=12)。2つのさらなる移動試験、または保持試験が、マウスが基準を達した7日間、および45日間後に行われ、第2の移動試験を完了した。再度、マウスは60秒間プール中に配置された(台座なし、それぞれ移動試験3および4)。

【0325】

<結果>

SynGAPおよびH-Rasをコードするマウス遺伝子が、クローン化され、特徴づけられ、ノックアウト標的化ベクターが構築され(図12a、b)、そして変異体マウスが作製された。雄性および雌性SynGAP^{-/-}マウスは、正常であるようであり、発作、振戦、運動失調、または他の神経学的異常の徴候を何ら示さず、およびこれらは繁殖性であった。SynGAP^{-/-}交雑からの3週齢の仔の遺伝子型は、生存するホモ接合体SynGAP^{-/-}動物を示さなかった。生まれた543匹の仔のうち、325匹が離乳され、そのうちの128

匹が野生型であり、および197匹がSynGAP^{-/+}であった ($\chi^2 = 8.417$, $P < 0.001$)。80匹の新生仔が、遺伝子型を決定され、そして変異の正常なメンデル伝達を示し (23野生型、39SynGAP^{-/+}、18SynGAP^{-/-}; $\chi^2 = 0.714$, $P > 0.05$)、SynGAPが出世以後の生存能に必要不可欠であることを示す。全てのSynGAP^{-/-}仔は、誕生し、および食餌し、そして全体的な解剖学的異常性を何も示さなかったが、48時間以内にそれらは死亡した。対照的に、H-Ras^{-/+}交雑は、予期されるメンデル比率にてH-Ras^{-/-}子孫を生成した (離乳時に323匹の仔、93匹の野生型、152匹のH-Ras^{-/+}、79匹のH-Ras^{-/-}、 $\chi^2 = 0.293$, $P < 0.05$)。これらの子孫は繁殖性であり、および神経学的異常の徴候を何ら示さなかった。

【0326】

SynGAPのニューロン発現パターンは知られておらず、およびPSD-95に類似して (Migaudら、前出)、SynGAP^{-/+}脳のX-gal染色は、海馬CA1のニューロン、および歯状回および皮質において最も高い発現を示し、そして線状体において最も低い発現を示した (図12c)。対照的に、H-Rasはほとんどの脳領域において広範に発現された (図12c)。タンパク質発現の破壊は、海馬抽出物の免疫ブロッティングを使用して確認された (図12d)。SynGAPレベルは、両方のアミノ及びカルボキシル末端抗体を使用して野生型抗体と比較して、SynGAP^{-/+}において減少された。短縮タンパク質は、これらの抗体を使用して、または遺伝子座に挿入されたHAタグに対する抗体を用いてなんら検出されなかった。H-Rasの免疫ブロッティングは、H-Ras^{-/-}マウスからの海馬抽出物において検出可能なH-Rasをなんら示さなかった。本発明者らは、SynGAP^{-/+}マウスの海馬抽出物における2つの他の哺乳動物のGAPタンパク質 ニューロフィブロミン (Neurofibromin) - 1 (NF1) およびp120RasGAPによる補完について試験し、そして野生型レベルを超える増加は何らないことを観察した (図12d)。本発明者は全てのRas情報を検出するPan-Ras抗体を使用し、およびH-Ras変異体マウスにおける全Rasレベルの減少を観察した。最

後に、本発明者らは、SynGAP^{-/-}およびH-Ras^{-/-}変異体マウスにおけるNR1、NR2A、NR2B、PSD-95の発現のレベルを試験し、そして野生型レベルからの変化がなんらなことを観察した(図12d)。

【0327】

脳におけるSynGAPおよびH-Rasの役割を探索するために、本発明者らは、成熟(6~8週齢)SynGAP^{-/-}およびH-Ras^{-/-}マウスにおいて、光学および電子顕微鏡レベルにて神経解剖学を試験した(図13)。SynGAP^{-/-}およびH-Ras^{-/-}マウスの脳においてNissl染色を使用して見出される全体的な検出可能な異常はなんらなかった。SynGAPおよびH-RASはともに海馬のCA1領域において高度に発現された(図12c)。この領域において、Nissl染色の強度および分布、ならびにシナプス末端マーカーのシナプトフィシンの分布、および樹状突起マーカーのMAP2の分布が、SynGAP^{-/-}およびH-Ras^{-/-}、および野生型マウスにおいて同じであった。樹状突起構造はさらに、ゴルジ染色および電子顕微鏡を使用して観察され、樹状突起分岐、スピン分布、および非対称性シナプス形態学を示し、これらは全て正常であった。本発明者らは、個々のE18.5胚から1次ニューロン培養物を調製し、そしてシナプスベシクルタンパク質のシナプトフィシンおよび樹状突起タンパク質のMAP2での免疫プロットングによって示されるように、神経突起を伸長され、および形態学的シナプスを形成されたSynGAP^{-/-}マウスからのニューロンが見出され、これは野生型培養物から区別できなかった。SynGAP^{-/-}マウス間のシナプス伝達についての電気生理学的な証拠が、ミニチュアシナプス電流を記録するための全細胞パッチクランプ(mEPSC)を使用して得られ、そしてグルタミン酸作動性応答の典型的な動力学を示した(データ示されず)。これらのデータは、インビトロでSynGAPがシナプス形成およびシナプス伝達に必須ではないことを示す。これらのデータを合わせて、SynGAPがおよびH-Rasがシナプス形成に必須ではないことを示す。

【0328】

SynGAP変異体マウスにおけるシナプス可塑性

本発明者らは次に、海馬のCA1領域におけるシナプス伝達および可塑性におけるSynGAPの役割を試験した。通常の実験条件下で、電氣的に記録された場興奮性シナプス後電位(fEPSP)は、AMPA型グルタミン受容体によって優先的に媒介され、本発明者らは、強い強度のシナプス前繊維刺激を使用して記録され得る最大fEPSP増幅における差異をなんら検出しなかった(最大fEPSPは、野生型切片において 8.4 ± 0.7 mV、およびSynGAP^{-/-}マウスにおいて 0.3 ± 0.5 mVであった、それぞれについてN = 23動物)。さらに、最大増幅の2分の1であったfEPSPを誘起したシナプス前繊維刺激強度を使用して測定されたfEPSP勾配に対する線維連発増幅の比率が、SynGAP^{-/-}および野生型マウスからの切片において類似であった(比率は野生型について 0.2 ± 0.02 、およびSynGAP^{-/-}マウスについて 0.2 ± 0.03 、それぞれについてN = 15動物)。これは、等価なシナプス後応答を誘起するために必要とされるシナプス前線維の数が、野生型とSynGAP^{-/-}マウスとの間で類似であることを示唆する。本発明者らはまた、野生型およびSynGAP^{-/-}切片において錐体細胞から記録された興奮性シナプス後電流(EPSC)のNMDA受容体成分における差異をなんら観察しなかった(図14a)。最後に、25、50、100、および200ミリ秒のパルス間隔で送達されたシナプス前線維刺激の対は、野生型およびSynGAP^{-/-}マウスからの切片において対にされたパルス促進のほとんど同一の量を誘起した(データ示さず)。従って本発明者らは、SynGAP^{-/-}マウスにおいて、NMDA受容体チャネル機能を含む正常なシナプス生理学のいくつかの局面における変化についての証拠をなんら見出さなかった。

【0329】

シナプス可塑性のNMDA受容体依存性形態がSynGAP^{-/-}マウスにおいて変化され得るか否かを試験するために、本発明者らは先ず、海馬CA1領域の錐体細胞上でのSchaffer側枝/交連線維シナプスでのシナプス強度に対する短い連続の非常に高頻度のシナプス刺激の効果を調査した。図14bにおいて示されるように、100 Hz刺激の2回の1秒長の連続の60分間後、シナプス伝達が、野生型マウスからの切片(N = 7)において80%を超えて増強さ

れたが、SynGAP^{-/-}マウスからの切片において僅か50%であった(N = 7、野生型に比較して $p < 0.01$)。非常に高頻度の刺激によって誘導されるLTPの量はまた、飽和レベルのLTPを誘導するために6連続の非常に高頻度の刺激が5分間ごとに1回送達された実験において、SynGAP^{-/-}マウスからの切片において有意に減少された($p < 0.005$) (図14c)。従って、高頻度シナプス刺激は、SynGAP^{-/-}マウスからの切片において有意に増強を誘導し、および100Hz刺激によって誘導される増強の量は、野生型切片において見られる増強に比較して非常に減少された。

【0330】

SynGAP^{-/-}変異体切片におけるLTPについて減少された容量を探索するために、さらに本発明者らは、より低頻度の連続のシナプス刺激が、シナプス強度における持続性の変化を誘導する能力を試験した(図14d)。野生型マウスからの切片においてLTP誘導についての閾値を下回った1Hz刺激の900パルス連続(fEPSPは $98 \pm 3\%$ のベースラインであった、1Hz刺激の45分間後、N = 5)はまた、SynGAP^{-/-}マウスからの切片におけるシナプス強度に対してほとんど持続する効果を有しなかった(fEPSPはベースラインの $94 \pm 3\%$ であった、N = 9)、同様に、5Hzで送達されたシナプス刺激の900パルスは、野生型マウスから(fEPSPはベースラインの $135 \pm 9\%$ に増強された、N = 5)、およびSynGAP^{-/-}マウス(fEPSPはベースラインの $117 \pm 5\%$ であった、N = 9、野生型から有意に異ならない、 $p = 0.07$)の切片において少量の増強のみを誘導した。より高い頻度(10および20Hz)にて送達された場合、シナプス刺激の900パルスの連続は、野生型マウスからの切片においてより大きなLTPを誘導した(それぞれ、fEPSPはベースラインの、 $153 \pm 5\%$ 、N = 5、および $141 \pm 4\%$ 、N = 7に増強された)。対照的に、これらの刺激プロトコルは、SynGAP^{-/-}マウスからの切片におけるシナプス伝達に対して相対的にほとんど効果を有しなかった(10Hz刺激後、fEPSPはベースラインの $116 \pm 2\%$ に増強された、N = 7、野生型に比較して $p < 0.001$ 、および20Hz刺激後、ベースラインの $123 \pm 7\%$ であり、N = 7、野生型に比較して $p < 0.05$ であった

)。これらの実験においてLTPを誘導するために使用されたシナプス刺激の連続の間に誘起されたシナプス後応答は、野生型およびSynGAP^{+/+}切片において類似であり、SynGAP^{+/+}において観察されるLTP欠損が、シナプス前機能における変化に起因しないことを示す(データ示されず)ことを示唆する。シナプス後興奮性および/または阻害性シナプス伝達における変化が、SynGAP^{+/+}変異体マウスにおいて観察されるLTPにおける減少に寄与するか否かを調査するために、本発明者らは、細胞外溶液中にピクロトキシン(100 μM)を含むことによって阻害性シナプス伝達をブロックし、そして低頻度(2 Hz)シナプス前線維刺激と、細胞内記録電極を介して注入される電流によって生成されるシナプス後細胞の脱分極化とを対にすることによってLTPの誘導を試験した(図14e)。

【0331】

この対合プロトコルは、野生型およびSynGAP^{+/+}細胞の両方においてLTPを誘導したが、SynGAP^{+/+}マウスからの錐体細胞において誘導される増強の平均量は、野生型動物からの細胞において観察される量よりも有意に少なかった($p < 0.001$)(図14e、f)。これは、SynGAP^{+/+}マウスにおいて観察されたLTP欠損が、シナプス後CA1錐体細胞の阻害性シナプス伝達または興奮性における変化に起因しないことを示す。さらに、LTPは実験的に課されるシナプス後脱分極化と対にされて低頻度シナプス刺激によるこれらの実験において誘導されたので、これらの知見は、SynGAP^{+/+}マウスにおいて観察されたLTP欠損が、LTPを誘導する連続のシナプス刺激の間に伝達因子放出を変化し得る、SynGAP^{+/+}切片におけるシナプス伝達のシナプス前変化から生じる減少されたシナプス後脱分極化に起因しないことを示す。合わせてこれらのデータは、SynGAPの生理学的機能は、LTPを増強するために必要であるNMDARに対する経路を結びつけることであることを示す(図17)。

【0332】

SynGAPおよびPSD-95経路の遺伝子調査

SynGAPおよびPSD-95はともにNMDA依存性可塑性について必要

とされるので、本発明者らは、経路内におけるそれらの関係を試験するために遺伝子工学を使用した。1つの可能性は、NMDA受容体からPSD-95からSynGAPに導くシグナル伝達経路である。第2の可能性は、第1の筋書きにおけるように、SynGAPがPSD-95の下流ではないが、NMDARの別々の平行な経路の下流にあることである。これらの可能性を区別し得る遺伝子試験は、SynGAP^{+/+}/PSD-95^{-/-}二重変異体において、LTPを試験することである。これらが平行な経路において区別される場合、LTPの予測されるマグニチュードは、PSD-95^{-/-}における増強されたLTPと、SynGAP^{+/+}変異体における減少されたLTPとの間の中間である。あるいは、PSD-95がSynGAPの上流である場合、二重変異体におけるLTPのマグニチュードは、PSD-95^{-/-}変異体において見られるものと類似するべきである。これらの実験において、本発明者らは、野生型切片において強いが、非飽和であるレベルのLTPを誘導する短い連続の5 Hz刺激(150パルス)を使用して、LTPを誘導した。図15aにおいて見られるように、SynGAP^{+/+}/PSD-95^{-/-}変異体からの切片において5 Hz刺激によって誘導される増強の量は、PSD-95^{-/-}マウスにおいて見られる量と同一であり、NMDAからPSD-95からSynGAPへのシグナル伝達経路が存在するモデルを示唆する。

【0333】

SynGAP^{+/+}/PSD-95^{-/-}におけるLTP表現型は、NMDARからPSD-95からSynGAPへの経路から導かれる経路を結びつけるが、これはまた興味深い逆説を生じる。単一の連続経路は単一変異体のそれぞれについて類似の表現型を有するが、PSD-95^{-/-}およびSynGAP^{+/+}マウスは反対のLTP表現型を有する。これは、別のシグナル伝達経路の存在を示す。SynGAP^{+/+}マウスにおける減少されたLTPは、PSD-95関連タンパク質SynGAPが通常はLTPを増強する経路にあることを示すが、PSD-95^{-/-}変異体において観察された増強されたLTPはまた、PSD-95は通常はLTPを抑制する経路にあることを示す。これらの経路の両方がPSD-95の遺伝的に下流にあるので、最も簡単な説明は、SynGAPが

1つの異なる経路を調節するか否か、およびPSD-95によってまた調節されるいくつかの他の経路があるか否かであった(図17)。これらの可能性を取り組むために、SynGAPの下流の分子事象をさらに特徴づけする必要がある。

【0334】

SynGAPはMAPKに対して経路を調節する

SynGAPのGTPアーゼ機能は、不活性なGDP結合形態へのRasの活性化GTP結合形態の変換を触媒することがインビトロで示された(Kimら、前出; Chenら、前出)。Rasの活性化GTP結合形態はRafを含むエフェクタータンパク質を結合し、これは次いでMEKをリン酸化および活性化し、これは次いでMAPKをリン酸化および活性化するので(Impeyら, Neuron 24, 11~14, 1999)、SynGAPはこのMAPK経路の調節因子であり得ることが予測された。このモデルは、減少されたレベルのSynGAPを示す(図12d) SynGAP^{-/-}変異体において、Ras活性が増強され、そしてraf、MEK、およびMAPが活性化されることを予測した。この仮説を試験するために、本発明者らは海馬抽出物を、MEKおよびMAPKのリン酸化された活性化形態に対する抗体で免疫プロットした(図15b)。SynGAP^{-/-}抽出物において、MEKおよびMAPKのリン酸化された活性化形態のレベルが明らかに増加されたが、これらのタンパク質の全レベルは変化しなかった。cRafタンパク質のより高いレベルがまた、その活性化補充を伴って観察された(データ示されず)。これらのデータは、SynGAPが、多タンパク質複合体の成分であるRas-MAPK経路活性を調節するという証拠を提供する。本発明者らはここで、SynGAPからMAPKへの回路が、PSD-95の下流であることを結論することに、上記のモデルを拡張し得る(図17)。

【0335】

PSD-95はSynGAP-MAPK経路およびMAPK非依存性経路をNMDARに結びつける

LTPにおけるMAPK経路の役割は、MEKのインヒビターがLTP誘導を抑制する(Selcher, J.C.ら, Learn Mem 6, 478~90 1999; Impey, S.ら, Neuron 23, 11~4 1999; Brenner, S., 1973, Br Med Bull 29, 269~71)が、NMDA

R活性化がMAPKリン酸化を増強する(Bading, H. & Greenberg, M. E. Science 253, 912~4, 1991)ので、かなり興味深い。本発明者らのデータは、SynGAPからMAPK経路がPSD-95の下流であり、およびPSD-95の下流に第2の経路があるというモデルを支持する。これらの2つの経路の役割は異なるようである(LTPを増強するか、または抑制するかのいずれか)ので、これはPSD-95からの第2の経路がMAPK非依存性である可能性を生じる。より具体的には、本発明者らは、PSD95^{+/+}変異体において見られたLTPの増強は、MEKインヒビターに感受性でないこと、MEKおよびMAPKリン酸化が増加されないかもしれないことを予測し得た。以前に報告されるように(Winder, D. G.ら, Neuron 24, 715~216, 1999; Moser, E.ら, J Neurosci 13, 3916~25, 1993)、MEKインヒビターU0126(20 μM)は、野生型切片において短い連続の5 Hz刺激によってLTP誘導を強力に抑制し(図15c)、MAPK活性化が通常はシナプス刺激のこのパターンによるLTPの誘導のために必要とされることを示す。対照的に、U0126は、PSD-95変異体マウス切片における5 Hz刺激によるLTP誘導に対してなんの効果も示さず(図15d)、PSD-95変異体切片におけるLTPの誘導がMAPK非依存性であることを示唆する。さらに、リン酸化されたMEKおよびMAPKのレベルは、PSD-95変異体マウスにおいて野生型のレベルを上回って上昇されなかった(図15f)。これらのデータは、PSD-95がMAPK非依存性経路およびSynGAP-MAPK経路の上流であるというモデルを支持する(図17)。

【0336】

SynGAPシグナル伝達におけるH-Rasのインビボでの役割

H-RasおよびSynGAP変異体マウスの利用可能性は、本発明者らがH-RasがインビボでSynGAPシグナル伝達に参与されるか否か試験することを可能にする。SynGAPがH-RasのGTP加水分解を加速したことを示すインビトロ実験(Kimら、前出; Chenら、前出)に基づいて、SynGAP^{-/-}マウスにおける減少されたLTPが、増加されたH-Ras活性から生じ得た。同様に、増加されたH-Ras活性は、SynGAP^{-/-}変異体マウスにお

いて観察されるraf、MEK、MAPK活性化を駆動することが予測され得た。これらの予測を試験するために、本発明者らはSynGAP^{-/-}/H-Ras^{-/-}二重変異体を作製し、そしてLTPまたはMEKおよびMAPK活性が野生型レベルに回復されるか否かを調べた。高頻度のシナプス刺激によるLTPの誘導は、H-Ras^{-/-}マウスにおいて増強されたことが報告されるが(Manabe, T.ら, J Neurosci 20, 2504~11, 2000)、本発明者らは、低頻度刺激プロトコルによって誘導されるLTPの量が、H-Ras^{-/-}および野生型マウスからの切片において類似したことを見出した(図15e)。野生型マウスに比較して、有意に少ないLTPが、SynGAP^{-/-}マウスにおいてこの5Hz刺激プロトコルによって誘導された($p < 0.02$ 、図15e)。さらに、5Hz刺激誘導性LTPがまた、H-Ras^{-/-}変異体マウスにおいて見られるものに比較して、SynGAP^{-/-}/H-Ras^{-/-}二重変異体において有意に減少された($p < 0.05$)(図15e)。これは、H-Rasがこれらの条件下でSynGAPの生理学的に重要なエフェクターではないことを示す。本発明者らはまた、H-Ras^{-/-}およびSynGAP^{-/-}/H-Ras^{-/-}二重変異体マウスからの抽出物を免疫プロットングすることによって、H-RasがSynGAP媒介性のMAP経路活性化に必要とされたか否かを試験した(図15b)。H-Ras^{-/-}マウスにおけるMEKおよびMAPKリン酸化のレベルは、野生型と同じであった。対照的に、リン酸化されたMEKおよびMAPKレベルにおける明らかな増加が、SynGAP^{-/-}/H-Ras^{-/-}二重変異体マウスにおいてあり、SynGAP^{-/-}変異体において観察されたレベルに一致した。従って、H-RasがLTPのSynGAP調節に必要とされないことを示す本発明者らの結果のように、これらの結果はH-RasがMAPK経路活性化のSynGAP調節における必須のエフェクターでないことを示す。

【0337】

SynGAPは学習の速度を調節する

NMDA受容体関連性タンパク質の複合体内のシナプス可塑性を制御する複数のシグナル伝達経路の遺伝子欠損は、学習における受容体の関与の再試験を許容

する。SynGAP^{-/-}変異体は、PSD-95^{-/-}変異体マウス(Migaudら、前出)のように、NMDA受容体媒介性のシナプス可塑性における逆の変化にもかかわらず、シナプスNMDA受容体電流における検出可能な異常性をなんら示さなかった。PSD-95^{-/-}変異体マウスは、空間的学習課題の成績において重篤な障害を示す(Migaudら、前出)。SynGAP^{-/-}変異体マウスは、本発明者らがPSD-95関連性のシグナル経路の1つに対するこのタンパク質の寄与を調査することを可能にする。比較を与えるために、本発明者らは、PSD-95^{-/-}変異体マウスの研究において使用されたプロトコルと同一の水迷路訓練プロトコルを意図的に選択した。野生型(n=21)およびヘテロ接合体SynGAP^{-/+}変異体(n=21)の両方が、水迷路の合図および空間的バージョンにおいて訓練され、実験者は遺伝子型について全く盲目であった。

【0338】

NMDA受容体非依存性合図試験において、野生型およびSynGAP^{-/+}変異体マウスの両方は可視できる合図によってマークされるランダムに配置され台座に接近することを学習し、首尾よい試行を通じて経路長の等価な(F<1)および前進的な減少を伴った(図16a)。NMDA受容体依存性の空間的課題において、両方の群は、20の試行の過程を通じて、経路長における減少を示し(変異体F(19、380)=1.91; p<0.05; 野生型:F(19、380)=2.74; p<0.001)、SynGAP^{-/+}変異体の泳路は野生型の泳路(F(1、40)=6.75; p<0.05)よりも全体的に僅かに長かった。次いで、全てのマウスは第1の移動試験に供された(台座が除去された)。PSD-95^{-/-}変異体における顕著な障害を示した四分円を学習するにおける時間の従来の測定において(Migaudら、前出における図5d)、SynGAP^{-/+}変異体と野生型との間の差異は接近したが、有意性に到達しなかった(t(40)=1.98; 0.10>p>0.05)。しかし、全ての4つの可能な台座配置における時間に比較した標的台座の周囲に集中された地帯において費やされた時間の割合のより感度の高い測定を使用して(Moserら、前出)、SynGAP^{-/+}変異体は、有意に少ない集中された泳ぎを示した(図16c; t(40)=3.08; p<0.05) PSD-95^{-/+}変異体が厳密な成績基準

に達するために空間的課題に対する過度の練習を与えられた場合、2 / 12 変異体マウスのみが、9 / 9 野生型に比較して成功した (番号 10 ; $\chi^2 = 14.3$; $p < 0.001$)。対照的に、11 / 21 SynGAP^{-/-}マウス (20 / 21 野生型マウスと比較して) が、この基準を達成した。野生型よりも劣ったが ($\chi^2 = 9.98$; $p < 0.005$)、PSD-95^{-/-}マウス ($\chi^2 = 5.22$; $p < 0.05$) よりも有意により多くのSynGAP^{-/-}マウスが基準を達成した。この結果と一致して、基準を達成した後、即座に第2の移動試験において試験された場合、SynGAP^{-/-}マウスは標的地帯において中程度に集中された探索を示した (図16c)。この結果は、両方の移動試験において偶然のままであったPSD-95^{-/-}変異体の成績と一致した (図16e)。

2つの変異体系統の比較は、SynGAP^{-/-}マウスが、PSD-95^{-/-}マウスよりも有意に少なく障害され ($F(1, 31) = 5.31$; $p < 0.05$)、そして群×移動試験相互作用が得られ ($F(1, 31) = 5.10$; $p < 0.05$) : SynGAP^{-/-}およびPSD-95^{-/-}マウスが移動試験1において等しく悪く行ったが、移動試験2においてSynGAP^{-/-}マウスは、PSD-95^{-/-}マウスよりも有意に良好に行った ($p < 0.05$) ことを示した。

【0339】

従って、代表的な泳路において定性的に示されたように (図16d)、SynGAP^{-/-}マウスは、訓練において初期により拡散された探索によって特徴づけられた空間的学習のより遅延された速度を示した (移動試験1) が、これらは、さらなる訓練後に台座に位置し得た (移動試験2) ; PSD-95^{-/-}マウスは、空間的訓練の全ての相を解して異常に探索した (図16e、f ; Migaudらからのデータの再分析)。これらの変異体について考察するための枠組みが、図16gにおいて示され、ここではSynGAP^{-/-}マウスがコントロール動物によって達成された学習の等価な漸近線を徐々に接近するが、PSD-95^{-/-}マウスは接近しなかった。

【0340】

それらの減少された学習の速度とは対照的に、試験されたSynGAP^{-/-}

変異体のサブセット ($n = 12$) は、野生型 ($n = 12$) に比較して忘却の正常な速度を示した。標的地帯において費やされた時間 (方法を参照のこと) は、移動試験 3 (7 日間の保持試験; 変異体: $52.10 \pm 8.15\%$; 野生型: $60.66 \pm 7.43\%$) および移動試験 4 (45 日間の保持試験; 変異体: $35.34 \pm 5.21\%$; 野生型: $36.70 \pm 4.21\%$) に対して両方の群において類似であった。移動試験 2、3、および 4 (すなわち、即時および長期間の両方の保持試験) に対する成績の ANOVA は、変異体と野生型との間で全体的な群差異をなんら示さず ($F < 1$)、および群 \times 移動試験相互作用を示さず ($F < 1$)、SynGAP^{-/-}変異体が、最初は学習することが遅いが、障害されない長期間の記憶を有することを示す。予測されるように、有意な忘却が経時的に観察されたが ($F(2, 44) = 12.46$; $p < 0.001$)、成績は、45 日間の保持試験においてさえ偶然を上回ったままであった ($t(23) = 3.36$; $p < 0.005$)。この知見は、SynGAP が記憶をコードするための誘導機構に寄与するが、経時的な記憶追跡の持続に寄与しないという意見と一致する。

【0341】

<考察>

本研究において、本発明者らは、実施例 1 において単離された NMDA 受容体に連結される 2000 kDa の細胞内シグナル伝達複体の成分である SynGAP、H-Ras、および PSD-95 における変異を保有するマウスを試験した (図 17)。本発明者らは、SynGAP が NMDAR 媒介性のシナプス可塑性および学習に必須であるが、シナプス NMDAR 機能に必要とされなかったことを見出した。SynGAP は、また複体の成分である raf から、MEK、MAPK への経路の重要なネガティブな調節因子であった。PSD-95 は、NMDAR を直接的に結合し、2 つの経路 (第 1 は SynGAP-MAPK 経路であり、第 2 は MAPK 非依存性経路である) に、NMDAR を連結することによって 2 方向性の可塑性誘導における重要な役割を果たす (図 17)。SynGAP 変異体マウスは学習のより遅延された獲得を示したが、これらは正常な記憶保持および忘却の速度を示した。

【0342】

複合体内シグナル伝達経路によって制御されるLTP誘導

SynGAP^{-/+}変異体および野生型マウスにおける興奮性シナプスは、LTP誘導についての閾値を下回ったシナプス活性化のパターンに対して類似の応答を示したが、有意に低い電位が、野生型切片におけるLTP誘導についての閾値を超えるシナプス刺激の全てのパターンによって、SynGAP^{-/+}変異体切片において誘導された。このSynGAP^{-/+}マウスにおけるLTP欠損は、基本のシナプス伝達およびNMDA受容体機能における任意の明白な変化の不在で生じ、および阻害性シナプス伝達および/またはシナプス後興奮性における電位の変化が、LTP誘導に対してほとんど効果を有しないべきである実験条件下で存在した。合わせて、これらの結果は、SynGAPがLTPに関与される下流のシグナル伝達経路にNMDA受容体活性化を結びつける重要な役割を有することを示唆する。

【0343】

以前の研究は、SynGAPがRAS/MAPK経路、LTPおよび学習の両方において重要な役割を有することが知られる経路(Impey, S.ら, Neuron 23, 11~4, 1999において概説される)の活性化に細胞内カルシウムの増加を結びつけるように作用し得ることを示唆した(Kimら、前出; Chemら、前出)。従って、PSD-95とのその関連性、および細胞内カルシウムにおける増加によるその電位調節によって(そのN末端C2ドメインを介するか、またはカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼCamKIIによるリン酸化後の活性における変化のいずれか)、SynGAPは必須の関連性を提供し得、それによってNMDA受容体活性化は、MAPK経路の活性化を導く。単一および二重変異体マウスの遺伝子解析は、PSD-95がSynGAPの上流であるという見解を支持し、これは生化学的および薬理学的研究と合わせて、経路: NMDAR → PSD-95 → SynGAP → raf → MEK → MAPKを作成する。

【0344】

本発明者らは、この経路からH-Rasを排除した。なぜなら、H-RasはLTPまたはMEK/MAPK活性化におけるSynGAP媒介性の変化に必要

とされなかったからである。SynGAPからraf、MEK、およびMAPKへのリンクは現在知られていないが、これは海馬において発現されることが知られる別のRasファミリーメンバー (Manabeら、前出) および図12) であるようである。興味深いことに、高頻度刺激 (100 Hz) によるLTPの誘導はH-Ras変異体マウスにおいて増強される (Manabeら、前出) が本発明者らは低頻度 (5 Hz) 刺激誘導性のLTPがこれらのマウスにおいて通常であることが見出した。これは、LTPにおけるH-Ras依存性シグナル伝達経路の関与が、LTPを誘導するために使用されるシナプス刺激のパターン、海馬CA1領域における興奮性シナプスにおけるプロテインキナーゼAの役割を思い出させる現象に非常に依存し得ることを示唆する (Thomas, M. J. ら, Neuron 17, 475~82, 1996); Blitzer, R. D. ら, Neuron 15, 1403~14, 1995; Abel, T. ら, Cell 88, 615~26, 1997)。

【0345】

SynGAP-MAPK経路の正常な生理学的役割は、SynGAP変異およびMEKインヒビターでの研究によって示されるように、シナプス可塑性および学習を調節することにあるようである。しかし、薬理的アプローチを使用する研究は、MEKを阻害することが、野生型切片においてLTPを抑制することを見出し、一方本発明者らはSynGAP変異体における活性化MEKおよびMAPKの基本レベルの増加がまた、減少されたLTPと関連されることを見出した。1つの可能性は、MAPK経路活性化の基本レベルがSynGAP^{-/-}マウスにおいて増加されるが、LTPは損なわれないかもしれないということである。なぜならMAPK経路の活性化はNMDA受容体活性化後もはや正確には調節されないからである。あるいは、変異体におけるMAPK経路の慢性的なアップレギュレーションは、LTPの誘導および/または発現において関与される下流の標的のダウンレギュレーションを導き得る。明らかに、この逆説の解明はLTP誘導におけるMAPKシグナル伝達の役割を、特にLTPに関与される下流標的の同定に関してより良好に理解すること、ならびに変異体および野生型海馬におけるNMDAR活性化後のMAPK活性化の定量的比較を必要とする。

【0346】

PSD-95は、SynGAPをNMDARに結びつける重要なアダプタータンパク質として同定されたが、本発明者らの実験において見られたPSD-95およびSynGAP変異体マウスの劇的に異なる表現型は、PSD-95は、複数のシグナル経路をNMDARに結びつける多機能性のアダプタータンパク質として最も作用するようであることを示す(図17)。これらの経路は、MAPK依存性成分(ここではSynGAP/PSD-95相互作用がNMDARをMAPK経路の活性化に結びつける)、および第2にSynGAP/MAPK非依存性経路(PSD-95変異体において破壊される場合、LTPの劇的な促進を生じる)に分けられ得る。この第2の経路を含むシグナル伝達因子は未だ同定されていないが、PSD-95変異体におけるLTPの増強は、この経路が正常にはLTPの誘導を阻害または抑制するように作用することを示唆する。PSD-95変異体において観察された増強されたLTPがMEKインヒビターによって抑制されないという本発明者らの知見に基づいて、PSD-95における変異は、これらの経路の両方を結び付けないようであり、増強されたMAPK非依存性LTPを生じる。これはさらにMAPK経路がそれ自身LTPの誘導に必要とされないが、その代わりにLTP誘導におけるより調節性の役割を作用し得ることを示唆する(またWatabe, A. M.ら, J Neurosci 20, 5924~31, 2000およびWinder, D. G.ら, Neuron 24, 715~26, 1999を参照のこと)。

【0347】

LTPを増強するおよびLTPを抑制する経路を相互作用する生理学的重要性は、単一のシグナル伝達複体内に同時に局在化されるのか。1つの考えられ得る可能性は、これが、細胞内カルシウムにおける非常に局在化されたNMDAR依存性増加の迅速な検出を許容し、そしてカルシウムのマグニチュードおよび/または持続時間が、シナプス強度および神経可塑性の他の兆候における長期間の変化を誘導することを可能にするシグナル伝達機構を提供することである。事実、SynGAPおよびPSD-95変異体マウスの本発明者らの研究からの結果は、シナプスNMDAR電流に対してなんら効果を有しないNMDA受容体シグナル伝達複体の組成の遺伝子操作が、それにもかかわらず、シナプスが特定の頻度のシナプス活性化にどのように応答するかを強力に変化することを示してい

る。このことは、LTPの頻度依存性の特徴のいくつかの局面が、多タンパク質複合体内に生じるシグナル伝達経路の作用および相互作用から生じることを示す。

【0348】

複数のシグナル伝達機構が受容体に連結されるタンパク質複合体内で生じるという意見は、細胞生物学において十分に受容され、および大部分の受容体に拡張される。これらとしては、増殖因子(チロシンキナーゼ)受容体、T細胞受容体、およびより最近では、ショウジョウバエ光伝達に關与されるTRPカルシウムチャンネルが挙げられる。TRPとアセンブリされた複合体は、「シグナルプレックス(signalplex)」(Montell, C. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 231~68, 1999)または「トランスジューシソーム(transducisome)」(Tsunoda, S.ら, *J Nature* 388, 243~9, 1997)として知られ、複数のシグナル伝達酵素(PKCおよびホスホリパーゼC)および光活性化TRPチャンネルを組織化するためにPDZ含有タンパク質INADを必要とする。これらの成分の破壊は、多タンパク質複合体の本発明者らの研究において観察された様式と類似の様式において変化された生理学的応答を導く。シグナル伝達複合体の細胞質成分がイオンチャンネルとの相互作用の前にアセンブリされ得るという最近の証拠は(Tsunoda, S.ら, *Neurosci* 21, 150~158, 2001)は、細胞内複合体が受容体ではなく重要なシグナル伝達機構であり得、および外部環境からのシグナルに対するその特異性は、特異的な受容体の挿入によって得られるという可能性を生じる。この種類のモデルは、異なる神経伝達因子受容体が、PSD-95および他の多タンパク質複合体アダプタータンパク質を結合し得、そして異なる神経伝達物質によって駆動される異なるシナプスに対する可塑性応答を付与する異なる複合体の寄せ集めを生成するという見解を伴う。シグナル伝達における役割に加えて、受容体複合体は、リガンド依存性イオンチャンネルの転換およびそれらの特性を調節するにおいて關与する。例えば、PKAはチャンネル特性を調節するためにNMDARに補充され(Westphal, R. S.ら, *Science* 285 93~6, 1999)およびAMPA受容体とのNSF相互作用の破壊は、それらの表面発現を変化する(Nishimune, A.ら, *Neuron* 21, 87~97, 1998; Song, I.ら, *Neuron* 21, 393~400, 1998)。

【0349】

学習およびHebb可塑性

別のニューロンによるあるニューロンの反復される点火がニューロン間の活性化の効力において安定な増加を導き、およびこのプロセスは学習を強調するというHebbの仮説(Hebb, D. O. 挙動の組織化; 神経生理学的理論, Wiley, New York, 1949)は、無脊椎動物および脊椎動物における多くの電気生理学および生理学的研究によって支持された(Bailey, C. H.ら, Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 29, 529~44, 1944; Martin, S. J.ら, Annu Rev Neurosci 23, 649~711, 2000において概説される)。哺乳動物の海馬、げっ歯類およびヒトにおける空間的学習に必要とされる構造において、NMDARチャネルの薬理的遮断は学習およびLTPの両方を妨げる(Collingridge, G. L.ら, J Physiol(Lond)334, 33~46, 1983; Morris, R. G.ら, Nature 319, 774~6, 1986)。正常な学習およびシナプス可塑性に必要とされる複合体におけるより大きな数のタンパク質は、複合体が、これらのシナプスにおけるHebb特性についての分子基準を提供することを示す。しかし、SynGAPおよびPSD-95変異体のLTPおよび空間的学習の表現型の比較は、Hebbモデルのいくつかの局面からの離脱を示す。SynGAP変異体マウスは、空間的学習の速度に対する効果を伴って減少されたLTPを示したが、最終的な漸近線に到達せず、一方、PSD-95変異体はいくつかの障害された空間的学習を伴って、増強されたLTPを示した。従って、NMDARに結合される2つの相互作用するタンパク質は、海馬および中枢神経系における発現の類似のパターンを伴って、LTPと学習との間の単純な相関を分離するようである。

【0350】

一方で、これは、複合体内のいくつかの経路が可塑性におけるより重要な役割を果たすが、他の経路は主に、学習に関与するという可能性を生じ、または他方で、複合体はLTPの全体のマグニチュードよりも、空間的学習に関連されるシナプス可塑性および/または異形成の他の特徴を制御し得る。例えば、複合体によって制御されるシグナル伝達事象は、シナプス活性の特異的なパターンがどのようにシナプス強度における持続的な変化に変換されるのかを支配するシナプス

の「役割」を生成するにおいて重要な役割（例えば、頻度感受性、EPSP/スパイクタイミングなど）を有し得、およびこれらのパラメータにおける変化は、どのように十分な情報が学習の間に保存されるのかにより関連し得る。

【0351】

SynGAPおよびPSD-95変異体マウスの両方は、空間的学習における欠損を示す。この観察は、また学習障害を生じる多タンパク質複合体の成分における少なくとも16個の他の遺伝子および薬理的動揺で保持される。しかし、この複合体が空間的記憶のコードに重要に関与されるという事実は、回顧のようなさらなる記憶プロセスにおける関与を必ずしも意味しない。PSD-95変異体マウスにおいて観察される挙動障害の重篤性に起因して、別々の記憶プロセスにおけるこのタンパク質の役割を評価することが不可能であった。SynGAPマウスは、他方、野生型よりも学習することが遅かったが、最終的に台座配置をコードし得た。それらの獲得欠損と対照的に、SynGAPマウスは、空間的情報の正常な長期間の保持を示し、両方の変異体および野生型において等価な忘却速度を伴った。それゆえ、SynGAPが空間的記憶の回顧において任意の重要な役割を果たすことはなさそうである。この知見は、NMDA受容体の薬理的ブロックを含む以前の研究と一致する。ラットにおけるAP5の投与は、以前に学習された嗅覚区別の保持(Staubli, U.ら, Behav Neurosci 103, 54~60, 1989)、または水迷路試験(Morris, R. G., J Neurosci 9, 3040~57, 1989; Steele, R. J. & Morris, R. G., Hippocampus 9, 118~36, 1999)に対して何の効果も有しないが、新規な学習が、両方のタイプの課題において重篤に障害される。これらようなデータは、NMDA受容体を含有する多タンパク質複合体が学習についてサイレントである神経活性のパターンを検出し、次いでニューロンおよび回路の状態をともに変化する細胞性変化(LTP、LTD、遺伝子転写など)を引き起こすことを主に担うことを示す。情報のその後の読み出し-記憶の回顧-は、複合体のさらなる活性を通常必要としないが、記憶再活性化は時折新規な学習を含み得る(Nader, K.ら, Nature 406, 722~6(2000))。

【0352】

ヒトおよびマウスにおいて、ニューロフィブロミン(NF-1)遺伝子の破壊

は、学習的欠陥を生じる(Ozonoff, S., Am J Med Genet 89, 45~52, 1999; Silva, A. J.ら, Nat Genet 15, 281~4, 1997)。NF - 1はまた、GAPタンパク質であり、およびSynGAPに対して構造的類似性を共有する。本発明者らは以前に、NF - 1およびSynGAPの両方が、多タンパク質複合体の成分であることを報告し、およびNF - 1変異体が、この複合体におけるその機能を介して学習欠損を生じ得ることを示唆した。NF - 1およびSynGAP変異体マウスの生理学的および生化学的特性の比較は、これらの2つのGAPタンパク質の機能における潜在的な重複を取り組むために必要である。

【0353】

結論すると、本研究は、PSD - 95を介してNMDARに結び付けられる異なるシグナル伝達経路が、シナプス可塑性および学習の生理学的特性を制御することを示す。重要なことに、これらの経路はタンパク質の2000kD複体内に含まれる。本発明者らのデータは、この複合体が、シグナル取り込み装置として作用し、および学習の細胞性基準の基礎となるシグナルを保持することを示す。

【0354】

実施例5：慢性疼痛挙動における多タンパク質複合体の役割の調査

<序論>

脊髄におけるグルタミン酸受容体は、体性感覚インプットのプロセスにおいて重要な役割を果たす(L. Urban, S. W. Thompson, A. Dray, Trends Neurosci. 17, 432~438, 1994)。特に、NMDA受容体は、反復性の急進性刺激または抹消組織もしくは神経に対する傷害によって引き起こされる中心的な感作および疼痛において関係される(T. J.Coderre, R. Melzack, Journal of Neuroscience 12, 3665~3670, 1992; S. R. Chaplan, A. B. Malmberg, T. L. Yaksh, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 280, 829~838, 1997; J. E. Haley, A. Sullivan, A. Dickenson, Brain Research 518, 218~226, 1990; C. J. Woolf, M. Costigan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 7723~7730, 1999)。神経障害性疼痛は、現在の鎮痛剤によって不十分に処置され(S. Arner, B. A. Meyerson, Pain 33, 11~23, 1988)、および求心および中枢神経の表現型

および機能における複数の変化を包含し(T. Hokfelt, X. Zhang, Z. Wiesenfeld-Hallin, Trends Neurosci. 17, 22~30, 1994; T. Dickinson, S. M. Fleetwood-Walker, Trends Pharmacol. Sci. 20, 324~329, 1999; D. J. Mayer, J. Mao, J. Holt, D. D. Price, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 7731~7736, 1999)、さらに他の慢性疼痛の状態におけるように、NMDA受容体は重要であるようである(S. R. Chaplan, A. B. Malmborg, T. L. Yaksh, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 280, 829~838, 1997; M. Tal, G. J. Bennett, Neuroscience Letters 151, 107~110, 1993; J. Maoら, Brain Res. 605, 164~168, 1993; T. R. Tolle, A. Berthele, W. Zieglgansberger, P. H. Seeburg, W. Wisden, Journal of Neuroscience 13, 5009~5028, 1993)。NMDA受容体は2つの主なサブユニット、NR1およびNR2から構成され、これは脊髄の後角を介して発現される(T. R. Tolle, A. Berthele, W. Zieglgansberger, P. H. Seeburg, W. Wisden, Journal of Neuroscience 13, 5009~5028, 1993; J. M. Luque, Z. Bleuel, P. Malherbe, J. G. Richards, Neuroscience 63, 629~635, 1994)。NR1サブユニットは重要な機能的サブユニットであるが、NR2サブユニットは細胞内アダプターおよび調節性タンパク質についてのドッキング部位を提供する(H. C. Kornau, L. T. Shenker, M. B. Kennedy, H. Seeburg, Science 269, 1737~1740, 1995; M. Niethammer, E. Kim, M. Sheng, Journal of Neuroscience 16, 2157~2163, 1996)。

【0355】

NR2 C末端モチーフは、MAGUKファミリーのPDZドメインアダプタータンパク質によって標的化され(H. C. Kornau, L. T. Shenker, M. B. Kennedy, H. Seeburg, Science 269, 1737~1740, 1995; M. Niethammer, E. Kim, M. Sheng, Journal of Neuroscience 16; 2157~2163, 1996; 実施例1)、その最も良好な特徴づけはPSD-95である。具体的には、PSD-95の最初の2つのPDZドメインは、NR2サブユニットC末端の最後の4~6アミノ酸残基と相互作用することが示された。MAGUKタンパク質は、シナプス膜で受容体をクラスター化し、そして下流経路に対するシグナル伝達のための橋として作用することが考えられる(実施例1を参照のこと; M. Niethammer, E. Kim, M. Shen

g, Journal of Neuroscience 16, 2157~2163, 1996; S. E. Craven & D. S. Br edt, Cell 93, 495~498, 1998)。ここで本発明者らは、神経障害性感作が、NMDA受容体機能のアダプター媒介性の機構に依存し得るという可能性を取り組んだ。

【0356】

第2のPDZドメイン以外を短縮された変異体PSD-95遺伝子を発現するトランスジェニックマウス(M. Migaudら, Nature 396, 433~439, 1998)を使用して、本発明者らは、PSD-95が脊髄後角において発現されること、およびPSD-95変異体が、野生型コントロールにおいて見られるNMDA受容体依存性神経障害性疼痛挙動のほとんど完全な不在を示すことを示す。後角におけるCa²⁺上昇応答をモニターするためにCaMKキナーゼIIの構成的活性を利用して、本発明者らは、PSD-95変異体マウスがNMDAに対する正常な急性応答を示すが、神経を傷害された野生型マウスにおいて通常見られるNMDA依存性応答の増強は、変異体動物において廃止されることを示す。対応して、脊髄NR1サブユニットの傷害誘導性のリン酸化はPSD-95変異体において強力に低減された。リン酸化によるNMDA受容体機能の調節を導くMAGUK媒介性相互作用は、神経障害性疼痛の基礎となる機構に重要であるようである。

【0357】

材料および方法

脊髄におけるNMDA受容体複合体の分子組成

野生型マウスからの脊髄を、1% デオキシコール酸ナトリウム、50mM NaF、20μM ZnCl₂、1mM オルトバナジン酸ナトリウム、0.5mM PMSF、2μg/ml アプロチニン、および2μg/ml ロイペプチンを含む50mM Tris pH9.0中4にてホモジナイズした。抽出物(0.5ml)を、1時間氷上で温置し、そして13,000×gにて1時間4での遠心分離によって澄清化した。以前に記載されるように[H. Husiら, Nature Neuroscience 3, 661(2000)]、MAP NR1 IgG、PSD-95 IgG、NR2A、およびNR2B、またはNR2B 6アミノ酸C末端を、4時間4にて、抽出物とともに温置した。Protein G Sepharo

se (15 μ l) を続いて添加し、そしてサンプルを一晩4℃にて一定の振盪下で保持した。サンプルを0.5 ml 冷却抽出緩衝液で5回洗浄し、その後Laemmli 緩衝液中に可溶化した。タンパク質サンプルを、還元SDS-PAGE に供し、そして4℃で90分間、75 Vにて10% (v/v) メタノール、10 mM CAPS pH 11.0 中、PVDFメンブレンにトランスファーした。プロットをプローブするために使用された1次抗体は、以前に記載されるようであり(実施例1を参照のこと)、およびシグナル検出は、化学発光を増強されたペルオキシダーゼ結合2次抗体を使用して行われた。100 μ g 脊髄および50 μ g 前脳抽出物の直接的な免疫プロットが比較のために示される。

【0358】

エクスピボCaMキナーゼII活性試験

麻酔下での腰部L3~6の椎弓切除後、マウスは、いくつかの場合において以前に慢性的な狭窄傷害を受け、脊髄の背側表面に対する薬剤の局所的な適用によって処置された。コアゴニストのグリシン(100 μ M)、イオノマイシン(10 μ M)、または生理食塩水ベシクルとともにNMDA(500 μ M)を、500 μ lの容量中で15分間適用した後、氷上の冷却緩衝液に迅速に取り出した。CaM IIキナーゼの構成的な(自己リン酸化)およびCa²⁺/CM誘発性活性[P. I. Hansonら, Neuron 3, 59(1989); P. M. JonesおよびS. J. Persaud, Am. J. Physiol. 274, E708(1998)]を、以下の手順によって測定した。サンプルを、5%グリセロール、1 mM EGTA、1 mM ジチオトレイトール、1 mM AEBSF、2 μ g ml⁻¹アプロチニン、10 μ g ml⁻¹ロイペプチン、2 μ g ml⁻¹ペプスタチン、50 μ g ml⁻¹ダイズトリプシンインヒビター、25 mM Na⁺-グリセロリン酸、1 mM Na⁺ オルトバナジン酸、1 mM Na⁺ F、1 μ M カリクリンA、1 μ Mシペロメトリンを含有する20 mM Na⁺ HEPES pH 7.5 中氷上で迅速にホモジナイズした。0.25% CHAPSとの氷上における30分間の温置および澄清化後、サンプルを4℃にて2時間、3 μ g ml⁻¹マウス抗-CaMキナーゼII IgG(クローンCB-2; Zymed)とともに、次いで1時間、過剰のProtein G-Sepharoseとともに温置した。洗浄された免疫沈降物のアリコ

ートを、 $50\ \mu\text{M}$ オートカムチド-2、 $50\ \mu\text{M}$ ATP ($0.25\ \mu\text{Ci}$ / チューブに対して [^{33}P] -ATP で)、 $10\ \text{mM}$ MgCl_2 、および $8\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 精製ウシカルモジュリン (Sigma) とともに、 $0.5\ \mu\text{M}$ PKC- $_{19-31}$ および $0.5\ \mu\text{M}$ PKI- $_{6-22}$ アミドの存在下 (それぞれ、任意の PKC および PKA 媒介性の活性を抑制するために) で、20 分間 30 °C にて (線形範囲の試験) 温置し、その後冷却 TCA (10%) で終結し、遠心分離し、そして P81 ホスホ-セルロース濾紙上に上清をスポットした。サンプルを、 $75\ \text{mM}$ H_3PO_4 中で徹底的に洗浄し、乾燥した後、超音波計測した。構成的なおよび最大の Ca^{2+} で誘起される活性を、それぞれ $2\ \text{mM}$ CaCl_2 の不在下および存在下で測定した。ゼロ時間および基質非含有ブランクは、最大活性の 2% 未満であった。平行な免疫ブロッティング実験が、Thr 286 -CaMキナーゼ II (重要な自己リン酸化部位) についてのリン酸特異的抗血清を用いて試みられたが、さらなる使用について不十分なシグナル: ノイズ比であった。

【0359】

ホスホ-NR1 についての免疫ブロッティング

脊髄サンプルを最初に、CaMキナーゼ II 試験 (CHAPS を伴わない) についてのように、緩衝液中にホモジナイズし、メンブレン画分を調製した。これは 1% デオキシコール酸含有緩衝液中に、1 時間 4 °C にて可溶化され、次いで澄明化された上清を、4 時間 4 °C にて、 $3.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗 NR1 IgG (SC-1467, Santa Cruz) とともに温置し、その後 Protein G Sepharose CL-4B で、1 時間 4 °C にて沈降した。洗浄後、ビーズに付着されたタンパク質を Laemmli 緩衝液中に可溶化し、その後 Immobilon P (Millipore) メンブレン上に SDS-PAGE し、そしてペルオキシダーゼ結合 2 次抗体の増強される化学発光によって検出した。プロットを、pan-NR1 でプローブし (Chemicon、1:100)、ホスホ-Ser 897 -NR1 (Upstate Biotech、1:100) でプローブした。ホスホ-Ser 897 は、PKA によって標的化されることが示される部位での NR1 の転写後修飾を特異的に検出するが、これは Ser 897 -NR1 を

リン酸化し得る唯一のキナーゼであることを明白には示さなかった[W. G. Tingl eyら, J. Biol. Chem., 272, 5157(1997); X. Zhouら, J. Neurosci., 20, 6989 (2000)]。

【0360】

末梢神経形態学

有髄線維

トルイジンブルーで染色された坐骨神経（脛骨分岐）の1 μm 横断切片を、「Image 1.44ソフトウェア（NIH）」を使用して試験した。脛骨神経の横断切片領域を $\times 100$ の倍率で測定し、各神経切片における5つのランダムに作製された領域を4 \times 4格子を使用して選択した。分析のために、スクリーンの中央に最も近い30個の有髄化線維を選択し、軸索面積、外部面積、およびG領域（軸索直径/外部直径）を、髄厚を定量するために測定した。

【0361】

無髄化線維

坐骨神経（脛骨分岐）の80 nm横断切片を、銅スロット格子にマウントし、そして透過型電子顕微鏡において試験した。25個のランダムな領域を、2300 \times の倍率で写真撮影し、次いで $\times 5750$ の最終倍率で印刷した、これを、全ての有髄化および無髄化線維を計数するために使用した。試験のために、5つのネガティブをランダムに選択し、そして「Image 1.44」を使用するコンピュータ解析についての平床スキャナーを使用してスキャンした。30個の無髄化線維の軸索の直径/面積を、それぞれのマイクログラフから測定し、線維は、無髄化線維からのみなるクラスターから選択された。有髄化線維の頻度を1 μm 間隔で1 ~ 10 μm までスコアし、そして無髄化線維の頻度を0.1 μm の間隔で0.1 ~ 2.7 μm までスコアした。合計827個および759個の有髄化線維を、野生型およびPSD-95変異体マウスの脛骨神経からスコアし、それぞれ 2.4 ± 1.3 および 3.5 ± 1.9 の中央値直径を与えた（中央値 \pm S.D.）。対応して、合計436個の野生型および479個のPSD無髄化線維をスコアし、それぞれ 0.56 ± 0.3 および 0.47 ± 0.5 μm を与えた（中央値 \pm S.D.）。間隔の分布は、野生型とPSD-95変異体との間で有意

には異ならず (²検定)、および全てのプロフィールが、以前に発表された知見[G. Guilbaudら, Pain 53, 147(1993); C. Sommerら, J. Neuropath. Exp. Neurol. 54, 635(1995)]に従って野生型と変異体マウスとの間で類似した。

【0362】

神経障害性疼痛の挙動の評価

マウスにおける坐骨神経に対する慢性狭窄傷害(CCI)モデル

動物を最初に、ペントバルビタルナトリウム(Sagatal; 0.01 ml/kg (生理食塩水中の1:4、腹腔内; Rhone Merieux, UK)で麻酔し、次いでこれに八口タンO₂を補充した(Zeneca, UK)。無菌条件下、ラットについてのBennettおよびXieの多様な方法[G. J. BennettおよびY. K. Xie, Pain 33, 87(1988)]を使用して、坐骨三叉に近位の中大腿レベルで坐骨神経を曝露した。1 mm分離される3つのクロムカットグット結紮系(5.0; Ethicon, Edinburgh)を、緩く結び、40×倍率下で見られるように脛骨枝を狭窄した。血管供給は損なわれなかった。重層する筋肉および皮膚を縫合し、そして動物を回復ケージにおいた。

【0363】

挙動試験

動物を各試験についての安定なベースラインレベルを確立するために、手術の6日前に、次いで術後(PO)の1日または2日毎に試験した。応答を、術前値および対側コントロールの平均に比較した。動物を毎日、自体損傷がなんら存在しないことを確実にするために試験した。

【0364】

熱痛覚過敏

熱痛覚過敏を、Hargreaves' Thermal Stimulator (Linton Instruments, USA)を使用してモニターした。刺激を、後足の中足底表面に適用した。撤退応答を短い足の弾きとして特徴づけした。撤退の潜伏を、同側(傷害された)および対側後足について記録した。5と10との間の読み取りの平均を3~5分間の間隔で記録して、試験に対する過感受性が何ら確立されないことを確実にした。術前足撤退潜伏についての平均基底値は典型的に約5秒間であった。

【0365】

機械的異痛

機械的異痛を、0.22 ~ 84.96 gの屈曲力を伴って、検量されたSemmes-Weinstein von Freyフィラメントに対する撤退閾値として測定した(Stoeling, Wood Dale, IL)。マウスを、小さな長方形のケージに置いた。フィラメントが屈曲し始めるまで、フィラメントを、下から後足の中足底表面に適用した、この刺激は、傷害されたおよび傷害されていない後足の両方について1 ~ 2秒の間隔で8 ~ 10回反復された。撤退応答を誘起するために必要とされる平均閾値を記録した。フィラメントを上向順に適用し、そして応答を短い足の蹴りとして特徴づけた。撤退閾値は、応答を誘発する2つの保存的なvon Freyフィラメントの低下から規定された。データは、閾値圧入圧として表され得た(すなわち、フィラメントの先端での屈曲力/横断面積)。術前足撤退閾値に対する平均基底値は典型的に約600 mN・mm⁻²であった。

【0366】

寒冷異痛

寒冷異痛の存在を試験するために、マウスを、上昇されたメタル金属格子床を備える環状のガラスタンク中においた。これは、氷および水の混合物(3 ~ 4)で覆われ(約1 cm)、足の無毛のおよび有毛の皮膚の両方が水で覆われることを確実にした。マウスを、30秒間タンク中に置き、その最初の10秒間は動物を気候順化させた。残りの20秒間の間、測定は、水レベルを超えて上昇されおよび処理された動物の足の時間の量から作製された。挙動試験は、試験者が被験体の遺伝子型に対して盲目であることを確実にするプロトコルを使用して行われた。

【0367】

くも膜下腔内の薬物処理

ベースライン測定を、慢性的な狭窄傷害を受けたおよび神経障害のピークにあるマウスにおいて熱痛覚過敏(Hargreave試験)および機械的異痛(von Freyフィラメント試験)について記録した。マウスをハロタンおよびO₂で麻酔した。薬物を、25 μlのマイクロシリンジを使用してL4レベルの

脊髄で、10 μ l 生理食塩水中、くも膜下腔内に注射した[J. L. HyldenおよびG. L. Wilcox, Eur. J. Pharmacol., 67, 313(1980)]。実験者は、偏見を排除するように注射の内容物に対して盲目であり、および染料注射(Pontamine Sky Blue)を、注射の部位を決定するために行った。注射の15分間後、マウスを同じ手順を使用して再試験し、そして測定を痛覚過敏および異痛に対する薬物の効果を決定するために行った。動物を、読み取り値がベースラインレベルに戻るまで5分毎に試験した。

【0368】

<結果>

ヘテロ接合体変異体マウスにおいて、ガラクトシダーゼ(変異体PSD-95構築物に挿入されたレポーター遺伝子)についての組織化学的染色は、表在性の脊髄後角の薄板IおよびII。に特異的に制限された(図18a~c)。この発現は、足および胸髄を介して拡張されたが、後根侵入部位(図18d)、DRG、後根または坐骨神経(データ示さず)において検出され得なかった。野生型脊髄においてNMDA受容体を含有する脊髄多タンパク質複合体の免疫親和性分離(前脳について以前に記載されるように(実施例1))は、脊髄NR1、NR2A、NR2B、およびPSD-95に指向される免疫沈降がそれぞれ、会合されるNR1、NR2A、NR2B、およびPSD-95を含んだことを確認した(図18e)。

【0369】

坐骨神経切片の以前の報告に従った未処置の野生型および変異体マウスとの間の有髄化(AおよびA)ならびに無髄化(C)線維についての軸索直径および髄厚の類似のプロフィールを示した。変異体マウスにおける求心性の任意の検出可能な欠損の不在にもかかわらず、これらは坐骨神経の慢性狭窄傷害(CCI)に対して同側に通常発生する侵害性の挙動の発生のほとんど完全な欠損を示した(図19)。変異体および野生型マウスの両方について、熱機械的傷害性足撤退試験におけるベースライン値は、マウスについて以前に報告された値に一致した(C. S. Gillespieら, Neuron(2000)26, 523~531)。歩行運動および基本的条件下で灌流モーター応答を生成する能力は正常であるようであった。CCI後の

数日間にわたって、野生型マウスは顕著な対側、熱痛覚過敏、機械的異痛（低い強度の刺激に対する疼痛様応答）および寒冷異痛を発症した（図19a～c）。対側後足からの全ての応答は、基底値から変化されないままであった（寒冷異痛試験における不変のゼロ応答を伴った）。熱痛覚過敏も機械的異痛も、PSD-95変異体マウスにおいて全く検出され得なかったが（図19a、b）、寒冷異痛は、激しく減弱されて、1時間点のみで統計的有意性を達成した（図19c）。全てのCCIで誘起される変化が、22～23日以内に自発的に回復された。

【0370】

選択的NMDA受容体アンタゴニスト、(R)-CPPの急性のくも膜下腔内注射は、野生型マウスにおけるCCIに対して同側で発症された熱痛覚過敏および機械的異痛を逆転し、対側応答に対して何の効果も伴わなかった（図20a、b）。対応して、挙動変化は、くも膜下腔内NMDAによって未処置の野生型マウスにおいて両側的に模倣された（図20c、d）。顕著に対象的に、PSD-95変異体マウスの挙動応答は、(R)-CPPおよびNMDAのいずれによっても影響されなかった（図20）。脊髄感覚性灌流の神経障害性感作を担うNMDA受容体媒介性の事象はそれゆえ、無傷のPSD-95タンパク質の存在に非常に依存する。

【0371】

これらのモデルにおける脊髄NMDA受容体の細胞性機能を評価するために、本発明者らはCaMキナーゼIIの活性化部位をモニターした。この酵素は、シナプス後肥厚複合体と会合され(M. B. Kennedy, Trends In Neurosciences 20, 264～268, 1997)、NR2サブユニットにドッキングし(F. Gardoniら, J. Neurochem. 71, 1733～1741, 1998)、そしてNMDA受容体活性化において生じるような細胞性Ca²⁺の上昇後、構成的に活性な、自己リン酸化される形態に変換される。神経障害性感作におけるCaMキナーゼIIについての必要な役割は、選択的CaMキナーゼIIインヒビター、ミリストイル-オートカミド2関連性阻害性タンパク質、およびKN93によるが、ほとんど活性のないアナログ、KN92によるより小さな程度への、野生型マウスにおける熱痛覚過敏および機械的異痛の逆転によって示される（図22）。構成的に活性である免疫沈降された

CaMキナーゼIIの割合は、野生型またはPSD-95変異体マウスの背側脊髄への薬剤の局所的な適用後に測定された(図23)。NMDA(コアゴニストのグリシンを伴う)またはイオノマイシン(Ca²⁺イオン通過孔)の適用による活性化は、未処置の野生型マウスおよび変異体マウスにおいて等価であり、急性のNMDA受容体媒介性のCa²⁺流入が変異体において動揺されていないことを示した。それにもかかわらず、野生型マウスにおいてCCIに同側で見られた(対側ではみられなかった)構成的なCaMキナーゼII活性の上昇された割合は、PSD-95変異体において不在であった。この増加は(R)-CPPの適用によって完全に防止された。これらの知見は、PSD-95はCCI後のNMDA受容体媒介性のCa²⁺流入の促進に必要不可欠であるが、NMDAに対する急性Ca²⁺流入応答に必要でないことを示す。従って、さらなるアダプタータンパク質媒介性プロセスが、NMDA受容体媒介性の神経障害感作の挙動徴候に必要な不可欠であるようであり、Ca²⁺流入(CaMキナーゼIIインヒビターによる遮断に反映される)はまた必要であるようである。しかし、CaMキナーゼIIはCCIに応答するが、急性NMDAに応答せず、PSD-95変異体において損なうので、CCI誘導性の神経障害性疼痛における重要な因子は、NMDA受容体Ca²⁺流入機能の促進性調節であるようである。このような調節についての根拠は、キナーゼによるNMDA受容体リン酸化で有り得(Tingleyら, J. Biol. Chem. 272, 5157~5166, 1997; Westphalら, Science 285, 93~96, 1999)、および脊髄ニューロンのNMDA応答はPKCおよびPKAによって促進されることが知られる(K. I. Rusin, P. D. Ryu, M. Randic, J. Neurophysiol., 68, 265~286, 1992)。図21は、脊髄NR1免疫沈降における野生型マウスからのホスホ-NR1の免疫反応性が、CCIに対して同側で特異的に増加されたこと、およびこの応答がPSD-95変異体マウスにおいて非常に弱められたことを示す。同じサンプルにおいて、pan-NR1免疫反応性は、野生型およびPSD-95変異体マウスの両方において、CCIに対して同側で比較的減少された。現在の証拠は、PSD-95のようなMAGUKタンパク質が、NMDA受容体のような細胞表面標的タンパク質の近位においてキナーゼを配置し得るAKAP足場タンパク質に対するリンカーとして作用し得ることを示唆する

(Colledgeら, Neuron 27, 107~119, 2000)。PSD-95変異体マウスについての本発明者らのここでの知見は、PSD-95のアダプター役割が、NMDA受容体リン酸化およびその増強されたCa²⁺流入機能の機構を可能にすることにより、神経障害性疼痛の状態の発症において重要な部分を果たすことを示す。

【0372】

実施例6：脳卒中における多タンパク質複合体の役割の調査

<序論>

脳卒中は、成体の能力傷害の主要な原因であり、およびほとんどの先進国の健康部門予算の約5%を費やす。虚血性障害から脳組織を保護する治療法は現在にも利用可能ではない。英国における全死亡の3分の1を生じる脳卒中にもかかわらず、予防および処置についての意見がほとんどない。大脳虚血は、興奮性神経伝達因子のグルタミン酸の大量の放出を生じるので、製薬会社によるかなりの興味は、グルタミン酸受容体をブロックする薬物にある。グルタミン酸受容体のN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)サブタイプの活性化は、大脳虚血の病理学的変化を誘起することが知られる。NMDA受容体またはNMDA依存性イオンチャネルは、処置についての魅力的な標的であるようであるが、臨床治験は、受容体アンタゴニストの精神医学的副作用のためのみでなく、患者が受容体活性化後のある時点で、および疾患の進行の間に病院に診察を受けに行くので失望されている。

【0373】

NMDA受容体が活性化された後に作用する細胞内シグナル伝達経路はより合理的な標的を示し得る。シナプス可塑性および学習におけるNMDA受容体シグナル伝達の研究は、NMDA受容体の下流のシグナル伝達経路が、PSD-95、NMDA受容体サブユニットを結合するタンパク質によって調節されることを示す。これらの可塑性経路は、NMDA受容体刺激後の1時間の間に作用し、これは薬物が脳卒中患者に投与され得る時間枠である。PSD-95が動物において虚血性脳障害発作を改変するという証拠はなにもなかった。

【0374】

<方法および結果>

この問題を取り組むために、本発明者らはPSD-95変異体マウスにおいて一過性の包括的な虚血を誘導し、そして脳障害の程度を試験した。2重盲目研究において、両側性の頸動脈閉塞が、ハロタンで麻酔されたPSD-95-/-変異体(n=9)および野生型同腹仔コントロール(n=11)マウスに適用され、これは72時間後に屠殺され、そして正常なおよび虚血障害されたニューロンを、10mm²格子を使用して計数した(図24)。PSD-95-/-変異体マウスは、顕著に少ないニューロン障害を示した。野生型マウスにおいて、ニューロン障害は、尾状核ニューロンの47±9%において観察されたが、PSD-95-/-変異体マウスの僅か17±7%であった(P<0.02)。海馬において見られるPSD-95変異による強力な保護が存在し、ここではコントロールマウスは11±4%のニューロンに障害を示し、およびPSD-95-/-マウスは2±1%の障害を示した(P=0.08)(図25)。

【0375】

<考察>

PSD-95変異体による脳卒中脳障害に対する保護は、薬物処置についての新規な道を開く。PSD-95およびNMDA受容体は、多くの潜在的な薬物標的を含む2000kDa多タンパク質複合体シグナル伝達複合体の成分である。この複合体に対する薬物を使用するPSD-95変異体表現型の薬理的模倣は、脳卒中または頭部障害後の脳傷害において劇的な減少を同様に生じ得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】

マウス脳から抽出された多タンパク質複合体の組成物に対する洗浄剤抽出物の効果。

NMDA受容体を含有するマウス脳多タンパク質複合体を、MAP-NR1ヒツジ血清(4μl)での小規模免疫沈降を使用して単離し、続いて左側に示されるような種々の抗体でのウェスタンブロッティングによって分析した。「抽出物」と記される上部2つのパネルは、抗体54.1を用いてNR1についてプローブされた全脳抽出物のウェスタンブロッティングコントロールである。唯一の洗浄剤として1%デオキシコール酸(DOC)を使用して、左側パネルにおいて示さ

れるような多タンパク質複合体組成物を生じたのに対し、右側において示される結果は、SDSを含有する緩衝液系を使用することによって得られた。X線フィルムに対するプロットの露光時間は10秒間であった。

【図2】

3つの異なるIgGでの小規模免疫沈降。

マウス脳抽出物(0.2ml)を等量のDOC緩衝液で希釈し、そしてウサギ(356、1 μ l)もしくはヒツジ(MAP-NR1、4 μ l)からのNR1に対する全血清IgGとともに、またはPSD-95(138、1 μ l)に対する全血清とともに1時間4℃にて温置した。続いて、15 μ l Protein G-Sepharoseを添加し、そしてさらに1時間4℃にて温置した。樹脂を0.5ml DOC緩衝液で4回洗浄し、そして8% SDS-PAGEおよびクマシー染色(上部パネル)によって分析した。分子量マーカーは左側に示される。NR1に対するモノクローナル抗体54.1および抗PSD-95、ならびにポリクローナルIgG抗NR2Aを使用するこれらのサンプルのウェスタンブロットリングは、下部パネルにおいて示される。

【図3】

MAP-NR1抗体の力価測定。

小規模の実験を、0.2mlのマウス脳DOC抽出物および0.2ml DOC緩衝液と混合された0~30 μ gの精製された(パネルA)またはビオチン化された(パネルB)MAP-NR1 IgGを使用して行った。20 μ l Protein G-Sepharoseを4℃で2時間の温置後に添加し、続いてさらに一晩4℃で温置した。サンプルを0.5ml DOC緩衝液で4回洗浄し、そして7.5% SDS-PAGEゲル、その後のクマシー染色に対して分析した。コントロールは、上記のサンプルのようにプロセスされた0.4ml DOC緩衝液中の3 μ g抗体であった。矢印は、IgG重鎖の位置を示し、およびkDaにおける分子量は、各パネルの左側に示される。

【図4】

固定化抗体を使用する親和性クロマトグラフィー。

多タンパク質複合体を、NR1(356)またはPSD-95(138)に対

する固定化抗体を使用して単離し、そして6 M尿素またはpH 12へのpH移行のいずれかで樹脂から溶出した。サンプルを7.5% SDS-PAGEおよびクマシー染色によって(上部パネル)、ならびにNR1、NR2A、およびPSD-95に対する抗体を使用するウェスタンブロッティングによって(下部パネル)分析した。SDS-PAGEのkDaにおける分子量マーカーは、左側に示される。

【図5】

マウス脳抽出物のリガンド親和性精製。

脳DOC抽出物を、affigel-10-またはPharmaLink結合リガンドとともに温置し、そして保持されたタンパク質を、12% SDS-PAGEおよびクマシー染色(上部パネル)によって分離した。kDaにおける分子量マーカーは左側に示される。下部パネルは、NR1、NR2B、およびPSD-95に対する抗体を使用した種々のサンプルのウェスタンブロッティング分析を示す。全抽出物(10 µl)はコントロールとして使用され、そして最も左側のパネルにおいて示される。

【図6】

マウス脳抽出物のペプチド親和性精製。

小規模実験を、affigel-10またはTrisでブロックされたaffigel-10のネガティブコントロールに共有結合的に連結された種々のペプチド、ならびに0.5 ml マウス脳DOC抽出物を使用して行い、そして10% SDS-PAGE、続いてクマシー染色によって分析した。kDaにおける分子量マーカーは左側に示される。

【図7】

3つの異なるストラテジーを使用する精製された多タンパク質複合体の比較分析。

マウス脳抽出物(50 ml)を、0.5 mgの親和性精製されたMAP-NR1 IgGでの大規模免疫沈降(レーンMAP-NR1)、0.5 ml MAP-NR1 affigel(レーンMAP-NR1 affigel)、および0.5 ml NR2B C末端ペプチド樹脂(レーンNR2B 1477-148

2)でのスケールアップされた免疫親和性クロマトグラフィーのそれぞれについて使用した。10 μ lの抽出物を、コントロールとしてレーンにつき使用した(レーン抽出物)。サンプルを12%SDS-PAGEおよびクマシー染色によって分析するか(上部パネル)、示されるような抗体でプローブされたウェスタンブロットングについて使用した(下部パネル)。SDS-PAGEゲルのkDaにおける分子量マーカーは左側に示される。

【図8】

マウス脳から単離された多タンパク質複合体の基本的な組成。

A、B：マウス脳抽出物(レーンEx)からの多タンパク質複合体の免疫親和性(レーンIA)、免疫沈降(レーンIP)、およびNR2Bペプチド親和性(レーンPep)単離からのSDS-PAGE(A、12%、B、6%)のタンパク質染色。示されるネガティブコントロールは、Protein G-Shepharoseに結合されたMAP-NR1 Ig(レーンIg+G)、およびProtein G-Shepharoseに結合された抽出物(レーンEx+G)である。矢頭は、タンパク質Ig種を示す。特異的結合タンパク質の複合体混合物は、70kDaを上回る範囲において主に観察され、そして質量分析に供された(図1G、表2)。

C．多タンパク質複合体中のNMDA受容体サブユニットおよびMAGUKタンパク質の免疫プロット分析。NR1、NR2A、NR2B、PSD-95、およびChapsyn-110が検出された。

D．多タンパク質複合体におけるPSD-95結合タンパク質の免疫プロット分析。nNOS、SynGAP、GKAP、およびCitronが検出された。

E．多タンパク質複合体におけるAMPA受容体サブユニットおよびGRIPの免疫プロット分析。GluR1、GluR2、GluR2/3、GluR4、およびGRIPが、開始材料(Ex)中で容易に検出されたが、3つの多タンパク質複合体調製物中で検出されなかった。

F．多タンパク質複合体中のmGluR1受容体およびHomerタンパク質の免疫プロット分析。mGluR1およびHomerが検出され、多タンパク質が代謝調節型グルタミン酸受容体を含むが、AMPA受容体を含まないことを示

す。

G. 質量分析について励起されたバンドの位置(矢頭)を示す多タンパク質複合体のタンパク質染色(6% SDS-PAGE)。

【図9A】

(多タンパク質複合体の質量分析における)タンパク質同定ストラテジー。

SDS-PAGEからの染色バンド(図1G)を切り出し、そしてトリプシンで消化し、そしてQ-TOF(図9B)、LC-MS/MS(図9C、D、E)を使用して分析し、続いてオンラインコンピューター解析を行った。

【図9B】

(多タンパク質複合体の質量分析における)Total Ion Survey Baseピーククロマトグラム(90 kDaでのタンパク質バンドからの例)。

各MSスキャンにおける2つの最も強烈なイオンを、衝突誘導性フラグメント化およびMS/MS態様(LC-MS/MS)における分析について自動的に選択した(図9C)。

【図9C】

(多タンパク質複合体の質量分析における)LC-MS/MS Baseピーククロマトグラム。

38.2分および42.6分での標識は、ペプチド配列情報を作成するために使用された選択されたペプチドを示し、2つのこのような例が示される(図9D、E)。

【図9D】

(多タンパク質複合体の質量分析において、)図9Cの42.6分にて溶出するピークから得られる平均されるMS/MSスペクトル。

質量対電荷比(m/z)890.72(1617.44Daのペプチドに対応する)での2重に荷電されたイオンが、衝突誘導性解離によるフラグメント化について選択された。N末端(b型イオン)またはC末端(y型イオン)のいずれかから起源するフラグメントイオンは、Mascotデータベースサーチプログラムを使用して同定されたアミノ酸配列に対応した。この例において、MS/MSスペクトルは、PSD-95残基113~126(アクセス番号Q6210

8)からのペプチド配列VNDSILFVNEVDVRに適合した。

【図9E】

(多タンパク質複合体の質量分析において、)図9Cの38.2分にて溶出するピークから得られた平均化MS/MSスペクトルから同定された多タンパク質複合体の新規な成分の例。

m/z 538.68 (1071.65 Daのペプチドに関連する)にて観察された2重に荷電された前駆体イオンが、Mascotサーチプログラムによって、dbESTクローンAV153731を適合する配列DLKEILTLKとして同定された。

【図10】

多タンパク質複合体の成分を包含する推定のシグナル伝達経路。

多タンパク質複合体成分の多くは、公知の生化学経路の部分である。経路のいくつかの成分はAMPA受容体、シナプス構造変化(アクチン再構成および細胞接着)、神経生存、および転写を調節する説明されるおよび示唆される経路であり、示される。アダプターおよびPSD-95、Yotiao、およびAKAPを含む他の構造分子は示されていない。シナプス後膜が、黒線で示され、および灰色の囲みは、多タンパク質複合体を包含する。

【図11】

可溶性多タンパク質複合体のゲル濾過分析。

複合体を、大規模IPによって単離し、そして材料および方法の節において記載されるようにペプチド競合によって樹脂から競合し、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって分画化した。グラフは、標準としてBlue Dextran 2000(破線)およびチオグロブリン(点線)を使用した2つの検量線、ならびにNMDARサンプルの分離(直線)を示す。画分は、溶出容量(v0)と全カラム容量(vt)との間で取られ、そしてNR1に対するウェスタンブロットティングによって分析された(挿入図)。

【図12】

SynGAPおよびH-Ras変異体マウス。

図12aは、SynGAP遺伝子の標的化破壊を示している。上部：制限酵素

部位(B, BglIII; E, EcoRI; Sm, SmaI; Sp, SpeI; X, XhoI; Xb, XbaI)を伴うSynGAP遺伝子; 黒い囲み、エクソン; 太線、標的化ベクターにおいて使用された相同な領域; サザンブロットプローブが示される(3')。下部; SynGAP標的化ベクター。HA、ヘマグルチニン配列; IRES、内部リボゾーム侵入部位; LacZ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子; neo、ネオマイシン耐性遺伝子。SynGAP遺伝子の下部の矢印はアルギニン312(または470)を示し(以下の実施例4を参照のこと)、これはRasGAPタンパク質において高度に保存され、およびGAP活性に必要であり、および標的化ベクターにおいて欠失された。図の右側: ヘテロ接合体交雑の同腹仔からのEcoRI消化され、および3'プローブでプローブされたDNAのゲノムサザンブロット。野生型(+/+), ヘテロ接合体(-/+), ホモ接合体(-/-)が示される。

図12bは、H-Ras遺伝子の標的化破壊を示している。上部: 制限酵素部位(上述のようであり、以下の付加を伴う: Bg, BglII; S, SphI; F, FspI)を伴うH-Ras遺伝子、全ての他の詳細は図1aにおけるようである。底部: 標的化ベクター。 β -geo、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子融合遺伝子からなる。図の右側: ヘテロ接合体交雑の同腹仔からのEcoRI消化され、および5'プローブでプローブされたDNAのゲノムサザンブロット。野生型(+/+), ヘテロ接合体(-/+), ホモ接合体(-/-)が示される。

図12cは、全マウントシグナル脳切片のX-gal染色を使用するSynGAPおよびH-Rasの発現パターンを示している。BS、脳幹; C、皮質; CB、小脳、H、海馬。典型的なSynGAP-/+およびH-Ras-/-切片が示される。

図12dは、海馬抽出物における野生型マウス、SynGAP-/+変異体、およびH-Ras-/-変異体の異なるタンパク質レベルを比較する免疫プロットを示している。

左側パネル: GAPタンパク質の免疫プロット分析。SynGAP、NF-1、およびRas-GAPが、野生型(wt)、SynGAP-/+変異体、およびH-Ras-/-変異体において検出された。野生型と比較して減少された量のSyn

GAPタンパク質が、SynGAP^{-/+}変異体において観察された。

中央パネル：Rasタンパク質の免疫プロット解析。H-Rasが、野生型マウスにおいて検出され、およびSynGAP^{-/+}変異体において正常であった。Pan-Ras抗体は、全てのRasイソ型を認識し、H-Ras^{-/-}変異体においてより低い全Rasレベルを、およびSynGAP^{-/+}変異体において正常なレベルを示した。

右側パネル：NMDARサブユニット(NR1、NR2A、NR2B)およびPSD-95の免疫プロット解析。等価なレベルが、野生型(wt)、SynGAP^{-/+}、H-Ras^{-/-}抽出物において観察された。

【図13】

SynGAP^{-/+}およびH-Ras^{-/-}変異体マウスにおける海馬CA1領域の神経解剖。

Nissl；CA1錐体細胞のクレシルバイオレット染色。

シナプトフィシン；シナプスベシクルマーカータンパク質についての免疫組織化学。

MAP2；樹状突起マーカータンパク質についての免疫組織化学

Golgi；放射状層の遠位領域におけるゴルジ浸透性の錐体ニューロンからのCA1尖端樹状細胞のモンタージュ画像。

EM；CA1領域の放射状層における非対称性の軸索とげ状のシナプスの電子顕微鏡画像。

スケールバー；Nissl、シナプトフィシン、MAP2 50 μm；ゴルジ、10 μm；EM、0.5 μm。

SR、放射状層；Sp. 錐体細胞体層；wt、野生型；SynGAP^{-/+}およびH-Ras^{-/-}変異体が示される。

【図14】

SynGAP変異体マウスにおけるNMDAR依存性海馬LTP。

LTPは、NMDA受容体媒介性シナプス電流における変化の不在下、SynGAP^{-/+}変異体において減少された。

(図14a)

EPSCのNMDA受容体媒介性成分のマグニチュードが、EPSCの開始の50ミリ秒後で測定されたシナプス電流の振幅によって見積もられ、およびEPSCの開始の5ミリ秒後のEPSC測定の大きさによって見積もられるAMPA受容体成分のサイズに相對して表される。SynGAP-/+変異体マウス錐体細胞におけるEPSCのNMDA受容体媒介性成分の大きさ(黒棒、N=5匹のマウス、15細胞)は、-80mV(ここでNMDA成分は細胞外Mg²⁺によって大きくブロックされる)および+40mVの保持ポテンシャルにて野生型錐体細胞において観察された大きさ(白棒、N=5匹のマウス、16細胞)から異ならなかった。挿入図は、SynGAP-/+変異体(底部)および野生型マウス(上部)からの細胞において、-80および+40mVにて記録された例EPSC(3応答の平均)を示す。検量線棒は、50pAおよび25ミリ秒である。

(図14b)

ベースライン記録の20分間後、2連続の100Hz刺激が、0時間にて10秒間の連続内間隔にて送達された。このプロトコルは、野生型動物から切片において強固なLTPを誘導したが(白丸、fEPSPはベースラインの $188 \pm 9\%$ に増強された、N=7動物からの11切片)、これはSynGAP-/+変異体マウスからの切片において有意に少ないLTPを誘導した(黒丸、fEPSPはベースラインの $150 \pm 10\%$ に増強された、N=7動物からの11切片、 $t(12)=3.14$ 、野生型LTPに比較して $p < 0.01$)。

(図14c)

6連続の100Hz刺激(それぞれ1秒間の持続時間)が、LTPの飽和化レベルを誘導するために時間=0で開始される5分間の連続内間隔で送達された。野生型切片において、fEPSPはベースラインの $257 \pm 25\%$ に増強されたが(白丸、N=4動物からの7切片)、SynGAP-/+変異体からの切片においてベースラインのわずか $154 \pm 3\%$ に増強された(黒丸、N=5動物からの11切片、 $t(7)=4.71$ 、野生型LTPに比較して $p < 0.005$)。

(図14d)

1、5、10、または20Hz刺激のいずれかの900パルス連続の40~45分間後で存在する、野生型(白丸、各頻度についてそれぞれN=5、5、5、

および7動物)およびSynGAP-/+変異体マウス(黒丸、各頻度についてそれぞれN = 9、7、7、および7動物)からのスライスにおける、LTPの量を示すまとめのグラフ。1 Hzおよび5 Hz連続のシナプス刺激はSynGAP-/+および野生型マウスからの切片におけるシナプス伝達に対して類似の効果を示したが、10 Hzおよび20 Hz連続の刺激はSynGAP-/+マウスからの切片において有意に小さなLTPを誘導した($p < 0.001$ 、 $p < 0.05$)。

(図14e)

シナプス後脱分極化と対にされる低頻度(2 Hz)シナプス前線維刺激によって誘導されるLTPは、SynGAP-/+マウスからのCA1錐体細胞において減少された。EPSPは、時間 = 0にてシナプス後脱分極と対にされた。対合後25 ~ 30分間の間で記録されたEPSPは、野生型切片からの細胞においてベースラインの $262 \pm 15\%$ に増強され(白丸、N = 7動物からの13切片)、およびSynGAP-/+マウスからの細胞においてベースラインの $185 \pm 9\%$ に増強された(黒丸、N = 8動物からの12切片、 $t(13) = 4.35$ 、野生型に比較して $p < 0.001$)。挿入図は、野生型マウス(トレースの左セット)およびSynGAP-/+変異体動物(トレースの右セット)からの細胞において、ベースラインと対合後30分間との間に記録されたEPSC(3応答の平均)を示す。検量線棒は、5 mVおよび25ミリ秒である。

(図14f)

図14eにおいて示される平均結果によって表される全ての細胞(白丸は、野生型動物からの細胞であり、黒丸はSynGAP-/+マウスからの細胞である)中で見られた対合誘導性LTPの量を示す累積確立分布。

【図15】

PSD-95がSynGAP-MAPK経路およびMAPK-非依存性経路を結びつける。

(図15a)

短い連続の5 Hz刺激(150パルス、時間 = 0で送達される)の後、シナプス伝達は、PSD-95(白三角、fEPSPは、ベースラインの 258 ± 33

%に増強される、N = 4動物からの6切片) およびSynGAP-/+ PSD-95 二重変異体動物(黒三角、fEPSPはベースラインの $244 \pm 7\%$ に増強される、N = 4動物からの9切片)からの切片において2倍を超えるLTPに増強された。SynGAP-/+変異体切片におけるシナプス強度に対する5Hz刺激の効果を調査する実験からの結果が比較のために示される(白丸、e部においてまとめられた実験からのデータ)。

(図15b)

SynGAP、H-Ras、SynGAP/Ras変異体海馬抽出物におけるMAPK経路リン酸化。MEKおよびMAPKリン酸化(pMEK、pMAPK)を測定する免疫ブロットおよびタンパク質レベル(MEK、MAPK)が、野生型マウス(wt)、SynGAP-/+、SynGAP-/+H-Ras-/-、およびH-Ras-/-変異体において示された。MEKおよびMAPKのリン酸化形態が、SynGAP-/+、SynGAP-/+H-Ras-/-変異体において増加された。

(図15c)

MEKインヒビターU0126(20 μ M)は、野生型切片において5Hz刺激誘導性LTPを阻害する。切片を5Hz刺激(時間=0で送達される)の前の少なくとも60分間、U0126を含有するACSF中に連続的に浴した。強いLTPが、ベヒクルコントロール実験において誘導された(0.2% DMSO、白丸、fEPSPはベースラインの $209 \pm 7\%$ に増強された、N = 6切片)が、有意に少ないLTPが、U0126処理された切片において誘導された(黒丸、fEPSPはベースラインの $137 \pm 9\%$ であった、N = 11切片、 $t(15) = 5.4$ 、コントロールに比較して $p < 0.001$)。

(図15d)

PSD-95変異体マウスからの切片において、U0126は5Hz刺激誘導性LTPに対してほとんど効果を有しなかった。fEPSPはベヒクルコントロール実験において、ベースラインの $262 \pm 14\%$ (N = 8切片)に、およびU0126に連続的に曝露された切片においてベースラインの $270 \pm 12\%$ (N = 14切片)に増強された($t(20) = 0.45$ 、ベヒクルコントロール実験

から有意な差異はなかった)。

(図15e)

野生型、SynGAP^{-/+}、H-Ras^{-/-}、およびSynGAP^{-/+}/H-Ras^{-/-}二重変異体における150パルス連続の5Hz刺激の45分後に見られる電位の量のまとめ。短い連続の5Hz刺激(150パルス)後、野生型動物からの切片においてベースラインの $178 \pm 14\%$ (N=6動物からの12切片)に増強されたが、SynGAP^{-/+}マウスからの切片においてベースラインのわずかに $129 \pm 5\%$ に増強された(N=5動物からの10切片、 $t(9) = 3.03$ 、野生型に比較して $p < 0.02^{**}$)。このプロトコルによって誘導されるLTPの量はまた、H-Ras^{-/-}変異体マウス(fEPSPはベースラインの $157 \pm 6\%$ に増強された、N=6動物からの12切片)において観察された量に比較してSynGAP^{-/+}/H-Ras^{-/-}二重変異体(fEPSPはベースラインの $120 \pm 4\%$ であった、N=5動物からの9切片、 $t(9) = 2.36$ 、 $p < 0.05^*$)において有意に減少された。

(図15f)

SynGAPおよびPSD-95変異体におけるMAPK経路リン酸化。MEKおよびMAPKリン酸化(pMEK、pMAPK)を測定する免疫プロットおよびタンパク質レベル(MEK、MAPK)が、野生型マウス(wt)、SynGAP^{-/+}、およびPSD-95^{-/-}変異体において示される。PSD-95^{-/-}マウスにおけるMEKおよびMAPKのリン酸化形態は、SynGAP^{-/+}変異体における増加されたレベルに比較して、野生型レベルに等価であった。

【図16】

SynGAP変異体マウスにおける学習および記憶。

(図16a)

SynGAP^{-/+} (n=21) および野生型 (n=21) マウスにおける可視合図(1日当たり4試行)に対する訓練の3日間にわたる経路長(平均±標準偏差)。両群は十分に等しく行われた。

(図16b)

隠された台座に対する空間的な訓練の5日間にわたる経路長。SynGAP変

異体は野生型に比較して僅かに悪化した。

(図16c)

移動試験1および2に対する標的地帯における時間浪費、全ての4つの地帯における全時間浪費のパーセントとして示される。移動試験1において、SynGAP変異体は野生型に比較して僅かに悪化した、訓練後変異体は移動試験2において野生型とほとんど同じくらい正確に探索した。

(図16d)

移動試験1および2における個々のSynGAP-/+および野生型マウスの代表的な泳ぐ経路。破線の丸は、4つの地帯を示し、標的地帯は灰色で塗りつぶされる。台座の位置は平衡されるが、泳ぐ経路は標的地帯がプールのNE4分円において常に現れるような表示目的のために回転された。両方の移動試験において、野生型マウスは正確な位置に探索したのに対し、変異体は移動試験1に対して偶然に行ったが、移動試験2において野生型とほとんど同じ正確さで探索した。

(図16e)

PSD-95-/-変異体(n=12)および野生型(n=9)についての移動試験1および2における標的地帯中での時間浪費。野生型は両方の移動試験において十分に行ったが、PSD-/-変異体は全体を通じて偶然に行った。

(図16f)

PSD-95-/-変異体および野生型マウスの代表的な泳ぐ経路。変異体が、長期間の訓練後であっても標的位置において探索できない(移動試験2)ことに留意のこと。

(図16g)

移動試験データを解釈するための考えられ得るフレームワーク。野生型マウスは迅速に学習し、すぐに漸近線に達する。SynGAP変異体はゆっくりと学習するが、野生型によって到達されるのに等価な漸近線に徐々に接近し始める。PSD-95変異体は、対照的に、それらが受ける訓練の量にかかわらずほとんど学習しない。

【図17】

NMDAR、PSD-95、SynGAP、およびMAPKを連結する経路の

概要。

多タンパク質複合体（大きな点線円）の経路間の機能的な関係が記載される。NMDARは、それ自身2つの経路（四角で囲まれる）の上流であるPSD-95の上流である。SynGAPからMAPK経路は、LTPを増強することを伴い、およびMAPK依存性経路はLTPを抑制する。これらの経路の協調作用は、シナプス可塑性についての誘導閾値を、従ってさらに下流にあるAMPA受容体の調節のようなLTPの発現機構を制御し得る。

【図18】

脊髄におけるPSD-95およびNMDA受容体複合体の成分の発現。

図18(a~d)は、ヘテロ接合体PSD-95変異体マウスの腰部脊髄(L3~L6)における β -ガラクトシダーゼ発現を示している。動物(N=5)を0.1Mリン酸緩衝液中の4%パラホルムアルデヒドで灌流した。10 μ m切片を氷上でPBS/MgCl₂、次いで(0.1M PBS中の、0.041% MgCl₂、0.01%デオキシコール酸ナトリウム、0.02% Nonident-NP40)で洗浄した。切片を(1 μ g/mlの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシダーゼを含有する洗浄剤緩衝液中の0.042% フェロシアン化カリウム、0.033% フェリシアン化カリウム)中22で染色し、そして暗所にて37で4~6時間温置した。(a)、横切片、後角薄板IIにおけるポジティブ細胞の特異的な分布を示す。(b)(a)の挿入図、より高い倍率でのポジティブ細胞を示す(c)、後角を通る縦方向切片、背表面に対して平行に切断、 β -ガラクトシダーゼポジティブ細胞を示す。(d)縦方向切片、後角において染色するが、後根入口の部位では染色しないことを示す(矢印)。スケールバー=10 μ m。(e)は野生型マウスからのL3~L6脊髄の親和性免疫沈降におけるNMDA受容体複合体タンパク質の存在についての免疫プロットを示す。脊髄および前脳に対する直接的な免疫プロットが比較のために示される。

【図19a】

(坐骨神経に対する慢性狭窄損傷(CCI)を受けた野生型およびPSD-95変異体マウスの挙動分析)

野生型マウス（白丸）において、野生型マウスについての坐骨神経に対して行われたCCIに対して同側の障害性熱刺激からの足撤退は、同側における術後に比較した術前値間で（ $t p < 0.05$; Kruskal-Wallis 一方向ANOVA）、および術後の、対側値（ $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.001$ 、Studentのt検定による）から有意な差異を示した。データは、対側に対する同側の足撤退潜在性（PWL）の比率として示される。熱痛覚過敏を反映する対応する差異は、全ての変異体マウス（黒四角）または野生型マウスの対側において全く見られなかった。

【図19b】

（坐骨神経に対する慢性狭窄損傷（CCI）を受けた野生型およびPSD-95変異体マウスの挙動分析）

野生型マウスについての機械的刺激に対する足撤退（白丸）は、CCIに対して同側において、術前と術後の間（ $t p < 0.01$; ランクにおけるDunn法ANOVA）、および術後の同側値と対側値との間（ $** p < 0.001$ 、Mann-Whitney Rank Sum検定）で有意な差異を示した。データは、対側に対する同側の足撤退閾値（PWT）の比率としてプロットされる。有意な差異は、PSD-95変異体（黒四角）において（または野生型の対側において）試験のいずれの日においても見られず、機械的異痛の発症のないことを示す。

【図19c】

（坐骨神経に対する慢性狭窄損傷（CCI）を受けた野生型およびPSD-95変異体マウスの挙動分析）

冷却（4）刺激にตอบสนองするSuspended Paw Elevation Time (SPE T) が、野生型マウス（白丸）およびPSD-95変異体マウス（黒四角）において同側について示される。SPE Tスコアは、野生型および変異体マウスの両方について対側に対して常にゼロを分析された。有意な差異が、術前値と術後値との間（ $t p < 0.01$; ランクにおけるDunn法ANOVA）、および同側応答と対側応答との間（ $** p < 0.01$ 、Mann-Whitney Rank Sum検定）で示された。8匹の野生型マウスおよび9匹のPSD-95変異体マウスが、各場合において試験された。平均 \pm SEM値が示される。

【図20a】

(未処置マウスにおけるNMDA髄腔内注射の効果、および、CCIマウスにおけるNMDA受容体アンタゴニスト(R)-CPPの効果)

図20aにおいて、足撤退潜在性(PWL)が、未処置の野生型マウス(白菱形; n = 6)およびPSD-95変異体マウス(黒菱形; n = 7)へのNMDAの同側投与(10 µl中の0.25 nmol、矢印)の前および後で、障害性熱刺激に应答して測定された。統計学的有意性(*P 0.01)が、PWL生データに対するStudentのt検定によって決定された。図20aのデータは、平均±SEMとしてプロットされた注入前ベースライン应答の平均のパーセントである。

【図20b】

(未処置マウスにおけるNMDA髄腔内注射の効果、および、CCIマウスにおけるNMDA受容体アンタゴニスト(R)-CPPの効果)

図20bにおいて、足撤退潜在性(PWT)が、野生型マウス(白菱形)およびPSD-95変異体マウス(黒菱形)へのNMDA(矢印)の同側投与の前および後で、機械的熱刺激に应答して測定された。統計学的有意性が、Mann-Whitney Rank Sum検定によって決定された(*P 0.01)。図20bのデータは、平均±SEMとしてプロットされた注入前ベースライン应答の平均のパーセントである。

【図20c】

(未処置マウスにおけるNMDA髄腔内注射の効果、および、CCIマウスにおけるNMDA受容体アンタゴニスト(R)-CPPの効果)

図20cにおいて、熱痛覚過敏のピーク(CCIに対して同側、以前12日間に誘導された)での野生型マウスは、感作の逆転を評価するために(R)-CPP(矢印)を10 µl中の100 pmolの用量でくも膜下腔内に注入された(白丸; n = 6)。(R)-CPPは、同様に調製されたPSD-95変異体(黒四角; n = 7)に対して投与された場合、何の効果も有しなかった。データは、同側:対側足撤退潜在性(PWL)の平均(±SEM)比率としてプロットされ、および切片間のPWLにおいて統計学的に有意な差異が、*として示される(

PWL生データに対するStudentのt検定により $P = 0.01$)。

【図20d】

(未処置マウスにおけるNMDA髄腔内注射の効果、および、CCIマウスにおけるNMDA受容体アンタゴニスト(R)-CPPの効果)

図20dにおいて、PSD-95マウス変異体(黒四角)に比較される野生型マウス(白丸)においてCCIに対して同側に発症する機械的無痛に対する(R)-CPPの効果が示される。データは同側:対側足撤退閾値(PWT)の平均(\pm SEM)比率としてプロットされ、および切片間のPWTにおける統計学的に有意な差異が、*として示される(Mann-Whitney U検定により $P = 0.01$)。いずれの場合においても、術前値に比較される対側応答に対する(R)-CPPの任意の有意な効果はなかった。(R)-CPPは、未処理または偽手術された野生型またはPSD-95変異体マウスに対して投与された場合、なんの効果も有しなかった(データ示されず)。

【図21】

CCI手術後の野生型マウスおよびPSD-95変異体マウスからのNR1免疫沈降におけるホスホ-Ser897-NR1およびpan-NR1についての免疫プロット。

予め12日間誘導された坐骨CCI後の半切片化された脊髄のウェスタンプロット解析。2匹の野生型または2匹のPSD-95変異体マウスのいずれかからの、損傷に対して同側または対側のマウス脊髄組織からのプロットは、pan-NR1またはホスホ-Ser⁸⁹⁷-NR1についての抗体でプローブされた。

レーンA、野生型における損傷に対して同側、レーンB、野生型における損傷に対して対側。レーンC、PSD-95変異体における損傷に対して同側、およびレーンD、PSD-95変異体における損傷に対して対側。

【図22】

CCI後の野生型マウスにおける灌流神経障害性疼痛挙動に対する選択的なCaMKキナーゼIIインヒビターの効果。

CCI後の神経感作のピークで、マウスは、ミリストイル-オートカミド2関連性阻害ペプチド($10 \mu\text{l}$ 中の 1 nmol)、K-93($10 \mu\text{l}$ 中の 120

pmol) またはほとんど活性でないコントロールアナログ、KN-92 (10 μ l 中の120 pmol) をくも膜下腔内に注入された。各場合においてn値は7~9であった。熱痛覚過敏および機械的無痛試験の両方についてのデータを、注入後の2つの時間ウインドウ (10~30分間、および60~80分間) 応答における同側：対側差異の逆転の平均パーセントとしてプロットした。各場合において、薬剤は同側に見られた感作の減少を引き起こし、注入前レベルに比較していずれの対側応答においても有意な変化はなかった。各場合において、10~30分間にて見られた同側感作の減少 (すなわち、同側：対側差異の減少) は、60~80分間までに部分的な回復を示した。注入前および注入後応答値を比較するWilcoxon検定によって $p < 0.05$ 。

【図23】

野生型およびPSD-95変異体マウスの腰部脊髄におけるCaMキナーゼIIの構成的な活性に対するNMDA/グリシンおよびCCIの効果。

CaMキナーゼII免疫沈降およびキナーゼ活性試験に先立ち、組織の迅速な除去および均一化の前にL3~L6脊髄の背側表面に薬剤を15分間、局所的に適用した。未処理のPSD-95変異体マウスの脊髄からの免疫沈降における平均最大CaMキナーゼII活性は、野生型マウスにおける活性と変化されなかった (それぞれ、 108.3 ± 13.7 および 97.8 ± 13.1 pmol ^{33}P / 分 / μ g の元来の抽出物タンパク質)。データは、最大CaMキナーゼII活性のパーセントとして表され、平均 \pm SEM、n=4である。(b)における対応する対側値に比較して、統計学的有意差が*として示される、Mann-Whitney U検定によって $p < 0.05$ 。

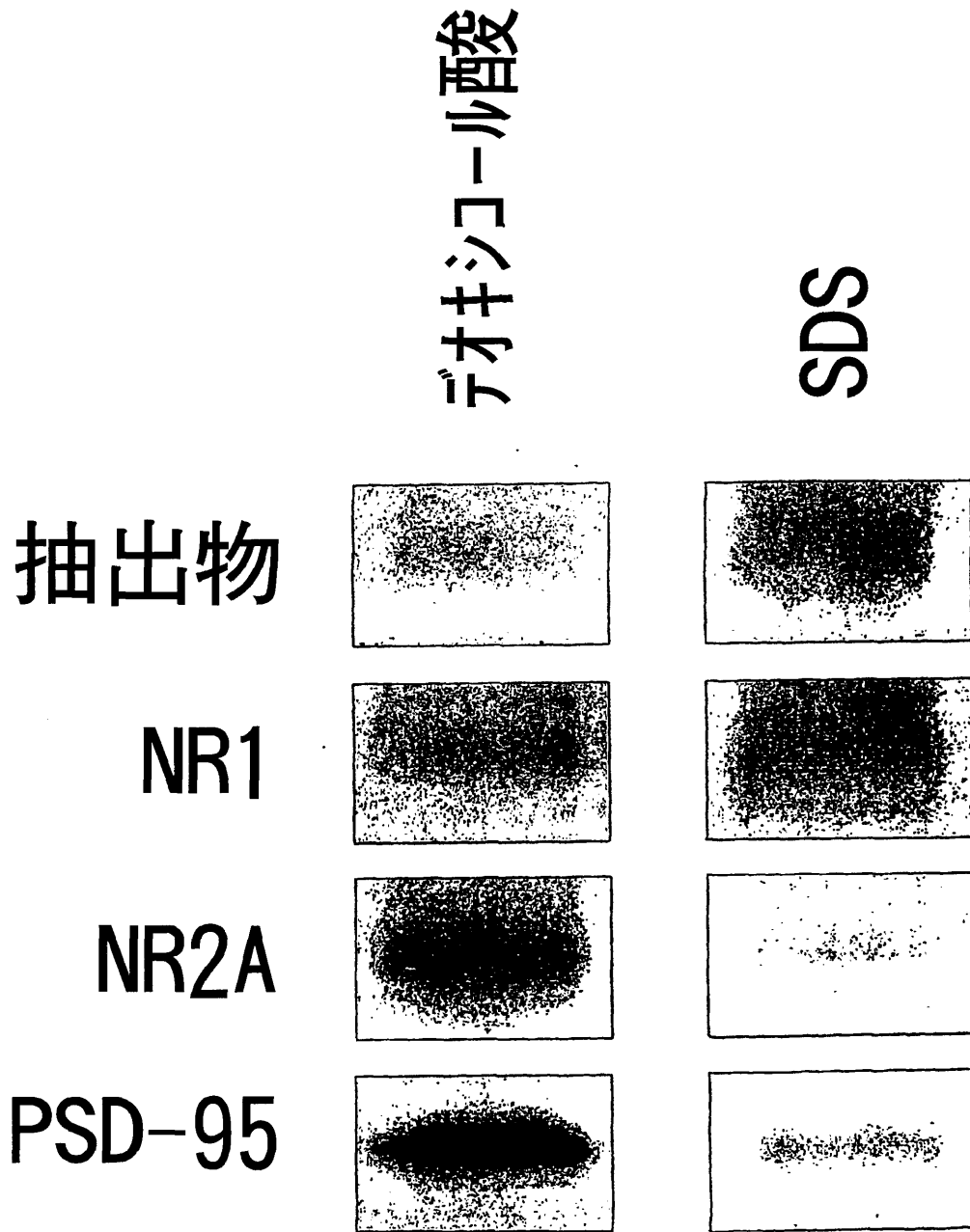
【図24】

野生型マウスおよびPSD-95変異体マウスの両側頸動脈閉塞後の尾状核における虚血性神経障害 (%) を示す図である。

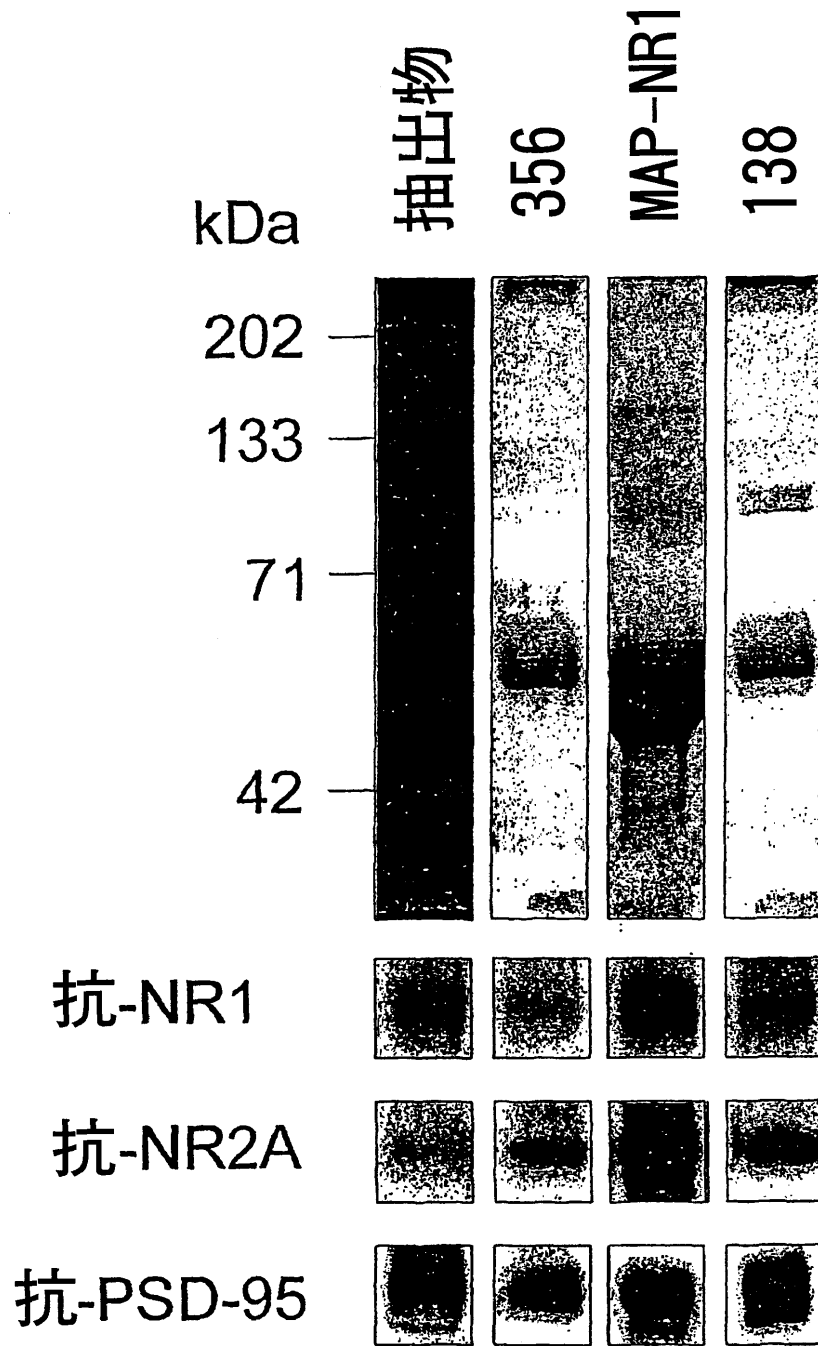
【図25】

野生型マウスおよびPSD-95変異体マウスの両側頸動脈閉塞後の海馬のCA1錘体細胞層における虚血性神経障害 (%) を示す図である。

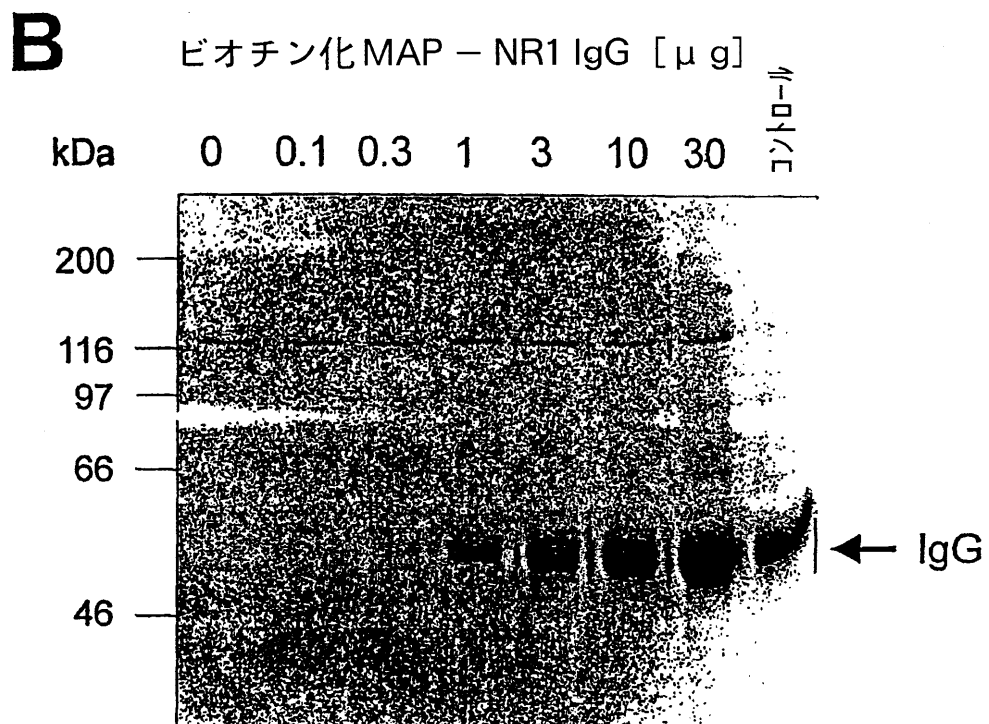
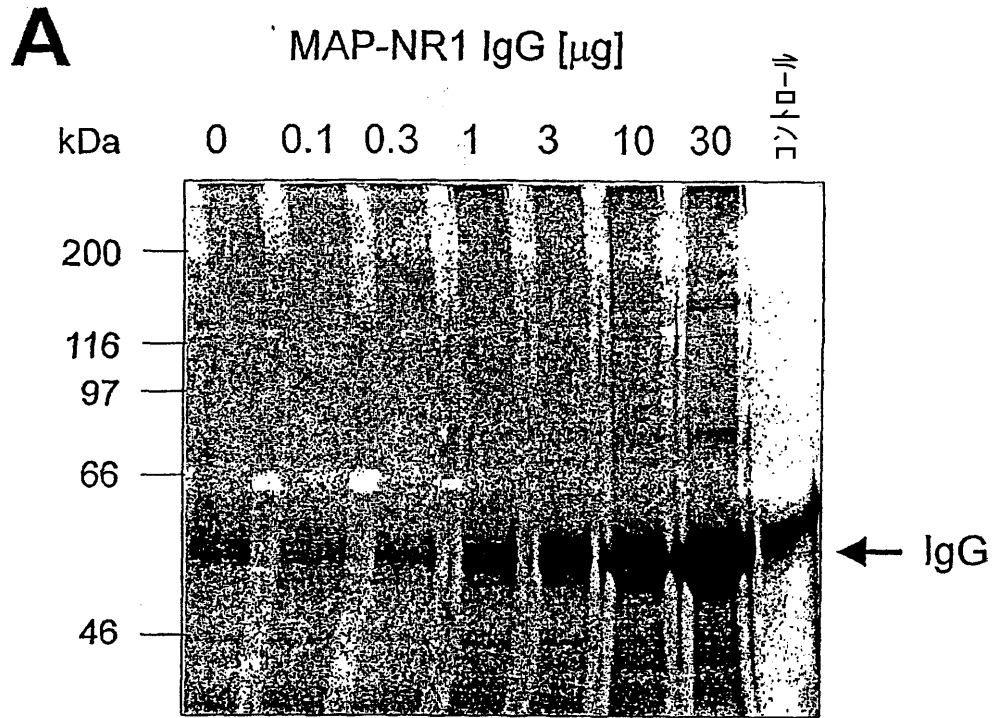
【図1】



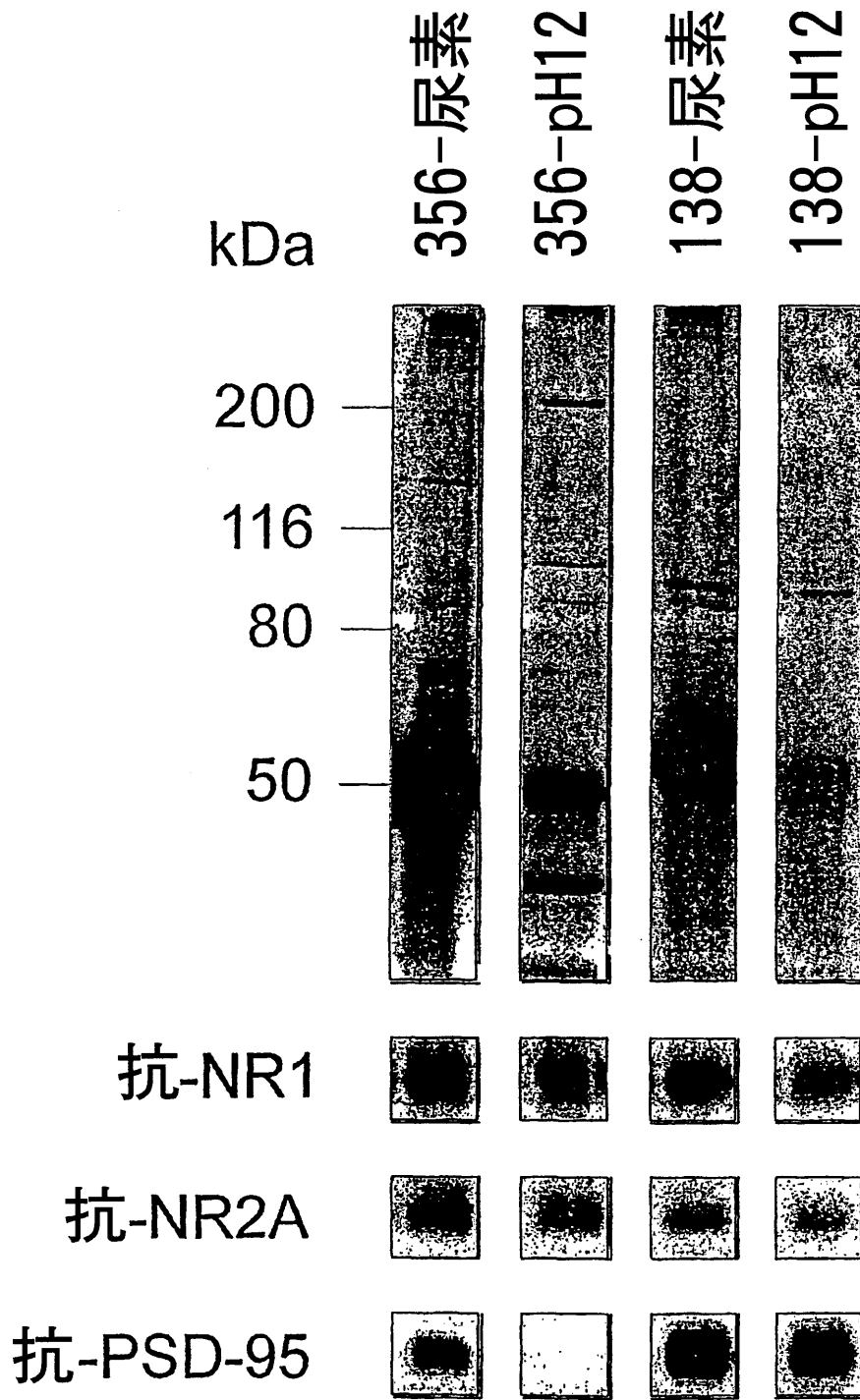
【图 2】



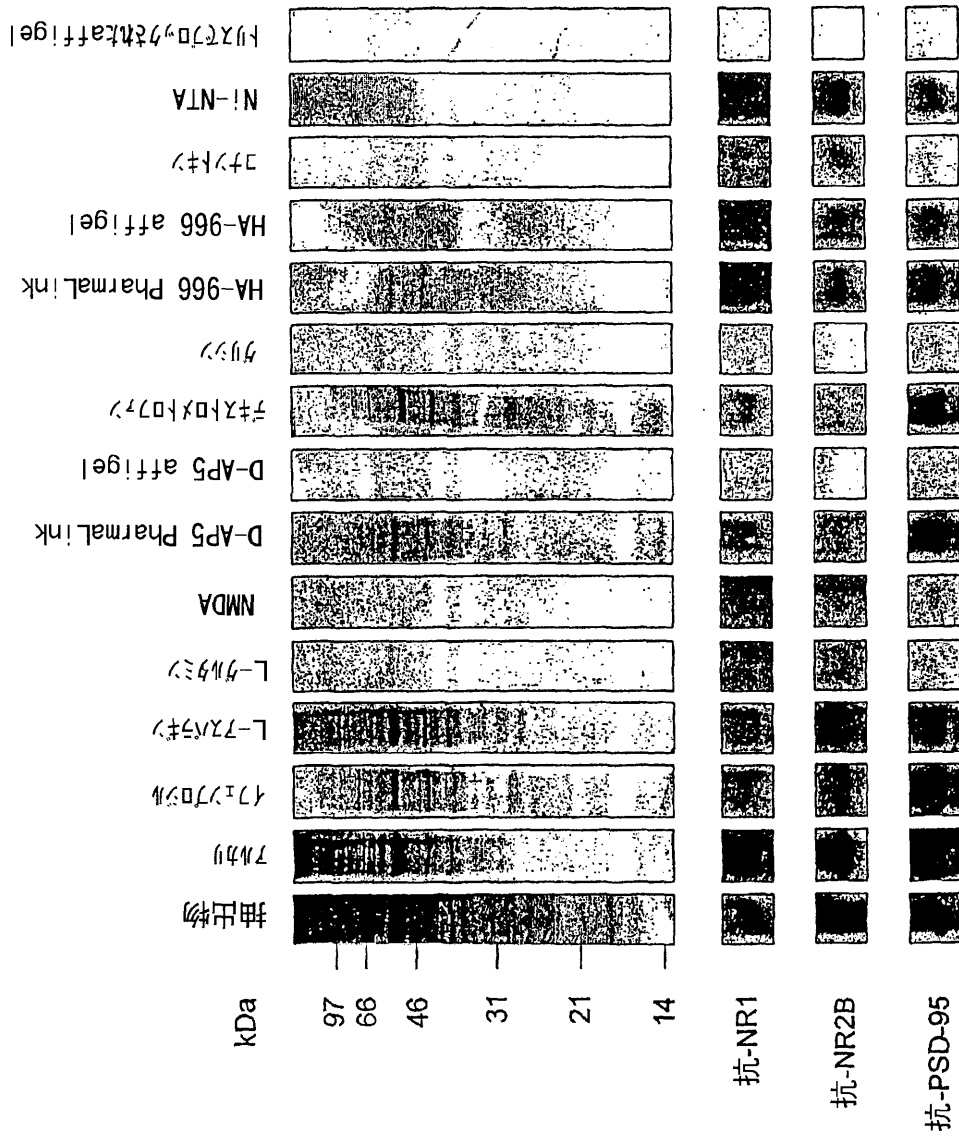
【図3】



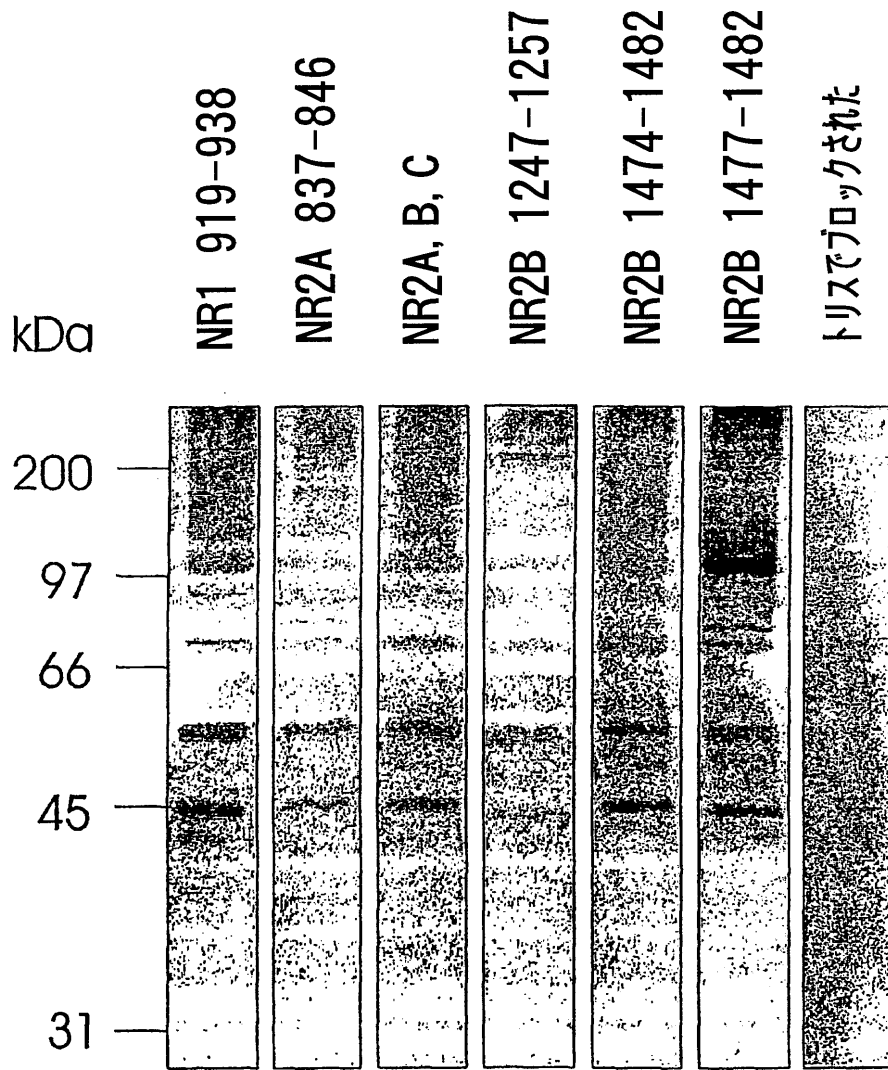
【图4】



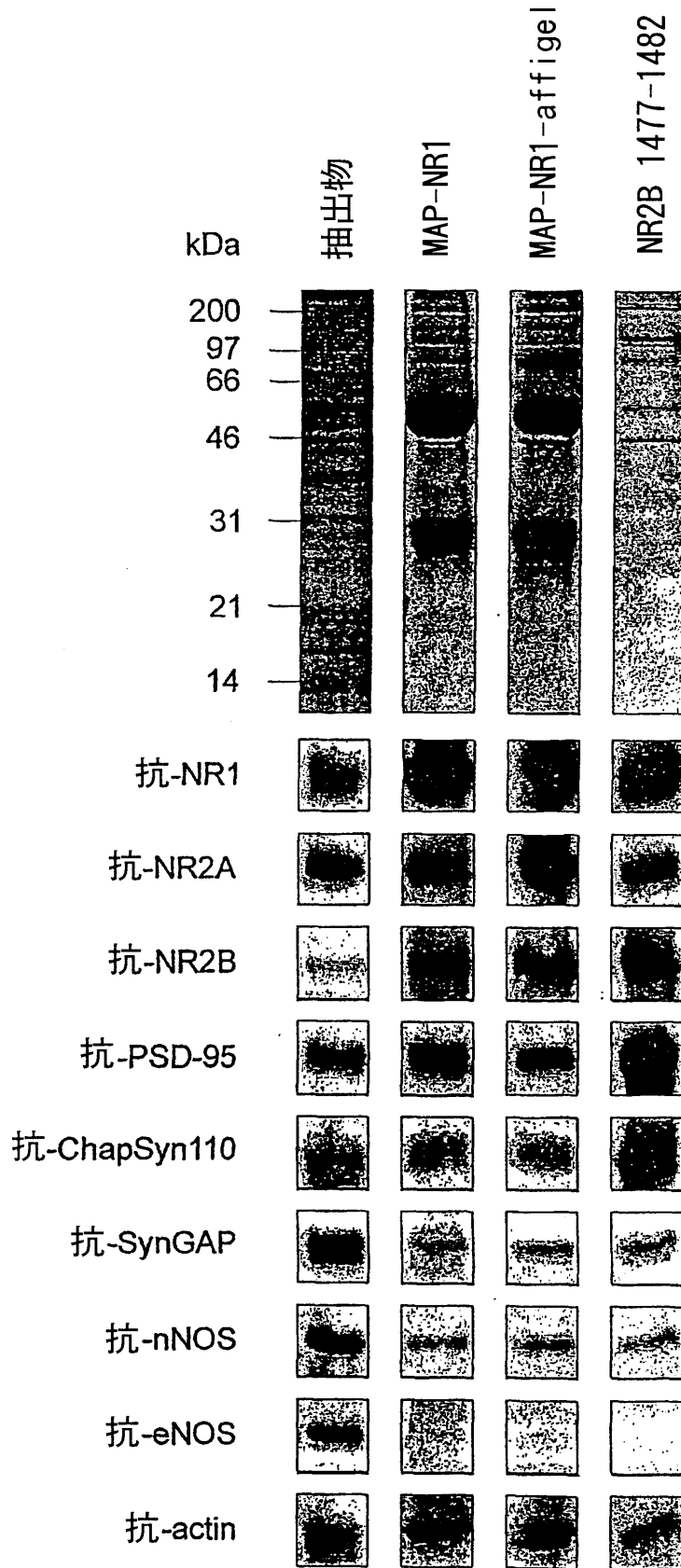
【図5】



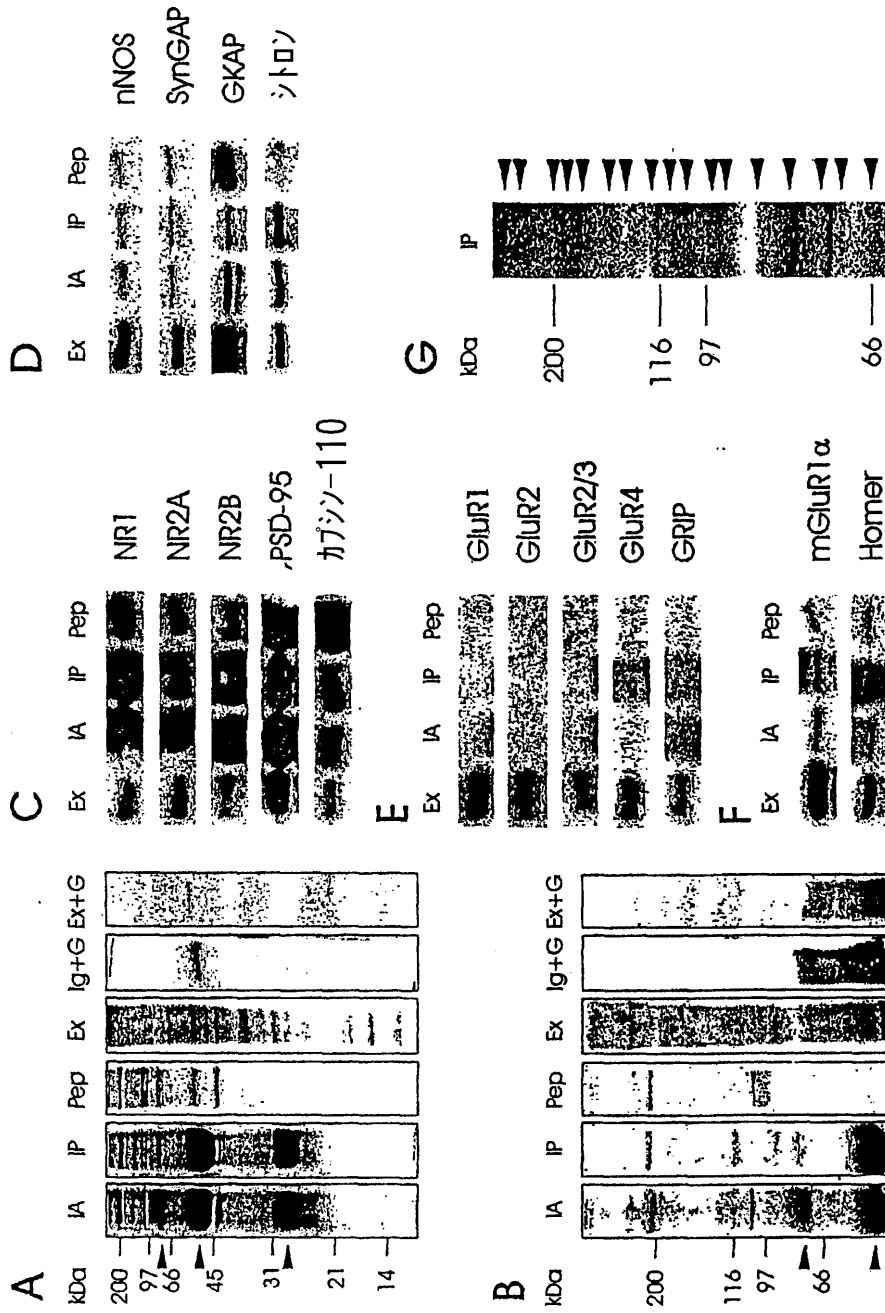
【図6】



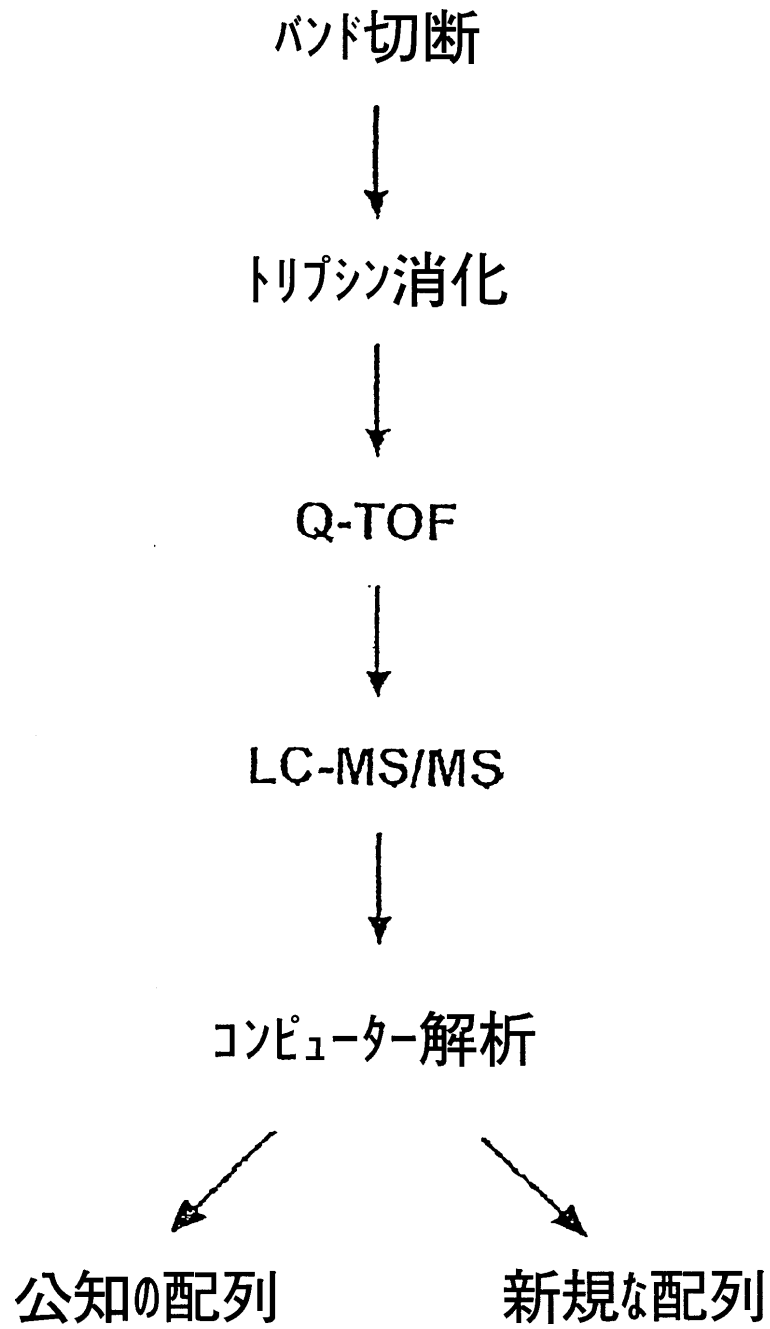
【图7】



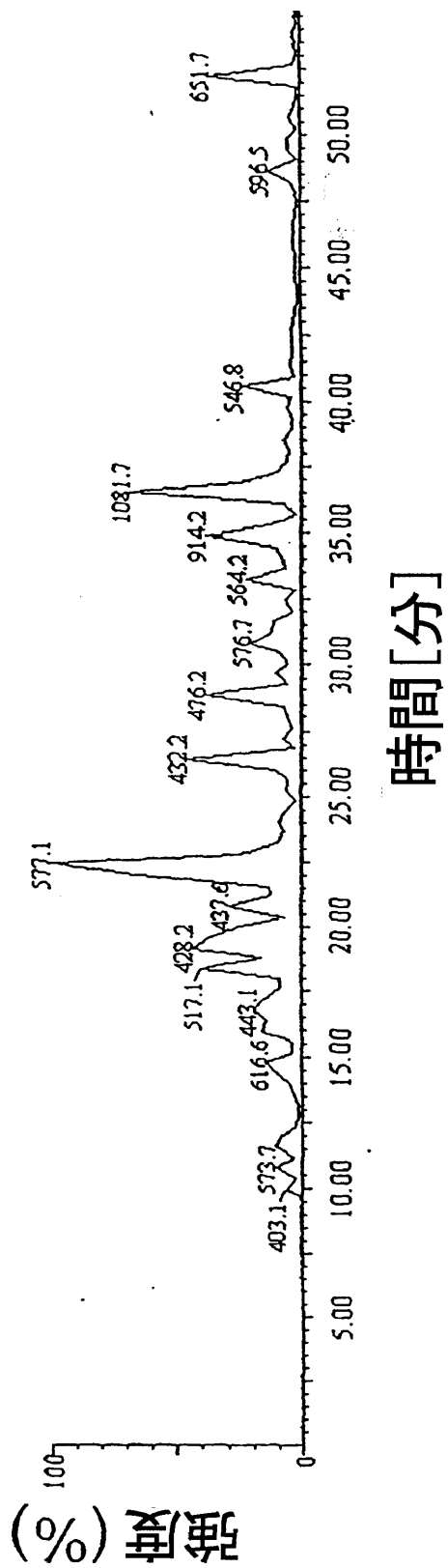
【図8】



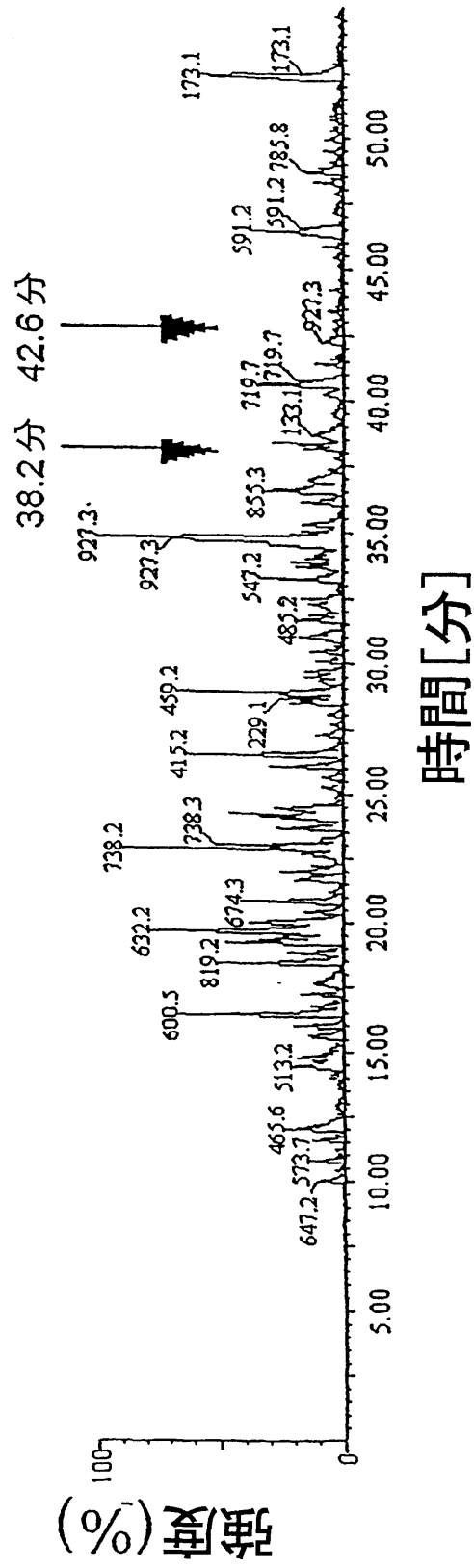
【図9A】



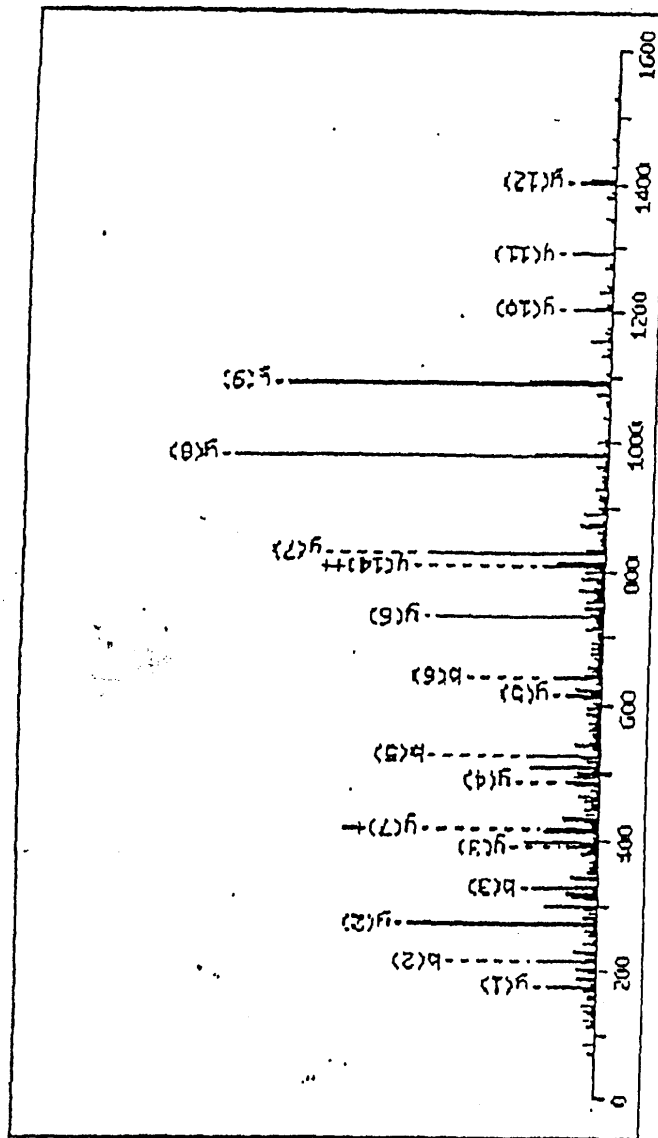
【図9B】



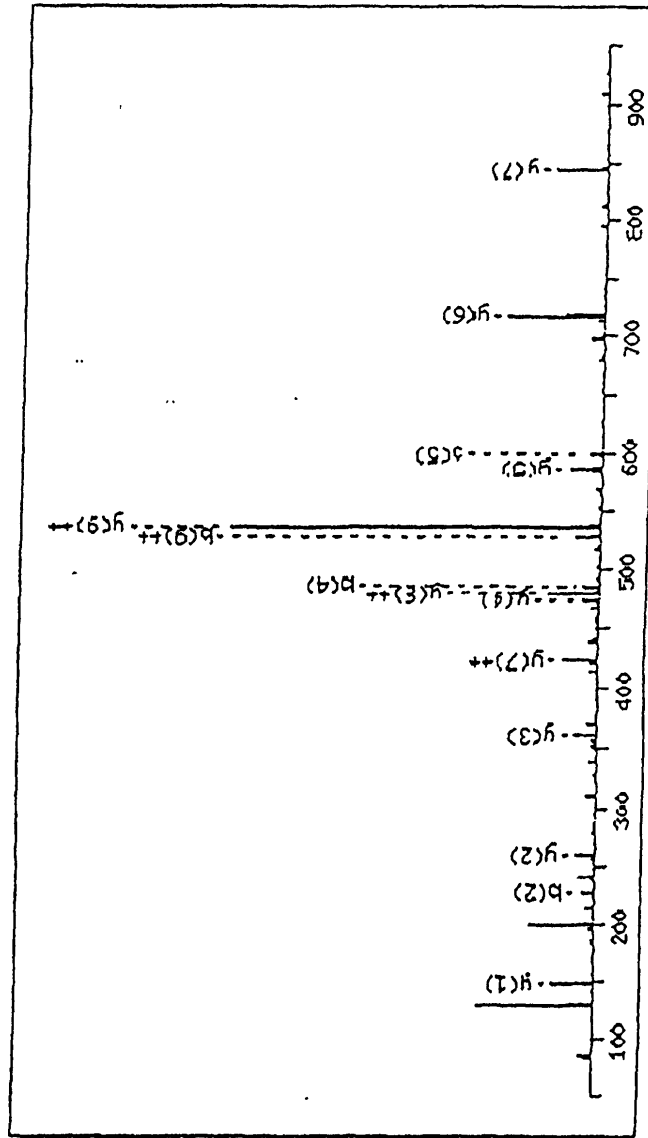
【図9C】



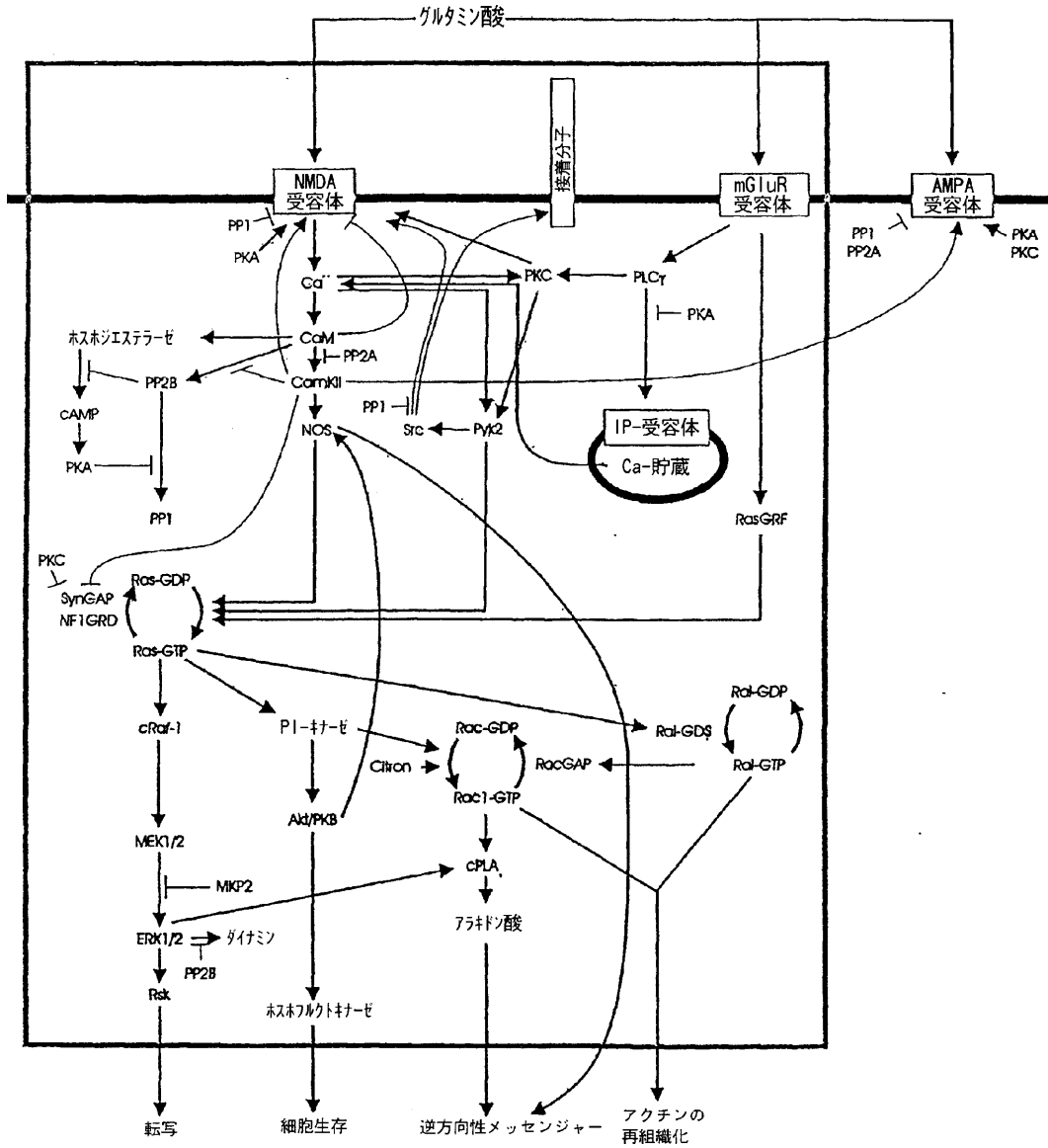
【図9D】



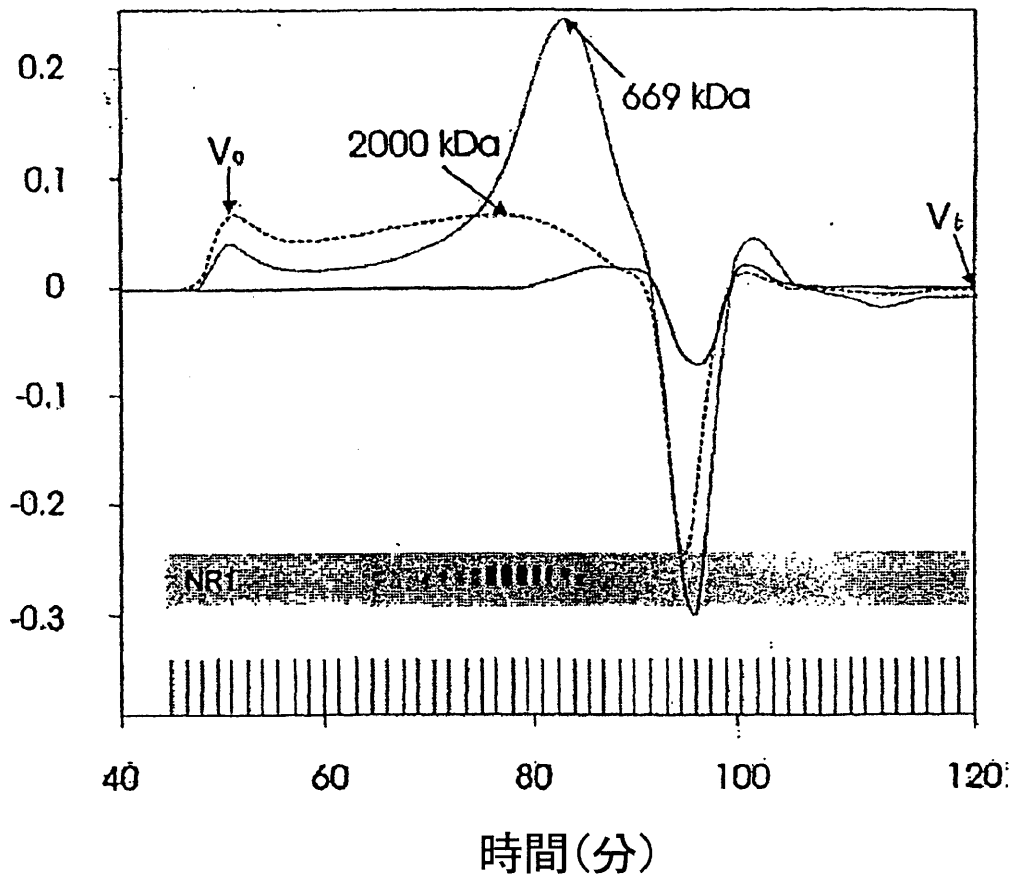
【図9E】



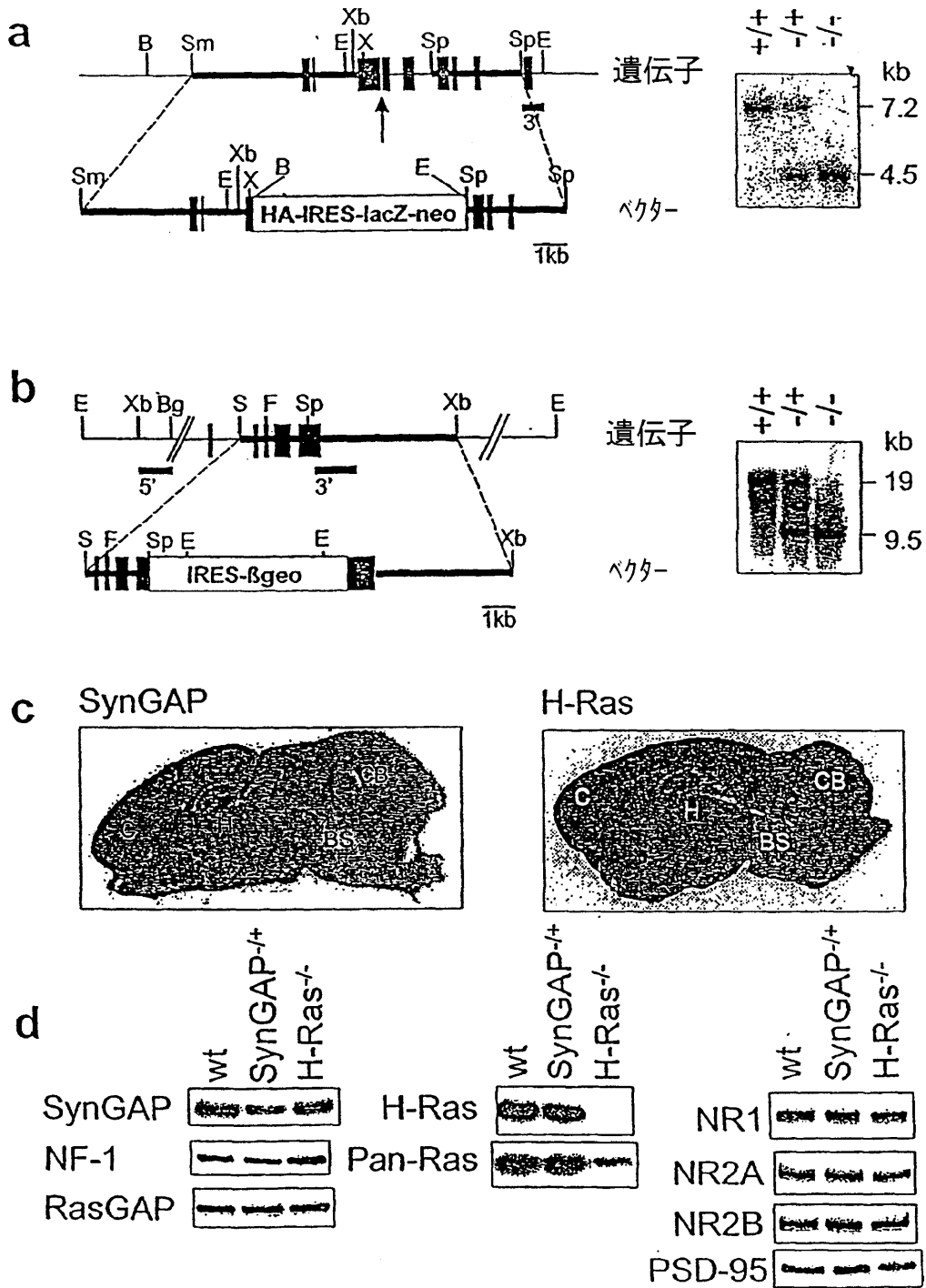
【図10】



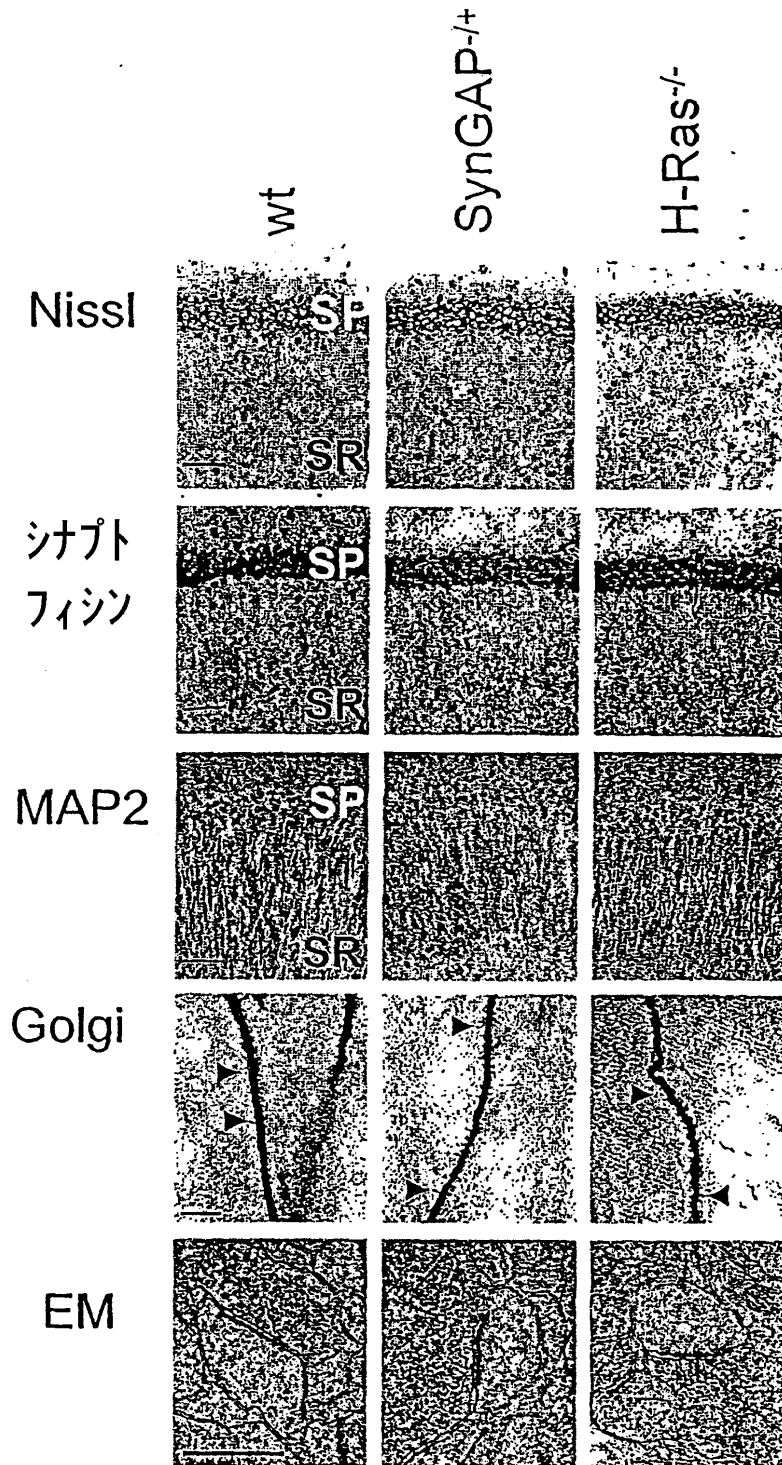
【図11】



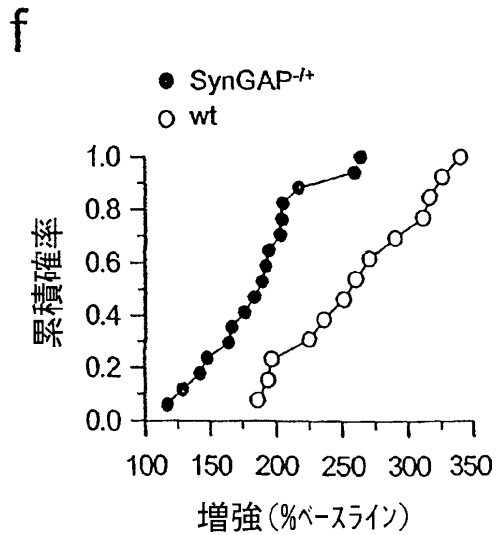
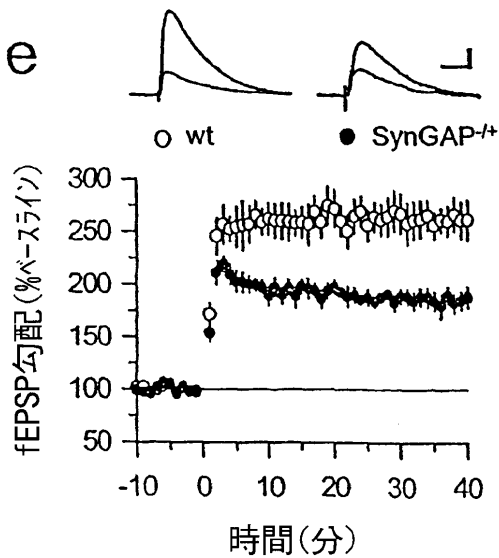
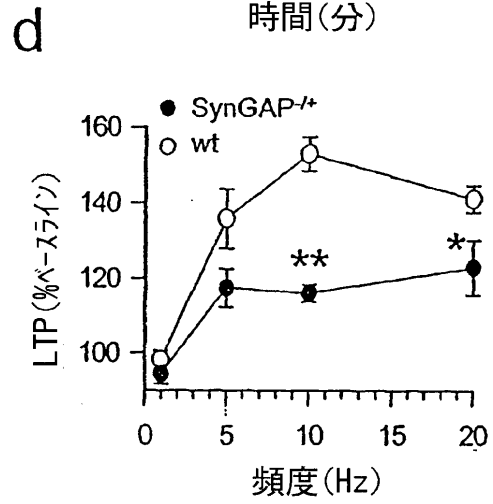
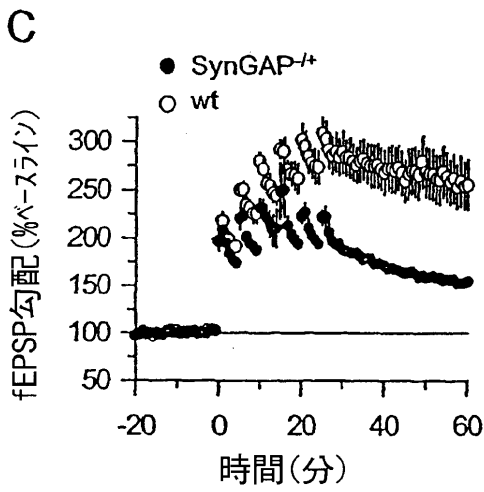
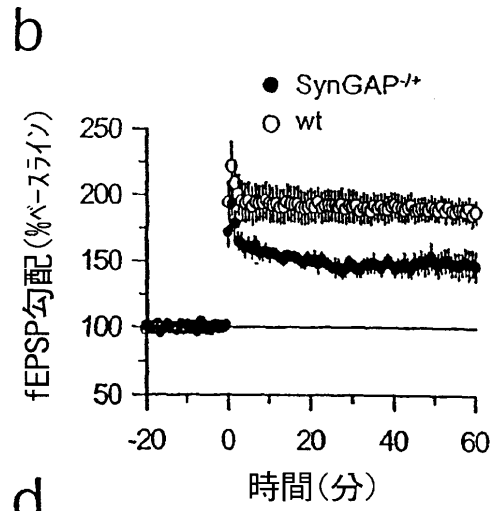
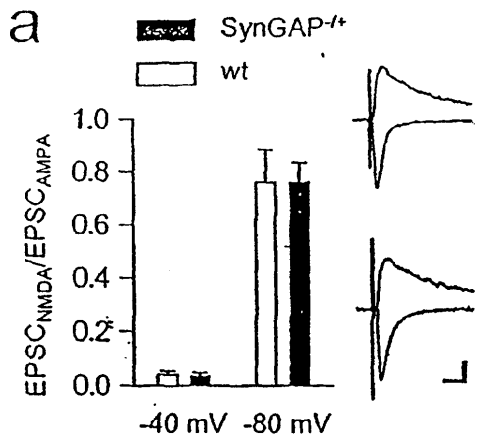
【図12】



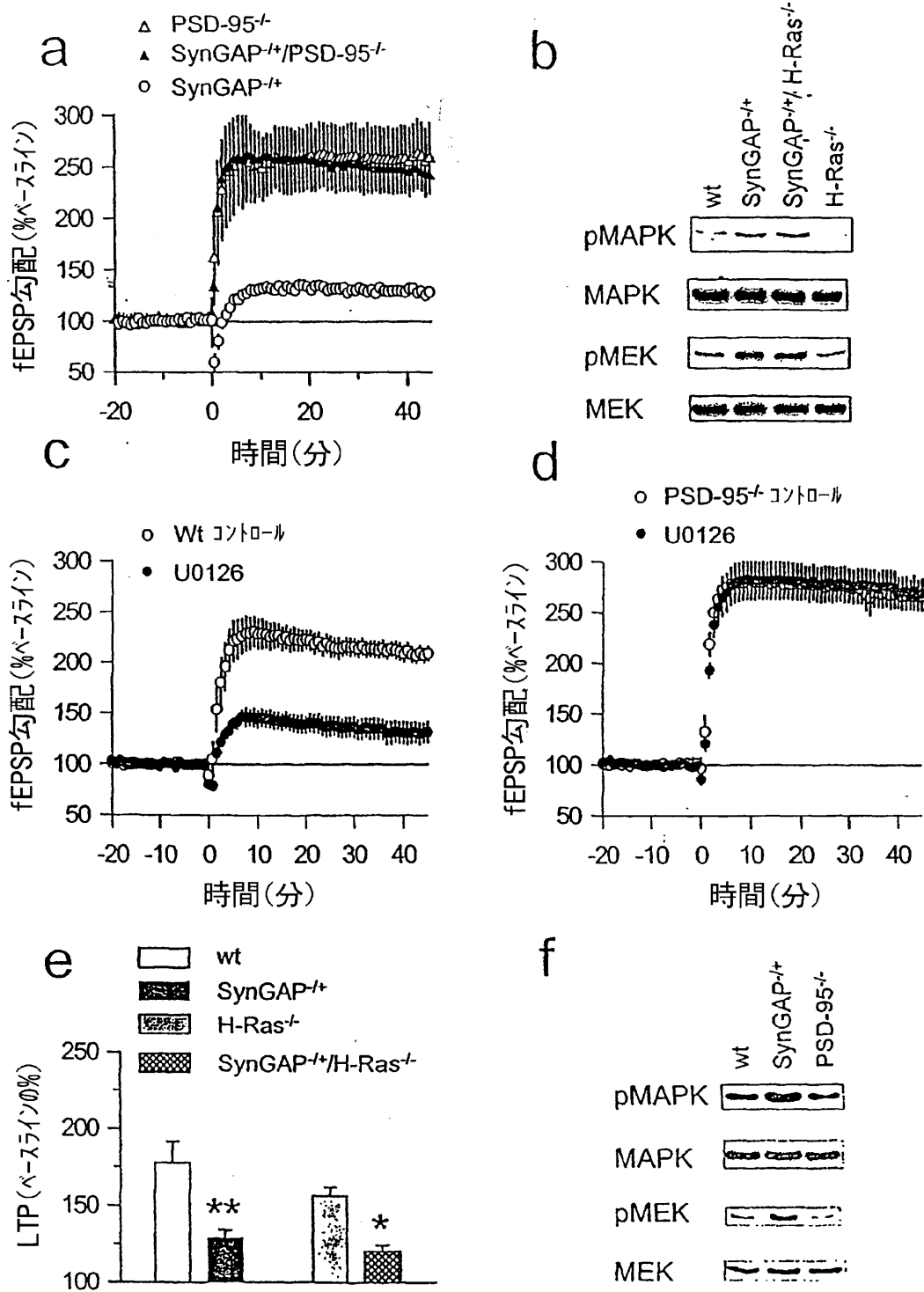
【図13】



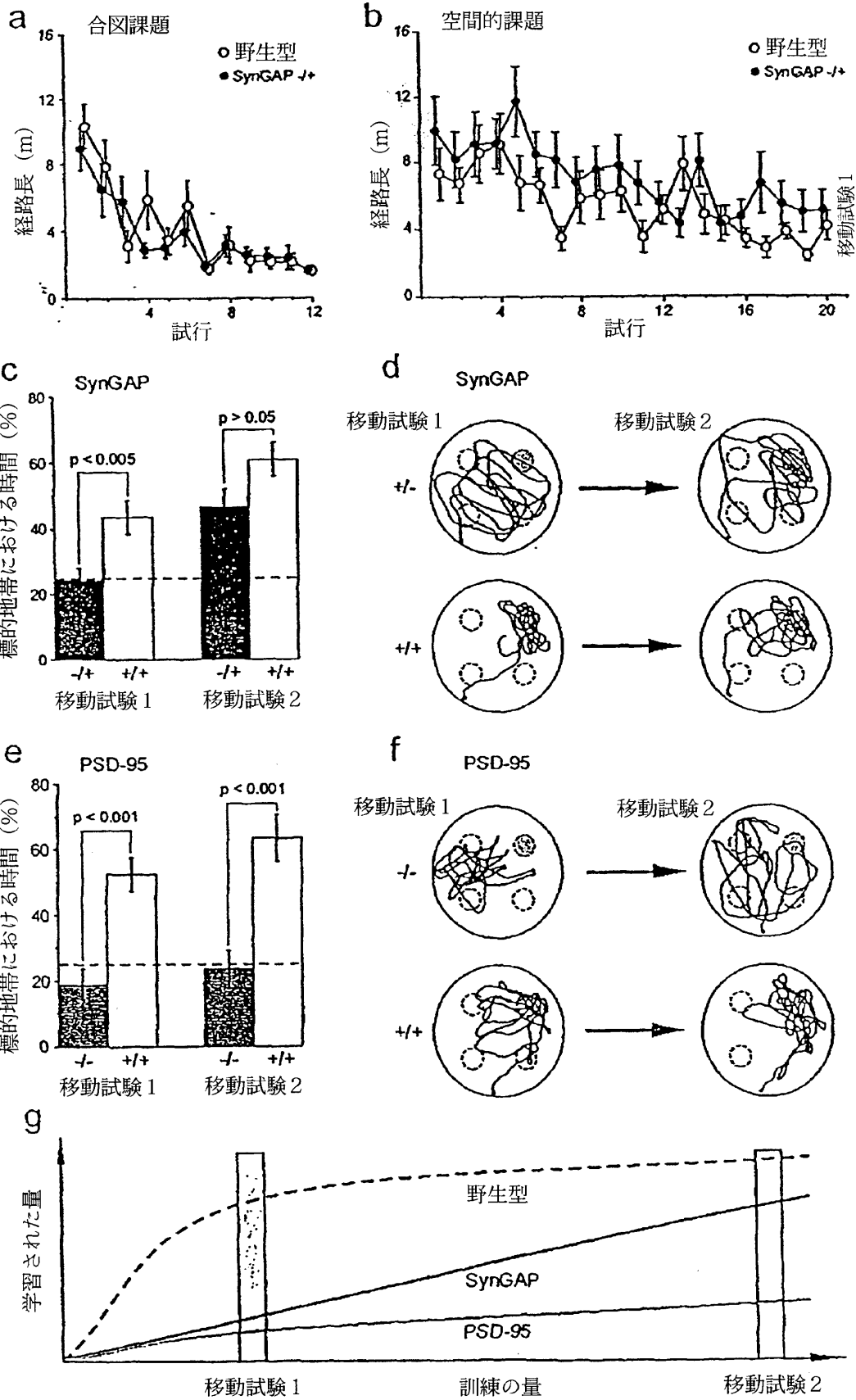
【図14】



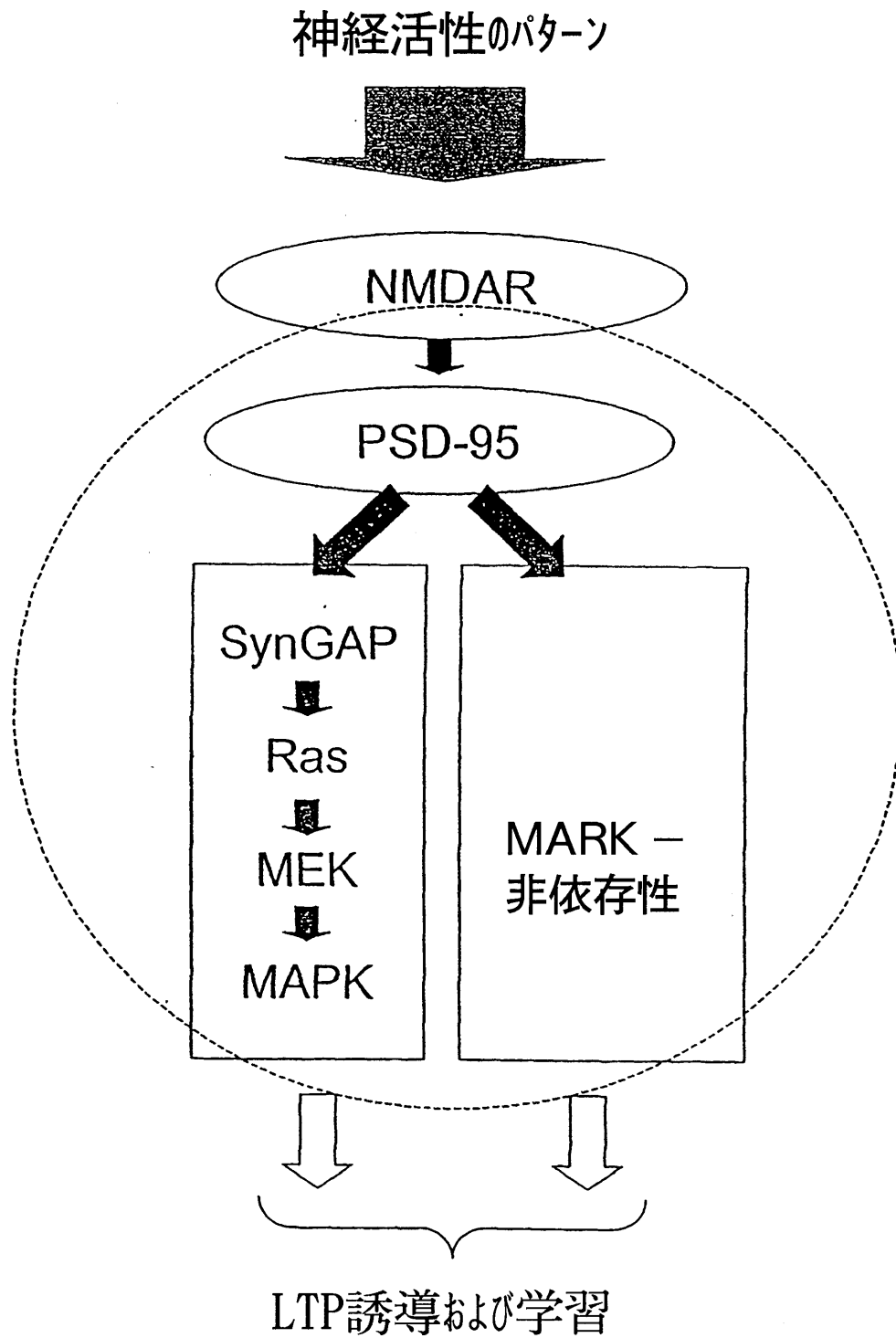
【図15】



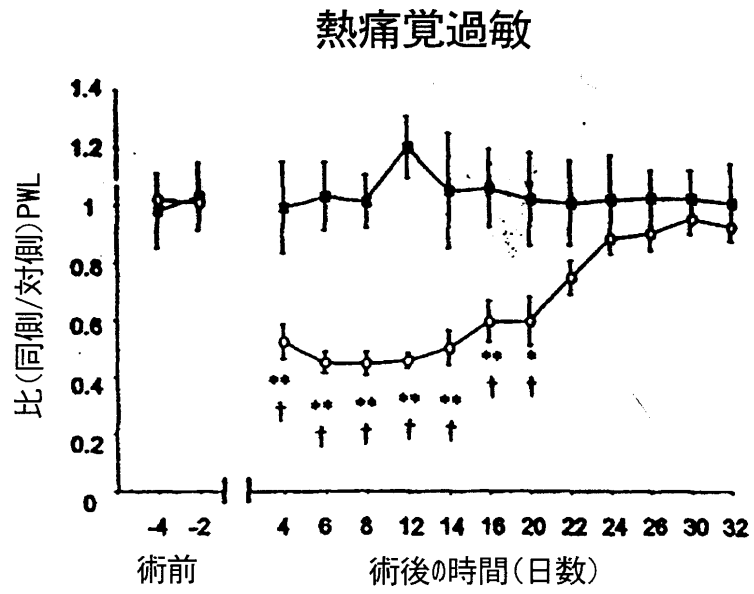
【図16】



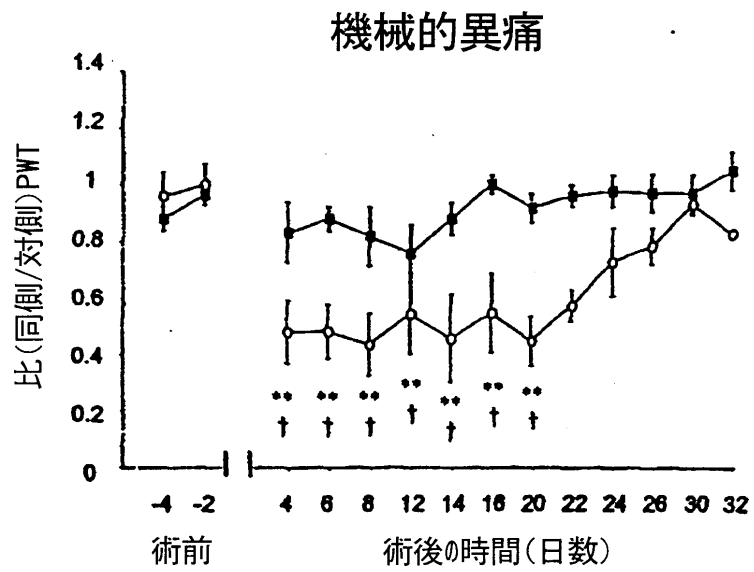
【図17】



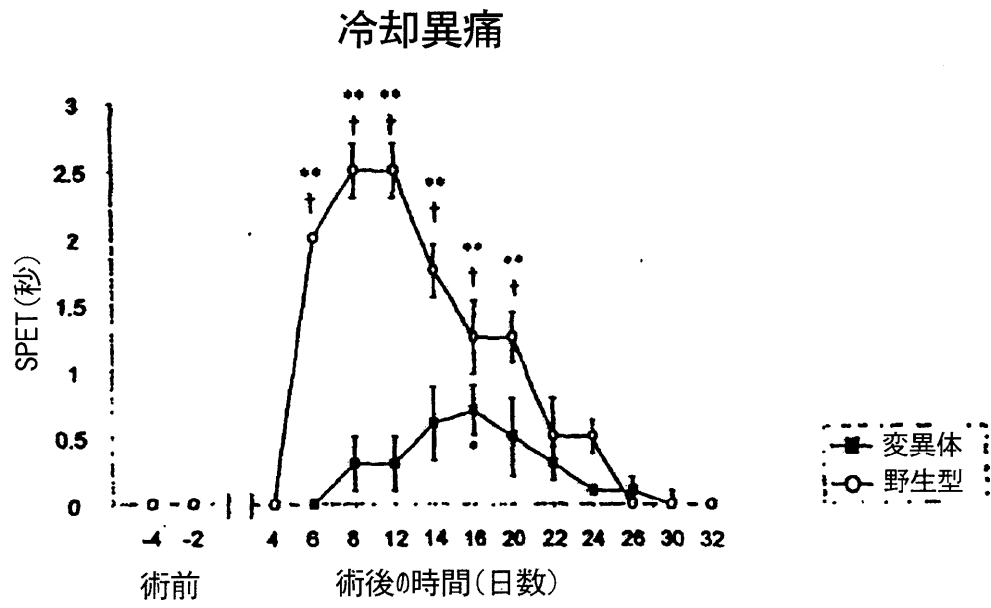
【図19a】



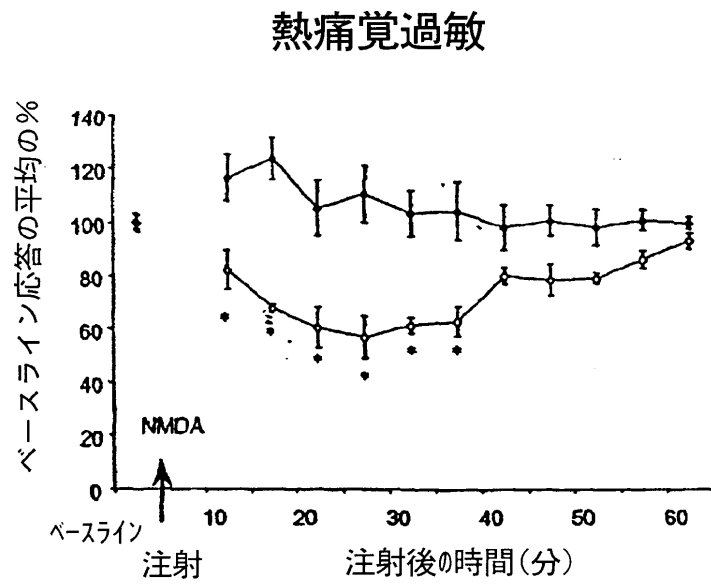
【図19b】



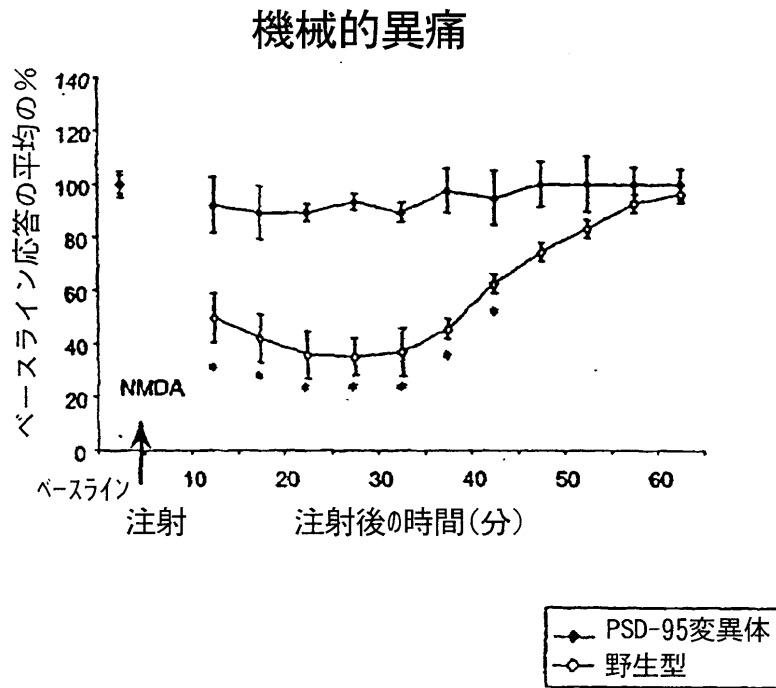
【図19c】



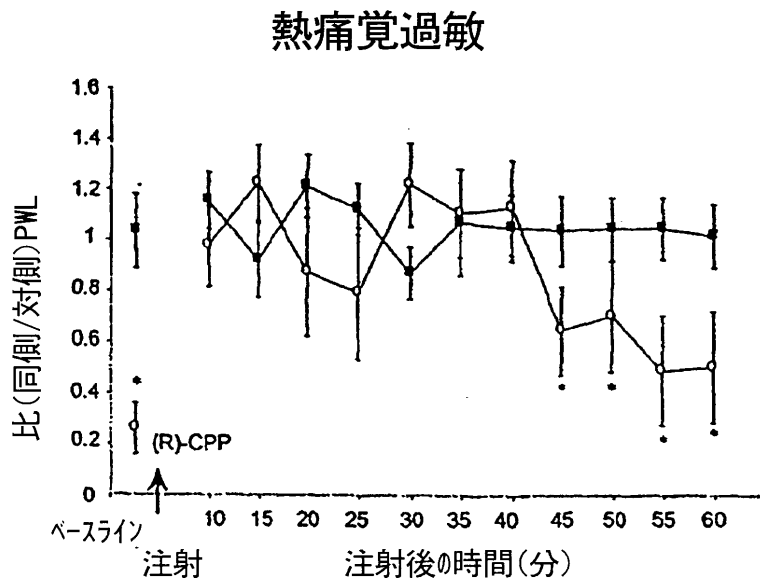
【図20a】



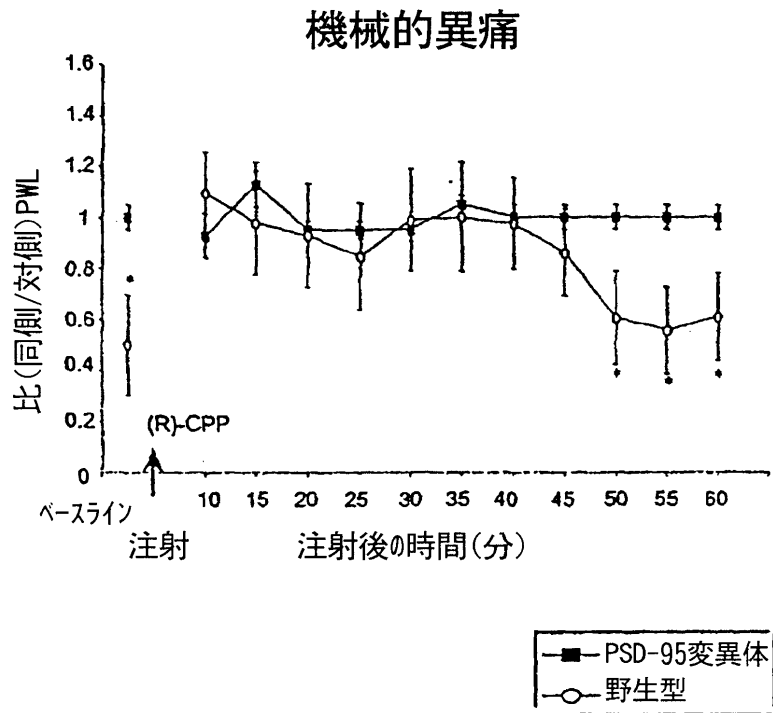
【図20b】



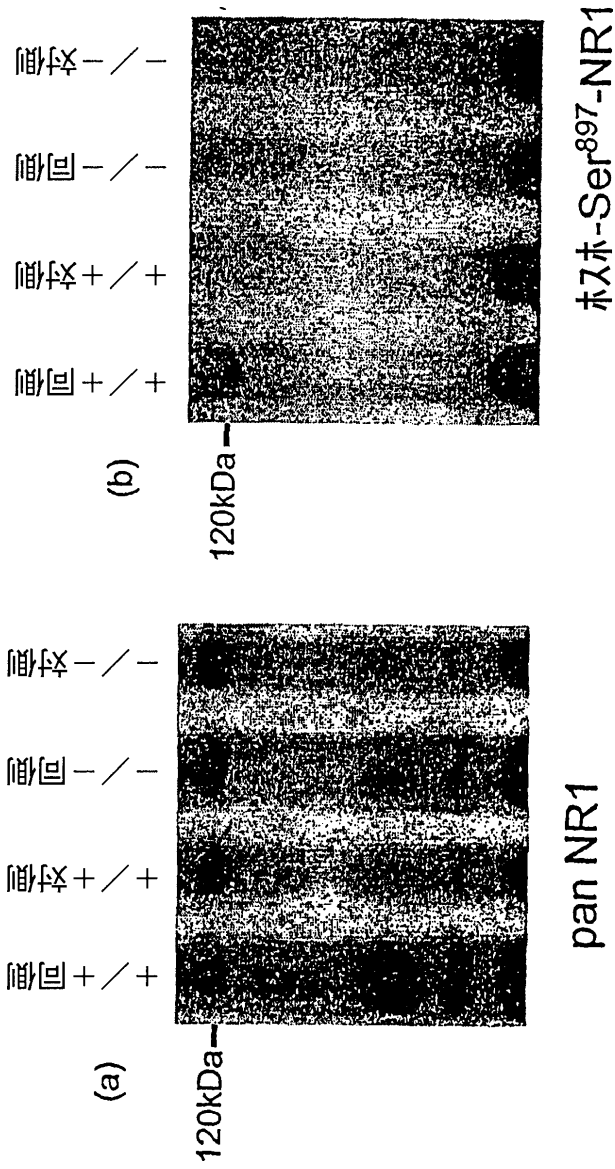
【図20c】



【図20d】



【图21】



【図22】

CCI誘導性の同側の残存平均%： 応答性における対側差異		熱痛覚過敏		機械的異痛	
		注入後 10～30分間	注入後 60～80分間	注入後 10～30分間	注入後 60～80分間
脊髄後角に 対して同側に 適用					
ミラストイル- オトカミド 2-関連性 阻害剤		21.2 ± 2.3 *	37.6 ± 5.7 *	37.3 ± 5.9	94.1 ± 4.5
KN-93		18.2 ± 3.6 *	58.4 ± 4.9	3.3 ± 1.4 *	72.8 ± 6.4 *
KN-92		46.8 ± 5.3 *	77.6 ± 6.7	69.2 ± 5.4 *	89.8 ± 7.1

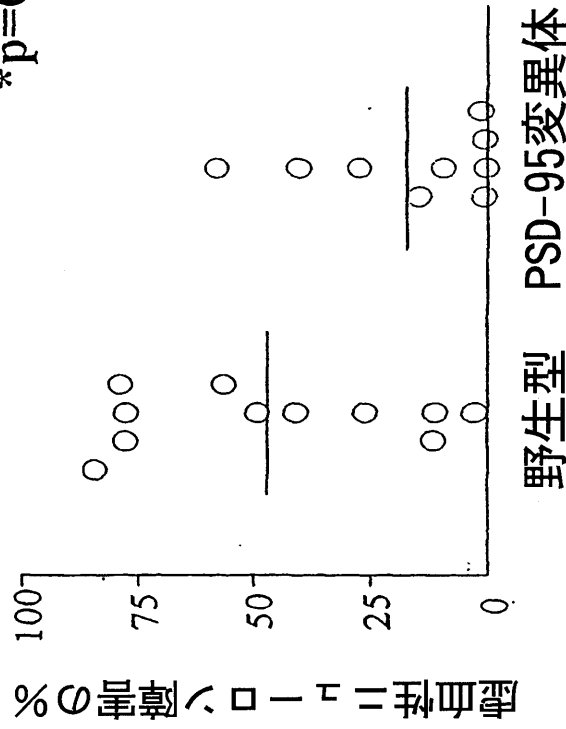
【図23】

構成的なCaMキナーゼII活性 (最大活性の%)				
(a) 脊髄後角 に対する適用	野生型	PSD-95変異体		
	生理食塩水	25.4 ± 3.9	21.1 ± 3.0	
	NMDA/グリシン	36.2 ± 3.7 *	32.4 ± 4.1 *	
	イノマイシン	33.5 ± 2.1 *	30.0 ± 2.8 *	
(b)	野生型	PSD-95変異体		
	CCI同側	CCI対側	CCI対側	
	生理食塩水	35.0 ± 2.8 *	16.3 ± 2.3	16.9 ± 1.8
	(R)-CPP	12.9 ± 1.6	18.1 ± 3.6	-

【図24】

尾状核における、低減されたニューロン障害

*p=0.0227

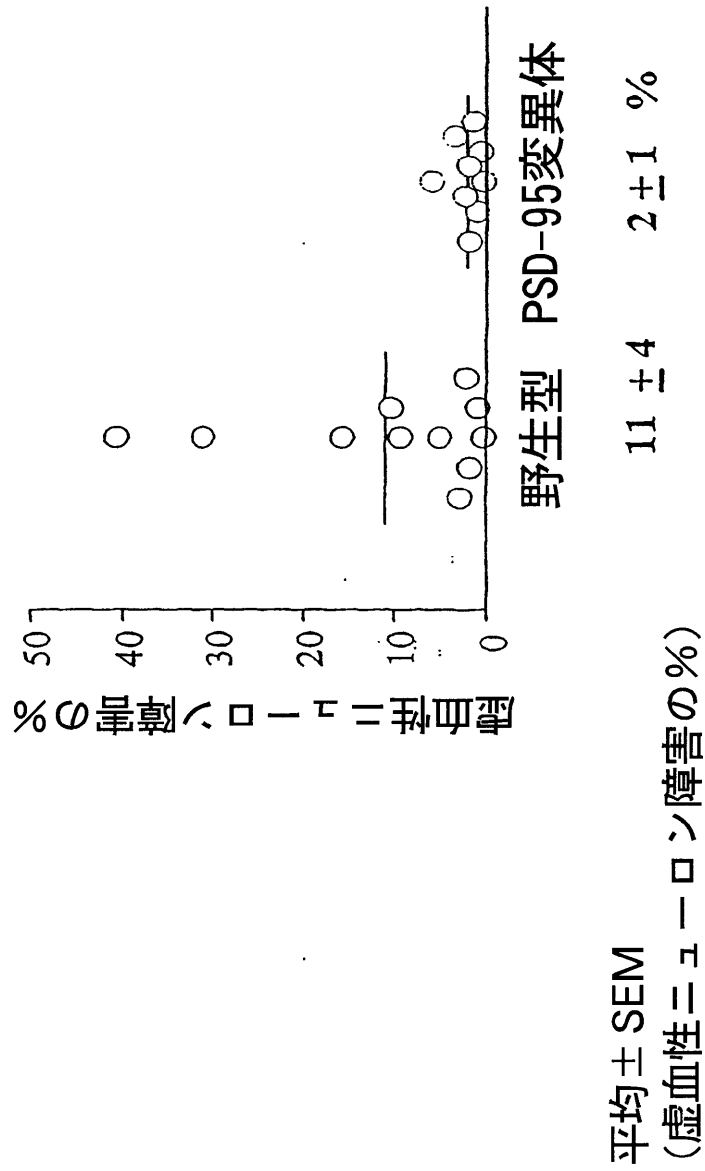


平均 ± SEM
(虚血性ニューロン障害の%)

47 ± 9 17 ± 7 %

【図25】

CAI錯体細胞層における、
低減されたニューロン障害



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 01/01570
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C12N15/12 G01N33/68 A61K38/17 A61P25/00 C12Q1/68		
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 C07K G01N A61P A61K C12N C12Q		
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, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHENG X ET AL.: "Protein kinase C potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor activity is not mediated by phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE USA, vol. 96, no. 26, 21 December 1999 (1999-12-21), pages 15262-15267, XPO02181985 page 15262, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 3 --- -/--	1-5,7,8
<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) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 6 November 2001		Date of mailing of the international search report 26/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmidt, H

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 01/01570

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BI R ET AL.: "The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE USA, vol. 97, no. 7, 28 March 2000 (2000-03-28), XP002181986 page 3602, column 1	1-5,7,8
X	CAMMAROTA M ET AL.: "Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade" MOLECULAR BRAIN RESEARCH, vol. 76, 10 March 2000 (2000-03-10), pages 36-46, XP001031139 abstract	1-5,7,8
X	KIM JH ET AL.: "SynGap: a Synaptic RasGAP that Associates with the PSD-95/SAP90 Protein Family" NEURON, vol. 20, April 1998 (1998-04), pages 683-691, XP002181987	6,20-25, 27-47, 61-72
Y	the entire document, particularly page 683, column 2, page 684, column 2, page 685, page 689, column 1; figures 1 and 3	9-12, 17-19,26
X	WO 97 46877 A (THE UNIVERSITY OF EDINBURGH) 11 December 1997 (1997-12-11) cited in the application	20-25, 27-47, 61-72
Y	page 13, line 28 - page 14, line 32; claims 1-9; figure 1	9-12,26
X	WO 97 33173 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 September 1997 (1997-09-12)	6,20-25, 27-47, 61-72
Y	page 56, line 30 - page 57, line 5; SEQ ID NO 7, example 18, figures 13 and 22D, claims 11-18	9-16,26
Y	LOTTSPREICH F & ZORBAS H: "Bioanalytik" 1998, SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, HEIDELBERG, BERLIN XP002181988 chapter 9.8: Affinitätschromatographie; page 209 - page 211	9-19,26

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-5,7-13,17,20-47,61-72 (partially), 48-60,73-77 (completely)

The initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty. So many documents were retrieved for protein complexes comprising the NR1 subunit of the NMDA receptor and components listed in table 1 and/or 2 of the application that it is impossible to determine which parts of the claims may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT). For these reasons, a meaningful search over the whole breadth of the claims is impossible.

Additionally, subject-matter of claims 48-60 and 73-77 lacks any technical feature within the meaning of Articles 5 and 6 PCT to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been restricted to NMDA-Receptor complexes that bind to peptides comprising the sequences SIESDV or QTRV as well as methods and uses thereof.

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/GB 01/01570

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746877	A	AU 3038397 A WO 9746877 A1	05-01-1998 11-12-1997
WO 9733173	A	AU 2208097 A WO 9733173 A1	22-09-1997 12-09-1997

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)		
A 6 1 P	25/20	A 6 1 P	25/28	4 H 0 4 5	
	25/28	C 0 7 K	1/00		
C 0 7 K	1/00		1/22		
	1/22		14/47		
	14/47		14/705		
	14/705	C 1 2 Q	1/68		A
C 1 2 N	5/10	G 0 1 N	30/48		R
C 1 2 Q	1/68		30/88		J
G 0 1 N	30/48		33/15		Z
	30/88		33/50		Z
	33/15		33/53	M	
	33/50		33/566		
	33/53	C 1 2 N	15/00	A	
	33/566		5/00	B	

(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, CO, 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

(71)出願人 THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF EDINBURGH INCORPORATED UNDER THE UNIVERSITIES (SCOTLAND) ACTS
The University of Edinburgh, Old College, South Bridge, Edinburgh, EH8 9YL, United Kingdom

(72)発明者 グラント, セス ガラン ニールス
イギリス, EH8 9JZ, エディン
バラ, ジョージ スクウェア 1, ユ
ニバーシティ オブ エディンバラ, デ
パートメント オブ ニューロサイエンス

(72)発明者 ハッシ, ホルガー
イギリス, EH8 9JZ, エディン
バラ, ジョージ スクウェア 1, ユ
ニバーシティ オブ エディンバラ, デ
パートメント オブ ニューロサイエンス

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BB03 BB20
CB01 CB17 CB21 DA12 DA13
DA14 DA36 DA77 FB02 FB03
FB05 FB06
4B024 AA01 AA11 AA20 BA63 BA80
CA02 CA09 DA02 GA11 HA01
HA14 HA20
4B063 QA13 QA19 QQ02 QQ43 QQ53
QR32 QR35 QR40 QR55 QS31
4B065 AA91X AA91Y AB01 AC14
AC20 BA16 CA24 CA46
4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA052
ZA152 ZA182 ZA362
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA05
BA10 CA40 DA50 DA75 EA50
FA74 FA82 GA26

专利名称(译)	生物物质及其使用方法		
公开(公告)号	JP2003530125A	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001575640	申请日	2001-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	苏格兰大学是在爱丁堡大学大学院		
申请(专利权)人(译)	爱丁堡股份有限公司大学大学院根据大学(苏格兰)阿久津		
[标]发明人	グラントセスガランニールス ハッシホルガー		
发明人	グラント, セス ガラン ニールス ハッシ, ホルガー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 B01J20/281 C07K1/00 C07K1/22 C07K14/47 C07K14/705 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/68 G01N30/88 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N30/48		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 C07K14/70571 G01N33/6896 G01N2333/705		
FI分类号	A61K45/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 C07K1/00 C07K1/22 C07K14/47 C07K14/705 C12Q1/68.A G01N30/48.R G01N30/88.J G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QS31 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA16 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA152 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA05 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/FA82 4H045/GA26		
优先权	2000008321 2000-04-06 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了多蛋白复合物，其亚复合物以及产生它们的方法。优选地，该复合物包含NMDA受体。本发明还提供了鉴定用于治疗与中枢神经系统中的NMDA受体功能障碍有关的异常和状况的化合物的方法。还提供了诊断或帮助诊断与中枢神经系统中的NMDA受体功能障碍有关的异常和状况的方法。

