(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開2001－258575

(P2001－258575A)

(43)公開日 平成13年9月25日(2001.9.25)

(51)Int.Cl7	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	ZNA	Ａ６１Ｋ 31/711		２Ｇ０４５
Ａ６１Ｋ 31/711		35/76		４Ｂ０２４
35/76		39/395	Ｄ	４Ｂ０５０
38/00			Ｐ	４Ｂ０６３
39/395		45/00		４Ｂ０６４

審査請求　未請求　請求項の数 25ＯＬ（全 13数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000－84673(P2000－84673)

(22)出願日　平成12年3月22日(2000.3.22)

(71)出願人　000002831
第一製薬株式会社
東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72)発明者　横田　博
東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72)発明者　佐藤　一紀
東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72)発明者　鈴木　伸之
東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　βアミロイドにより誘導できる遺伝子

(57)【要約】

【課題】βアミロイド処理により発現が誘導もしくは抑制される新規遺伝子を見出し、アルツハイマー病などの神経疾患を制御すること。

【解決手段】βアミロイド処理により発現が誘導される新規遺伝子をｃＤＮＡサブトラクション法により取得する方法、該方法により得られた新規ＤＮＡ、該ＤＮＡがコードするポリペプチド、該ＤＮＡを含有する組み換えベクター、該組み換えベクターを有する形質転換体、当該ポリペプチドに対する抗体、当該ポリペプチドの製造法、上記のものを利用したプロスタグランジンＥ合成酵素の遺伝子発現、酵素活性を調節する化合物のスクリーニング法、該方法で選別される化合物を提供し、さらに、これらを利用してβアミロイドに関連した神経疾患に用いる医薬組成物・診断手段を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項１】βアミロイド処理アストログリア細胞と未処理細胞を用いてサブトラクション処理することにより、βアミロイドにより発現が誘導または抑制される遺伝子を取得する方法。

【請求項２】βアミロイド処理アストログリア細胞と未処理細胞を用いてｃＤＮＡサブトラクション処理することにより、βアミロイドにより発現が誘導または抑制される遺伝子を取得する方法。

【請求項３】βアミロイド処理ラットアストログリア細胞と未処理細胞を用いてｃＤＮＡサブトラクション処理することにより、βアミロイドにより発現が誘導または抑制される遺伝子を取得する方法。

【請求項４】請求項１から３のいずれか１項に記載の取得方法で得られるＤＮＡ群。

【請求項５】下記の群より選ばれるＤＮＡまたはその相補鎖；

①配列表の配列番号１に記載のＤＮＡ配列で示されるＤＮＡ、

②配列表の配列番号１に記載のＤＮＡ配列を含有するＤＮＡ、

③前記①のＤＮＡと少なくとも約７０％のＤＮＡ配列上の相同性を有し、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ、および

④前記①から③のＤＮＡのＤＮＡ配列において１ないし数個のＤＮＡの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有し、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ。

【請求項６】請求項５に記載のＤＮＡまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ。

【請求項７】請求項５または６に記載のＤＮＡがコードするポリペプチド。

【請求項８】請求項５または６に記載のＤＮＡまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

【請求項９】請求項８に記載の組換えベクターを用いて形質転換した形質転換体。

【請求項１０】大腸菌Ｅ．ｃｏｌｉ　４３７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０７４号）。

【請求項１１】大腸菌Ｅ．ｃｏｌｉ　４３７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０７４号）が保持するプラスミドｐ４３７。

【請求項１２】請求項９に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項７に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項１３】請求項７に記載のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項１４】プロスタグランジンＥ合成酵素の活性および／またはプロスタグランジンＥ合成酵素遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング方法であって、請求項５または６に記載のＤＮＡまたはその相補鎖、請求項７に記載のポリペプチド、請求項８に記載の組換えベクター、請求項９に記載の形質転換体または請求項１３に記載の抗体のうち、少なくともいずれか１つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項１５】請求項１４に記載のスクリーニング方法により選別される化合物。

【請求項１６】請求項１４に記載のスクリーニング方法により選別されるプロスタグランジンＥ合成酵素阻害剤。

【請求項１７】請求項５または６に記載のＤＮＡまたはその相補鎖、請求項７に記載のポリペプチド、請求項８に記載の組換えベクター、請求項９に記載の形質転換体、請求項１３に記載の抗体、請求項１５に記載の化合物または請求項１６に記載の阻害剤のうち、少なくともいずれか１つを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項１８】請求項５または６に記載のＤＮＡまたはその相補鎖、請求項７に記載のポリペプチド、請求項８に記載の組換えベクター、請求項９に記載の形質転換体、請求項１３に記載の抗体、請求項１５に記載の化合物または請求項１６に記載の阻害剤のうち、少なくともいずれか１つを含有することを特徴とするプロスタグランジンＥ合成酵素に関連した疾病の予防／治療に用いる医薬組成物。

【請求項１９】請求項５または６に記載のＤＮＡまたはその相補鎖、請求項７に記載のポリペプチド、請求項８に記載の組換えベクター、請求項９に記載の形質転換体、請求項１３に記載の抗体、請求項１５に記載の化合物または請求項１６に記載の阻害剤のうち少なくともいずれか１つを含有することを特徴とする神経細胞死の予防／治療剤。

【請求項２０】請求項５または６に記載のＤＮＡまたはその相補鎖、請求項７に記載のポリペプチド、請求項８に記載の組換えベクター、請求項９に記載の形質転換体、請求項１３に記載の抗体、請求項１５に記載の化合物または請求項１６に記載の阻害剤のうち少なくともいずれか１つを含有することを特徴とするアルツハイマー病の予防／治療剤。

【請求項２１】請求項５または６に記載のＤＮＡまたはその相補鎖、請求項７に記載のポリペプチド、請求項８に記載の組換えベクター、請求項９に記載の形質転換体、請求項１３に記載の抗体、請求項１５に記載の化合物または請求項１６に記載の阻害剤のうち少なくともいずれか１つを含有することを特徴とする疾病の診断手段。

【請求項２２】プロスタグランジンＥ合成酵素の遺伝子発現量および／または酵素活性を測定する工程を含む神経細胞死の診断手段。

【請求項２３】プロスタグランジンＥ合成酵素の遺伝子発現量および／または酵素活性を測定する工程を含むア

ルツハイマー病の診断手段。

【請求項２４】プロスタグランジンＥ合成酵素阻害剤を含有する神経細胞死の予防／治療剤。

【請求項２５】プロスタグランジンＥ合成酵素阻害剤を含有するアルツハイマー病の予防／治療剤。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】本発明は、アルツハイマー病に関与する蛋白質βアミロイドにより、発現が誘導もしくは抑制される遺伝子を得る方法および、その方法により得られた新規遺伝子に関するものである。さらに詳しくは、新規遺伝子のＤＮＡ配列を有するＤＮＡ、該ＤＮＡがコードするポリペプチド、該ＤＮＡを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を用いたポリペプチドの製造方法、該ポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法により選別される化合物、該ポリペプチドもしくは該ＤＮＡに作用する該ポリペプチドの活性および／または発現の阻害剤、これらに関係する医薬組成物、およびこれらに関係する疾病の診断手段に関する。

【０００２】

【従来の技術】βアミロイドは、アルツハイマー病患者の脳で観察される老人斑の構成因子であり、アルツハイマー病の初期発症段階において最も重要な意味を持つ因子と考えられている。βアミロイドは、βアミロイド前駆体が、ある種のプロテアーゼによりプロセシングを受けることにより生成し、不溶性のβシート構造の凝集体を形成する。βアミロイドは神経細胞に対し、直接的、間接的に作用することにより、アルツハイマー病の進行を促すと考えられている。

【０００３】βアミロイドの間接的作用として、アストログリア細胞の活性化が知られている。アストログリア細胞は、βアミロイドにより活性化されると、いくつかの機能因子を生産する。アストログリア細胞とβアミロイドの協調作用により、アルツハイマー病が増悪すると考えられている。アルツハイマー病患者脳の病変部において、活性化アストログリア細胞のほとんどが老人斑部分に局在していることも知られている。

【０００４】しかしながら、βアミロイドがアストグリア細胞を活性化する機構およびβアミロイドによりアストログリア細胞において発現が誘導あるいは抑制される因子についての解析は未だ十分でない。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、アストログリア細胞においてβアミロイド処理により発現が誘導される新規遺伝子を見出すことであり、見出された遺伝子をアルツハイマー病変等の神経疾患の診断・制御を目的とする手段として使用することである。さらには、該新規遺伝子がコードするポリペプチドを提供し、該新規ポリペプチドに対する抗体を提供することである。また、他の本発明の課題は、上記のものを利用して、該新規ポリペプチドの作用および／または発現を調節する化合物のスクリーニングを行うことであり、さらには、スクリーニングにより選別される化合物を提供することであり、また、これらを利用した疾病の診断手段、治療薬を提供するものである。

【０００６】

【解決するための手段】課題解決のため、本発明者は、βアミロイド処理および未処理のラット胎児脳由来アストログリア細胞の発現遺伝子を用いたｃＤＮＡサブトラクション処理を実施し、βアミロイド処理により発現が誘導される新規の遺伝子を同定し、その塩基配列および該新規遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定し、本発明を完成した。

【０００７】すなわち、本発明は、βアミロイド処理アストログリア細胞と未処理細胞を用いてサブトラクション処理することにより、βアミロイドにより発現が誘導または抑制される遺伝子を取得する方法；βアミロイド処理アストログリア細胞と未処理細胞を用いてｃＤＮＡサブトラクション処理することにより、βアミロイドにより発現が誘導または抑制される遺伝子を取得する方法；βアミロイド処理ラットアストログリア細胞と未処理細胞を用いてｃＤＮＡサブトラクション処理することにより、βアミロイドにより発現が誘導または抑制される遺伝子を取得する方法；上記の遺伝子取得方法で得られるＤＮＡ群；次の①から④より選ばれるＤＮＡまたはその相補鎖、①配列表の配列番号１に記載のＤＮＡ配列で示されるＤＮＡ、②配列表の配列番号１に記載のＤＮＡ配列を含有するＤＮＡ、③前記①のＤＮＡと少なくとも約７０％のＤＮＡ配列上の相同性を有し、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ、および、④前記①から③のＤＮＡのＤＮＡ配列において１ないし数個のＤＮＡの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有し、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ；上記ＤＮＡまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ；本発明のＤＮＡがコードするポリペプチド；本発明のＤＮＡまたはその相補鎖を含有する組換えベクター；本発明の組換えベクターを用いて形質転換した形質転換体；大腸菌Ｅ．ｃｏｌｉ　４３７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０７４号）；大腸菌Ｅ．ｃｏｌｉ　４３７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０７４号）が含有するプラスミドｐ４３７；本発明の形質転換体を培養する工程を含む、本発明のポリペプチドの製造方法；本発明のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体；プロスタグランジンＥ合成酵素の活性および／またはプロスタグランジンＥ合成酵素遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニン

グ方法であって、本発明のＤＮＡまたはその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、または抗体のうち、少なくともいずれか１つを用いることを特徴とするスクリーニング方法；上記スクリーニング方法により選別される化合物；上記スクリーニング方法により選別されるプロスタグランジンＥ合成酵素阻害剤；本発明のＤＮＡまたはその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、化合物、または阻害剤のうち、少なくともいずれか１つを含有することを特徴とする医薬組成物；本発明のＤＮＡまたはその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、化合物、または阻害剤のうち、少なくともいずれか１つを含有することを特徴とするプロスタグランジンＥ合成酵素に関連した疾病の予防／治療に用いる医薬組成物；本発明のＤＮＡまたはその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、化合物、または阻害剤のうち少なくともいずれか１つを含有することを特徴とする神経細胞死の予防／治療剤；本発明のＤＮＡまたはその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、化合物、または阻害剤のうち少なくともいずれか１つを含有することを特徴とするアルツハイマー病の予防／治療剤；本発明のＤＮＡまたはその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、化合物、または阻害剤のうち少なくともいずれか１つを含有することを特徴とする疾病の診断手段；プロスタグランジンＥ合成酵素の遺伝子発現量および／または酵素活性を測定する工程を含む神経細胞死の診断手段；プロスタグランジンＥ合成酵素の遺伝子発現量および／または酵素活性を測定する工程を含むアルツハイマー病の診断手段；プロスタグランジンＥ合成酵素阻害剤を含有する神経細胞死の予防／治療剤；プロスタグランジンＥ合成酵素阻害剤を含有するアルツハイマー病の予防／治療剤を提供することである。

【０００８】

【発明の実施の形態】（アストログリア細胞のβアミロイド処理）アストログリア細胞は各種動物の脳から調製できる。胎児脳が好適に用いられ、用いる動物としては比較的胎児脳を採取し易い、ラット、マウス、モルモット、ウサギ等のげっ歯類小動物が好ましく、特にラットは好適に用いられる。胎児脳からのアストログリア細胞の調製は自体公知の方法が用いられるが、その方法は実験医学別冊神経生化学マニュアル（伊藤仁一ら　羊土社（１９８９））などに開示されている。

【０００９】アストログリア細胞に作用させるβアミロイドは市販されており、Ａｎａｓｐｅｃ社などから入手できるが、遺伝子工学的手法により作成することもできる。βアミロイド処理は、各種動物脳由来アストログリア細胞を適当な培養容器に播種し、無血清培地中で２日間程度培養した後、適当な緩衝液を用いて適宜希釈したβアミロイドを添加することにより行う。βアミロイドの添加濃度および処理時間は生理活性を観察し得る範囲で適宜選択されるが、濃度としては２５～５０μM、処理時間としては１０～２０時間が好ましい。βアミロイド処理と並行して、同一条件下で他の培養容器にアストログリア細胞を播種し、βアミロイドの希釈に用いた緩衝液を等量添加することによりβアミロイド未処理アストログリア細胞を調製できる。

【００１０】（発現遺伝子の調製）発現遺伝子は、mRNAのままで用いてもcDNA化して用いてもよい。mRNAからcDNAへの変換は逆転写酵素等を用いた方法が適用できる。

【００１１】βアミロイド処理および未処理のアストログリア細胞の発現遺伝子は通常用いられるRNAの採取法により採取できる。全RNAの採取には例えば、ＡＧPC法（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｎａｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ. １６２，　ｐｐ１５６－１５９　（１９８６））が適用でき、全RNAからのmRNAの採取にはオリゴｄＴカラム等を用いたｐｏｌｙＡ（＋）RNAの精製等が挙げられる。RNAサンプルは複数回採取したものを混合して用いる場合もある。採取ロットの品質を解析する目的から、アストログリアでの発現が知られているいくつかの遺伝子の発現をモニターするとよい。例えば、神経成長因子（NGF）、腫瘍壊死因子－α（TNF－α）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、ｐ７５などをモニター遺伝子として用い、これらの発現が同等であるサンプルのみを使用するとよい。

【００１２】（サブトラクション処理）βアミロイド処理により発現が誘導または抑制される遺伝子を獲得するためには、サブトラクション処理が適用できる。サブトラクション処理では差し引かれる側の遺伝子群（テスター）と差し引く側の遺伝子群（ドライバー）の二組の遺伝子群を用いる。例えば、βアミロイドにより発現が誘導される遺伝子を獲得するためには、テスターとしてβアミロイド処理細胞から得られた遺伝子（βアミロイド処理遺伝子）、ドライバーとして未処理細胞から得られた遺伝子（未処理遺伝子）を用いたサブトラクションを行い、βアミロイドにより発現が抑制される遺伝子を獲得するためには、テスターとして未処理遺伝子を、ドライバーとしてβアミロイド処理遺伝子を用いたサブトラクションを行うとよい。サブトラクション処理の方法としては、既知の各種手段を利用可能であり（特開平３－１１７４８８号）、好ましくはｃDNAサブトラクション法が挙げられる。ｃDNAサブトラクション法としては、RDA法、PCR－選択（ｓｅｌｅｃｔ）ｃDNA法などが特に好ましい。

【００１３】サブトラクション処理では、サブトラクションの陽性対照として、テスター側に適当なDNAフラグメントを加え、その濃縮を確認することにより、サブトラクション処理の効率を確認できる。また、βアミロ

イド処理により発現が誘導されることが知られている遺伝子をプローブとして、サブトラクション前およびサブトラクション後のＰＣＲ産物についてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを行うと、同様にサブトラクション処理の成否を確認できる。現在βアミロイド処理により発現が誘導されることが知られている遺伝子としてはNGF、ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　Ｎｉｔｒｉｃ　Ｏｘｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈａｓｅ（ｉNOS）、Ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｏｎ　Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　Ｎｏｒｍａｌ　Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ　ａｎｄ　Ｓｅｃｒｅｔｅｄ（ＲＡＮＴＥＳ）等が挙げられる。

【００１４】サブトラクション処理後のＰＣＲ産物は適当なベクターへ挿入し、プラスミドライブラリーなどを作製する。ベクター挿入部分をＰＣＲにより増幅し、それらの遺伝子を６０～１００ｎｇずつメンブレンにドットブロットしたものを４セット作製する。このドットメンブレンに対して、テスターとしてβアミロイド処理遺伝子、ドライバーとして未処理遺伝子を用いたサブトラクション処理前ＰＣＲ産物（以下、サブトラクション処理を（テスター）－（ドライバー）の式で表す。）と（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のサブトラクション前ＰＣＲ産物、および、（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）と（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のサブトラクション後ＰＣＲ産物の計４プローブでそれぞれディファレンシャルハイブリダイゼーションを実施する。（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のサブトラクション後ＰＣＲ産物と比較して、（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）のサブトラクション後ＰＣＲ産物において特異的に濃縮が認められるクローンを、βアミロイド処理によって発現が誘導される遺伝子として判断すればよい。ベクター挿入部分は自体公知のＤＮＡシークエンス法によりその配列を決定することができる。

【００１５】（遺伝子の取得）本発明において提供される遺伝子は、ラット胎児脳由来アストログリアを用いたｃＤＮＡサブトラクション処理により、新規な蛋白質をコードする遺伝子としてそのｃＤＮＡが取得されたものである。βアミロイド処理およびβアミロイド未処理のアストログリアの発現遺伝子を調製し、（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）のサブトラクション処理を行い、βアミロイド処理により発現が誘導されるクローンとして見出された。蛍光色素（Ｃｙ５；ファルマシア社製）標識Ｍ１３ユニバーサルおよびリバースプライマーを用いてシークエンス反応を行い、ＡＬＦ　Ｅｘｐｒｅｓｓ蛍光シークエンサー（ファルマシア社製）などでインサート部分の塩基配列を決定したところ、本発明のｃＤＮＡは１５３個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。遺伝子データベース（ＤＤＢＪ／ＥＭＢＬ／ＧｅｎＢａｎｋ）を検索したところ、本発明の遺伝子は、最近ヒトプロスタグランジンＥ合成酵素をコードすることが報告された遺伝子ｍｉｃｒｏｓｏｍａｌ　ｇｌｕｔａｔｈｉｏｎｅ　Ｓ－ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ１－ｌｉｋｅ１（MGST１－L１）（Ｊａｋｏｂｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．USA，９６，ｐｐ７２２０－７２２５（１９９９））とヌクレオチドで８２．５%、アミノ酸で７９．７%のホモロジーを有することが判明した。さらに、ラット組織ブロット（ｔｉｓｓｕｅ　ｂｌｏｔｓ）の結果から、本遺伝子はラット精巣と腎臓において高い発現を示すことが示され、MGST１－L１のヒト組織での分布パターンと同様であった。したがって、本遺伝子はラットのプロスタグランジンＥ合成酵素をコードすると予測している。

【００１６】βアミロイド処理および未処理のラットアストログリア細胞の発現遺伝子を用いたノーザンブロッティングによっても、本遺伝子は、βアミロイド処理時において顕著に誘導されることが示された。

【００１７】（ＤＮＡおよびその相補鎖）本発明のＤＮＡおよびその相補鎖は、配列表の配列番号１に示すＤＮＡ配列からなるＤＮＡおよびその相補鎖、配列表の配列番号１に示す部分配列を有するＤＮＡおよびその相補鎖、これらのＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするＤＮＡを意味する。「ＤＮＡにストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするＤＮＡ」は、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ第2版（Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９））に記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする」とは、例えば、６×ＳＳＣ、０．５%ＳＤＳおよび５０%ホルムアミドの溶液中で４２℃にて加温した後、０．１×ＳＳＣ、０．５%ＳＤＳの溶液中で６８℃にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリダイゼーションのシグナルが観察されることを表す。

【００１８】また、本発明のＤＮＡは配列表の配列番号１のＤＮＡ配列で示されるＤＮＡと少なくとも約７０%のＤＮＡ配列上の相同性を有しかつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡから選択される。その選択されるＤＮＡは、好ましくは約７０%以上、より好ましくは約８０%以上、さらに好ましくは約９０%をこえる相同性を有する。ＤＮＡ配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばＤＮＡ配列を直接決定する方法を使用することができる。コードするポリペプチドのプロスタグランジンＥ合成酵素活性の確認は本発明のＤＮＡを用いてポリペプチドを発現させることにより行うことができる。ポリペプチドの発現には公知の蛋白質発現系、例えば、無細胞蛋白質発現系を利用できる。無細胞蛋白質発現系としては、例えば、胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる（Ｎａｔｕｒｅ，１７９，ｐ

ｐ１６０－１６１　（１９５７））。

【００１９】さらに本発明のＤＮＡは上記ＤＮＡのＤＮＡ配列において１ないし数個のＤＮＡの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有し、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを意味する。ＤＮＡの欠失、置換、付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、エキソヌクレアーゼを用いた欠失変異体の作製法、部位特異的突然変異誘発法などが挙げられる。

【００２０】これらのＤＮＡは、いずれも本発明の新規ポリペプチドの製造に有用な遺伝子を提供するものであり、これをコードする遺伝子等の核酸、またはmＲＮＡ検出のためのプローブもしくはプライマーとして、あるいは遺伝子発現を調節するアンチセンスオリゴマーとして使用することができる。例えば、本発明のＤＮＡをアンチセンスとして使用する場合、本発明の新規ポリペプチドの発現が特異的に阻害される。さらに、本発明のＤＮＡは、核酸に関する試薬としても利用できる。

【００２１】（ポリペプチド）本発明のポリペプチドは配列表の配列番号１のＤＮＡ配列で示されるＤＮＡおよび配列表の配列番号１に記載のＤＮＡ配列で示されるＤＮＡを含有するＤＮＡによりコードされるポリペプチドである。さらに配列表の配列番号１に記載のＤＮＡ配列で示されるＤＮＡと少なくとも約７０％のＤＮＡ配列上の相同性を有するＤＮＡによりコードされ、かつプロスタグランジンＥ合成酵素活性を有するポリペプチドである。また、これらのポリペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【００２２】本発明のポリペプチドは、それら自体で、それら自体の生体内での機能を調節するための医薬組成物に使用できる。また、本発明のポリペプチドは、それらの機能を調節し得る化合物、例えば、阻害剤、拮抗剤、賦活剤等を得るためのスクリーニングや、それらに対する抗体の取得に用いることができる。さらに、本発明のポリペプチドは、試薬としても使用可能である。

【００２３】（組換えベクター）本発明のＤＮＡを適当なベクターＤＮＡへ組み込むことにより、組換えベクターを得ることができる。ベクターＤＮＡとしては、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のＤＮＡの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、Ｃｏｌ　Ｅ１から派生するベクター、ラムダファージから派生するベクターがある。前記ベクターＤＮＡに本発明のＤＮＡを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してＤＮＡを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるＤＮＡと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。後述の実施例中に示すｐ４３７では、ベクターＤＮＡとしてｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）を用いたが、むろんこれに限定されない。

【００２４】（形質転換体）上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなる新規ポリペプチドおよびその由来物を提供可能である。

【００２５】形質転換は、自体公知の手段を応用することができ、例えば、レプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換を行う。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を用いた自律複製系を利用する。ベクターは、宿主の種類により選択され、発現目的遺伝子配列とその複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。構成要素は宿主が原核細胞か真核細胞かによって選択し、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組み合わせて使用する。

【００２６】形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養することにより、本発明のポリペプチドの製造に用いることができる。培養は、発現産生される新規ポリペプチドの生理活性、特にプロスタグランジンＥ合成酵素活性を指標に行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチによって行う。

【００２７】後述の実施例中に示す形質転換体Ｅ．ｃｏｌｉ　４３７は、ベクターＤＮＡとしてプラスミドのＤＮＡを用い、これを大腸菌に導入して形質転換反応により得られた新規微生物であり、工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰ－７０７４号として寄託されている。

【００２８】（新規ポリペプチドおよびその由来物の回収）培地からの新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドの回収は、プロスタグランジンＥ合成酵素活性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組み合わせるか、溶解度差に基づく硫安、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。より好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作製し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

【００２９】（抗体）抗体は、本発明の新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドの抗原決定基を選別し、作製する。抗原決定基は、少なくとも、５個、より好ましくは少なくとも８～１０個のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号１のＤＮＡがコードするポリペプチド配列と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位であればよく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であることも有

効である。抗体は、免疫学的に新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドを認識する限り特に限定されない。この認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定する。

【００３０】抗体を産生するためには、本発明の新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で、単独または担体に結合して、動物に対して体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行う。担体は、自身が宿主に対して有害作用を起こさなければ特に限定されず、例えば、セルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫する動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得する。好ましい手段としては、免疫アフィニティクロマトグラフィー法である。

【００３１】モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

【００３２】ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明のポリペプチドと結合し、その活性を制御可能であり、本発明のポリペプチドの活性が関与する疾病の治療・予防のために有用である。

【００３３】（スクリーニング）かくして調製されたＤＮＡおよびその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体および抗体は、単独または複数手段を組み合わせることによって、プロスタグランジンＥ合成酵素活性または、プロスタグランジンＥ合成酵素の遺伝子発現に対する阻害剤もしくは賦活剤のスクリーニングに有効な手段を提供する。すなわち、本発明のＤＮＡまたはその相補鎖、組換えベクター、形質転換体、または抗体のうちの少なくとも１つを用いることにより、プロスタグランジンＥ合成酵素の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニングが、また、本発明のポリペプチド、または抗体のうちの少なくとも１つを用いることにより、プロスタグランジンＥ合成酵素活性を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニングが可能である。例えば、ポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質発現系を利用した遺伝子レベルでの発現調節剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて利用可能である。また、本スクリーニングにより選別された化合物は後述する医薬組成物、疾病の治療剤として有用である。

【００３４】（プロスタグランジンＥ合成酵素）プロスタグランジンはアラキドン酸のようなエイコサポリエン酸から動物組織で合成される一群の生理活性物質であり、プロスタン酸を基本構造として、五員環部分につく酸素原子と二重結合の違いに応じて、Ａ～Ｊの区別がされる。また、側鎖の二重結合の数によって１～３群があり、両者を組み合わせてプロスタグランジンE_1、プロスタグランジンH_2というように分類・表記される。２群では前駆物質のエイコサポリエン酸はアラキドン酸であり、シクロオキシゲナーゼによりアラキドン酸に２分子の酸素が添加されることによって生合成が始まり、プロスタグランジンG_2が生じる。その１５－ヒドロペルオキシドがヒドロキシル基となってプロスタグランジンH_2をつくる。プロスタグランジンH_2の異性化によりプロスタグランジンE_2が生成するが、その異性化反応を触媒する酵素がプロスタグランジンＥ合成酵素である。ヒトプロスタグランジンＥ合成酵素は１５～１６ｋＤａの蛋白として、最近、蛋白および遺伝子が同定された（Ｊａｋｏｂｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　USA，　９６，　ｐｐ７２２０－７２２５　（１９９９））。

【００３５】プロスタグランジンＥ合成酵素活性は自体公知の方法により測定することができる。例えば、上記Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ，９６，　ｐｐ７２２０－７２２５　（１９９９）に開示された方法を用いるとよい。

【００３６】プロスタグランジンＥ合成酵素の触媒作用により生成するプロスタグランジンＥは、血圧降下作用、血管拡張作用等の活性を有する生理活性物質である。プロスタグランジンＥ合成酵素の上流過程を触媒する酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害するアスピリン等の非ステロイド系抗炎症剤により、その生成が阻害されるが、近年、非ステロイド系抗炎症剤が、アルツハイマー病に対して効果を示すことが報告されている（Ａｎｄｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．　Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ，　４５，　ｐｐ１４４１－１４４５　（１９９５））。さらに、最近、アルツハイマー病の患者脳脊ずい液を用いた試験において、アルツハイマー病患者脳において、プロスタグランジンＥ量が増加していることが報告された（Ｍｏｎｔｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．　Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ，　５３，　ｐｐ１４９５－１４９８　（１９９９））。これらから、アルツハイマー病に、プロスタグランジンＥの過剰産生が関与する可能性が考えられる。一方、本発明の新規遺伝子は、βアミロイド処理により発現が誘導される遺伝子として同定され、DNA配列の相同性検索の結果から、ラットのプロスタグランジンＥ合成酵素をコードすると考えられた。このことからアルツハイマー病におけるプロスタグランジンＥの過剰産生にはβアミロイド処理によるプロスタグランジンＥ合成酵素の過剰発現が関与する可能性が考えられ、プロスタグランジンＥ合成酵素の活性・発現を阻害することは、アルツハイマー病等の神経疾患の治療に結びつく可能性を示すものである。

【００３７】（化合物、医薬組成物、診断手段）上記のスクリーニング法で選別された化合物、および、プロス

タグランジンＥ合成酵素の活性および／または遺伝子発現を阻害または増強する化合物は、プロスタグランジンＥ合成酵素活性、プロスタグランジンＥ合成酵素発現を調節する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物として利用可能である。上記の阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としては、蛋白質、ポリペプチド、抗原性を有さないポリペプチド、低分子化合物が挙げられ、好ましくは低分子化合物である。

【００３８】かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性を毒性等を考慮して選別することによって、プロスタグランジンＥ合成酵素の活性および／または発現に関連する疾病の治療に用いる医薬組成物として調製可能である。また、本発明からなる新規ＤＮＡまたはその相補鎖、これらがコードするポリペプチド、上記ＤＮＡまたはその相補鎖を含む組換えベクター、これら組換えベクターを用いて形質転換した形質転換体、および上記ポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それら自体が、プロスタグランジンＥ合成酵素の活性、発現に対する阻害、拮抗、賦活等の機能を有し、プロスタグランジンＥ合成酵素の活性、発現に関連する疾病の治療に用いる医薬手段として使用できる。

【００３９】プロスタグランジンＥ合成酵素の活性、発現に関連する疾病としては、神経細胞死が関与する疾病、例えばアルツハイマー病等の神経疾患が挙げられる。なお、製剤化にあたっては、化合物、ポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等、各対照に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。

【００４０】本発明の新規ＤＮＡまたはその相補鎖、これらがコードするポリペプチド、上記ＤＮＡまたはその相補鎖を含む組換えベクター、これら組換えベクターを用いて形質転換した形質転換体、および上記ポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、プロスタグランジンＥ合成酵素の活性、発現に関連する神経細胞死、疾患等の診断手段として有用である。特に、アルツハイマー病の診断マーカーおよび／または試薬等の診断手段として有用である。診断は本発明のＤＮＡとの相互作用・反応性を利用して、プロスタグランジンＥ合成酵素の核酸配列の存在量を決定すること、および／またはプロスタグランジンＥ合成酵素の試料中での存在量を決定することによって行う。試料としては血液、ずい液、脳生検サンプル等が好適であり、特に脳脊ずい液が好ましい。診断に用いる測定法は、自体公知の抗原抗体反応、酵素反応系、ＰＣＲ反応系等を利用すればよい。また、試料中のプロスタグランジンＥの量および／または活性を測定することもプロスタグランジンＥ合成酵素の活性・発現を間接的に測定する手段として有用である。プロスタグランジンＥの定量にはプロスタグランジンＥに対する抗体を用いた放射免疫測定法（平田文雄ら、Ｍｅｄ．　Ｔｅｃｈｎｏｌ．，　６，　ｐｐ１２４２　（１９７８））等の自体公知の方法が適用できる。なお、ここで言う手段とは、目的達成のために使用する方法および／または媒体を意味する。すなわち、例えば、診断手段には、診断するための方法、診断に用いる試薬キットなどが含まれる。

【００４１】

【実施例】（アストログリア細胞からのｐｏｌｙ　Ａ（＋）ＲＮＡの調製）アストログリア細胞はＷｉｓｔｅｒ系ラット胎児脳から、実験医学別冊神経生化学マニュアル（伊藤　仁一ら　羊土社（１９８９））　に従い調製した。ラット胎児脳由来アストログリア細胞を二次培養後、２日間無血清とした後に、２．５μＭ／６ｃｍプラスティックディッシュとなるようにβアミロイド（Ａｎａｓｐｅｃ社製、βアミロイド１－４０）または等量の溶媒を添加し、１５時間培養した。

【００４２】βアミロイド処理および未処理のアストログリア細胞（６ｃｍプラスティックディッシュ各２０枚）よりＡＧＰＣ法にて９回にわたり全ＲＮＡを抽出した。

【００４３】βアミロイド処理・未処理の各ロットの全ＲＮＡの品質を解析する目的から、アストログリア細胞での発現が知られている遺伝子であるＮＧＦ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ｐ７５の遺伝子を用いてＲＴ－ＰＣＲを実施した。さらにＮＧＦについてはそのＲＴ－ＰＣＲ産物をプローブとしてノーザンブロッティングを実施した。これらの結果をもとにサブトラクション処理に使用するロットの選択を行い、選択したロットの全ＲＮＡをそれぞれ混合し、オリゴｄＴ－ラテックス法によりｐｏｌｙ　Ａ（＋）ＲＮＡを調製した。

【００４４】（サブトラクション処理）βアミロイド処理および未処理のアストログリア細胞由来のｐｏｌｙ　Ａ（＋）ＲＮＡ各２μｇを出発原料として（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）および（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のｃＤＮＡサブトラクション処理を、Ｄｉａｔｃｈｅｎｋｏらの方法（Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　ＵＳＡ，　９３，　ｐｐ６０２５－６０３０（１９９６））に準じて行った。サブトラクション処理のポジティブコントロールとして、Ｒｓａ　Ｉ消化後のテスターにφＸ１７４／Ｈａｅ　ＩＩＩ消化ＤＮＡフラグメントをテスター中の重量比で約２．５×１０$^{-5}$になるように加えた。

【００４５】実施したサブトラクション処理の効率を検証するため、陽性対照であるφＸ１７４／Ｈａｅ　ＩＩＩ消化ＤＮＡフラグメント、およびＮＧＦ遺伝子をプローブとして、サブトラクション後のＰＣＲ産物およびサブトラクション前のＰＣＲ産物についてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを実施した。

【００４６】（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）および（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のサブトラクション後のＰＣＲ産物を９００ｂｐ以上（グループＩ）、５００ｂｐ以上９００ｂｐ以下

（グループＩＩ）、２５０ｂｐ以上５００ｂｐ以下（グループＩＩＩ）にサイズ分画した。

【００４７】（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）のグループＩＩＩに属するＰＣＲ産物のベクター（ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ）へのライゲーションを行い、プラスミドライブラリーを作製した。

【００４８】プラスミドライブラリーの４８０クローンのベクター挿入部分をＰＣＲ法により増幅し、それらの遺伝子を６０～１００ｎｇずつメンブレン（Ｈｙｂｏｎｄ－Ｎ＋；Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）にドットブロットしたものを４セット作製した。このドットブロットメンブレンに対して、（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）および（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のサブトラクション後のＰＣＲ産物及び、（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）および（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のサブトラクション前のＰＣＲ産物の計４プローブでそれぞれディファレンシャルハイブリダイゼーションを実施した。（未処理遺伝子）－（βアミロイド処理遺伝子）のサブトラクション後のＰＣＲ産物と比較して（βアミロイド処理遺伝子）－（未処理遺伝子）のサブトラクション後のＰＣＲ産物において特異的に濃縮が認められるクローンを選択した。

【００４９】（ノーザンブロットハイブリダイゼーションによる解析）ディファレンシャルハイブリダイゼーションスクリーニングで選択したクローン群のそれぞれのベクター挿入部分をプローブとしてβアミロイド処理および未処理アストログリア細胞由来ｐｏｌｙ　Ａ（＋）ＲＮＡを用いたノーザンブロット・ハイブリダイゼーションを実施した。なお、ディファレンシャルハイブリダイゼーションスクリーニングで選択されたクローン群中にクローンの重複の可能性が考えられるものに関してはサザンブロット・ハイブリダイゼーションによってその有無を確認し、重複することが判明したクローンはあらかじめノーザンブロット・ハイブリダイゼーションによる解析から除外した。

【００５０】（塩基配列解析およびホモロジー検索）βアミロイドにより発現が誘導されるクローン群はＣｙ５標識Ｍ１３ユニバーサルおよびリバースプライマーを用いてシークエンス反応を行い、ＡＬＦ　Ｅｘｐｒｅｓｓ蛍光シークエンサー（ファルマシア社製）でベクター挿入部分の塩基配列を解析した。得られた配列について、ＮＣＢＩデータベースでホモロジー検索を実施した。得られた全長ｃＤＮＡのうちの１クローンは新規遺伝子であり、最近ヒトプロスタグランジンＥ合成酵素をコードすることが報告された遺伝子ＭＧＳＴ１－Ｌ１と塩基配列で７９．７％、アミノ酸で８２．５％のホモロジーがあった（図１）。

【００５１】（ノーザンブロット法による新規遺伝子誘導の確認）上記方法により、βアミロイド処理および未処理のアストログリアから、それぞれのｐｏｌｙ　Ａ（＋）　ＲＮＡサンプルを調製した。上記新規遺伝子のサブトラクション処理後ｃＤＮＡフラグメントをプローブとして、ノーザンブロッティングを行った。常発現性遺伝子であるグリセルアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｇ３ＰＤＨ）ｃＤＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）を内部標準プローブとして用いた。検出はＢＡＳ２０００（富士フィルム社製）を用いて行った。Ｇ３ＰＤＨ遺伝子は、βアミロイド処理時および未処理時において発現量に差が認められないのに対し、本発明の新規遺伝子は、βアミロイド未処理時では低レベルで維持されていた発現量が、βアミロイド処理により約２２倍増加した（図２）。

【００５２】（新規遺伝子発現の組織分布）ラットの各組織から抽出したｐｏｌｙ　Ａ　（＋）　ＲＮＡのノーザンブロット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）に、本発明の新規遺伝子由来のランダムプライムｃＤＮＡプローブをハイブリダイゼーションさせた。腎臓と精巣において、本発明の新規遺伝子の強い発現が見られた。脳、肺、骨格筋において弱い発現が見られた（図３）。本遺伝子の各組織における発現パターンは、ヒトのプロスタグランジンＥ合成酵素遺伝子ＭＧＳＴ１－Ｌ１の発現パターン（Ｊａｋｏｂｓｓｏｎｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９６，ｐｐ７２２０－７２２５　（１９９９））と一致しており、この結果は本遺伝子が、ラットにおける既報と同タイプのプロスタグランジンＥ合成酵素をコードすることを支持している。

【００５３】（大腸菌Ｅ．ｃｏｌｉ　４３７（ＦＰＲＭ　ＢＰ－７０７４号）の作製）ＺＡＰベクター（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）のマルチクローニングサイト内Ｂａｍ　Ｈ１－ＸｈｏＩ部位に本発明遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）４６２塩基対を含むｃＤＮＡ全長約１．３ｋＢを挿入した。この組換えベクターをＺＡＰ－ｃＤＮＡ合成システム（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）を用いてｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ　（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）に変換しｐ４３７を得た（図４）。大腸菌コンピテントセル（Ｍａｘ　Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ$DH5\alpha$　ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　ｃｅｌｌｓ；　ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）５０μｌに対し、得られたプラスミド２５ｐｇを加えて形質転換を行った。４５０μｌのＳＯＣ　（２０ｇ／ｌ　トリプトン、５ｇ／ｌ　イーストエクストラクト、０．５ｇ／ｌ　ＮａＣｌ、２．５ｍＭ　ＫＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、２０ｍＭ　グルコース）を加え、３７℃にて１時間振とう培養後、ＬＢ－アンピシリンプレート（１０ｇ／ｌ　ＮａＣｌ、１０ｇ／ｌ　トリプトン、５ｇ／ｌ　イーストエクストラクト、２５μｇ／ｍｌ　アンピシリン）に播種し、アンピシリン耐性クローンを得た。

【００５４】

【発明の効果】以上説明したように本発明はβアミロイド処理により発現が誘導される新規プロスタグランジンＥ合成酵素を提供するものである。この特性を利用した新規医薬組成物、診断手段の提供は、アルツハイマー病等のβアミロイドに関連した疾患の臨床・基礎の医用領域において大きな有用性を提供する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Daiichi Pharmaceutical Co
.,Ltd.
<120> Novel gene induced by beta
-amyloid
<130> N00032201A
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 462
<212> DNA
<213> rat
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(462)
<400> 1
atg act tcc ctg ggt ttg gtg atg gag aac
agc cag gtg ctc ccc gcc 48
Met Thr Ser Leu Gly Leu Val Met Glu Asn
Ser Gln Val Leu Pro Ala
1 5 10 15
ttt ctg ctc tgc agc aca ctg ctg gtc atc
aag atg tac gcg gtg gct 96
Phe Leu Leu Cys Ser Thr Leu Leu Val Ile
Lys Met Tyr Ala Val Ala
20 25 30
gtc atc aca ggc caa gtc agg ctg cgg aag
aag gct ttt gcc aac ccc 144
Val Ile Thr Gly Gln Val Arg Leu Arg Lys
Lys Ala Phe Ala Asn Pro
35 40 45
gag gac gcg ttg aaa cgt gga ggt ctc cag
tac tgc agg agt gac cca 192
Glu Asp Ala Leu Lys Arg Gly Gly Leu Gln
Tyr Cys Arg Ser Asp Pro
50 55 60
gat gtg gag cgc tgc ctc aga gcc cac cgc
aac gac atg gag acg atc 240
Asp Val Glu Arg Cys Leu Arg Ala His Arg
Asn Asp Met Glu Thr Ile
65 70 75 80

tac ccc ttc ctc ttc ctt ggt ttc gtc tac
tca ttc ctg gga ccc aac 288
Tyr Pro Phe Leu Phe Leu Gly Phe Val Tyr
Ser Phe Leu Gly Pro Asn
85 90 95

<211> 153
<212> PRT
<213> rat
<400> 2
Met Thr Ser Leu Gly Leu Val Met Glu Asn Ser Gln Val Leu Pro Ala
1 5 10 15

Phe Leu Leu Cys Ser Thr Leu Leu Val Ile Lys Met Tyr Ala Val Ala
20 25 30

Val Ile Thr Gly Gln Val Arg Leu Arg Lys Lys Ala Phe Ala Asn Pro
35 40 45

Glu Asp Ala Leu Lys Arg Gly Gly Leu Gln Tyr Cys Arg Ser Asp Pro
50 55 60

Asp Val Glu Arg Cys Leu Arg Ala His Arg Asn Asp Met Glu Thr Ile
65 70 75 80

Tyr Pro Phe Leu Phe Leu Gly Phe Val Tyr Ser Phe Leu Gly Pro Asn
85 90 95

Pro Leu Ile Ala Trp Met His Phe Leu Val Val Leu Thr Gly Arg Val
100 105 110

Val His Thr Val Ala Tyr Leu Gly Lys Met Asn Pro Arg Ile Arg Ser
115 120 125

Val Ala Tyr Val Leu Ala Gln Phe Ala Cys Phe Ser Met Ala Leu Gln
130 135 140

Ile Leu Trp Glu Val Ala His His Leu

145 150

【図面の簡単な説明】

【図１】　本発明の遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列とヒト遺伝子ＭＧＳＴ１－Ｌ１がコードするヒトプロスタグランジンＥ合成酵素のアミノ酸配列の比較を説明する図である。上段のアミノ酸配列は本発明の遺伝子がコードするポリペプチドの推定アミノ酸配列、下段のアミノ酸配列はヒトプロスタグランジンＥ合成酵素のアミノ酸配列。図中「＊」はアミノ酸が同一であることを示し、「．」は異なることを示す。

【図２】　本発明の遺伝子の発現がβアミロイド処理により誘導されることを確認したノーザンブロッティングの結果の図である。図中、レーンＵは無処理のラットアストログリア細胞由来ｐｏｌｙ（Ａ）＋ＲＮＡサンプル、レーンＡは２５μＭのβアミロイド１６時間処理後のラットアストログリア細胞由来ｐｏｌｙ（Ａ）＋ＲＮＡサンプルをそれぞれ示す。上段は本発明の遺伝子のｍＲＮＡ由来ｃＤＮＡフラグメントをプローブとして用いた結果を示す。下段は内部標準として用いたＧ３ＰＤＨのｃＤＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）をプローブとして用いた結果を示す。

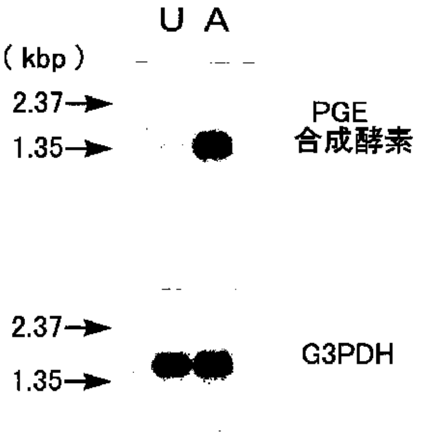
【図３】　本発明の遺伝子の組織分布をラット組織ブロット（ｔｉｓｓｕｅｂｌｏｔｓ）により解析した結果を示す図である。本発明の遺伝子のｍＲＮＡ由来ｃＤＮＡフラグメントをプローブとして用いた。

【図４】　本発明のプラスミドｐ４３７の構築を示す図である。図中「ＰＧＥｓｙｎｔｈａｓｅ」として表した部分が本発明の遺伝子の挿入部分である。

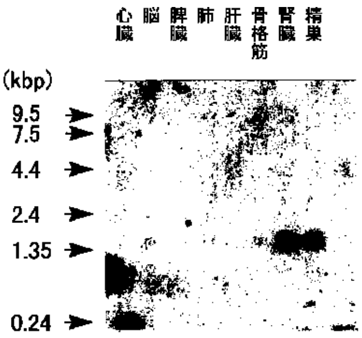
【図１】

```
rat     MTSLGLVMEN SQVLPAFLLC STLLVIKMYA VAVITGQVRL  40
        *.. .*** . *..******* *********. **.*******
human   MPAHSLVM-S SPALPAFLLC STLLVIKMYV VAIITGQVRL  39

rat     RKKAFANPED ALKRGGLQYC RSDPDVERCL RAHRNDMETI  80
        ********** **..** *** ********** **********
human   RKKAFANPED ALRHGGPQYC RSDPDVERCL RAHRNDMETI  79

rat     YPFLFLGFVY SFLGPNPLIA WIHFLVVLTG RVVHTVAYLG 100
        ********** *******..* *.**** *.* **.*******
human   YPFLFLGFVY SFLGPNPFVA WMHFLVFLVG RVAHTVAYLG  99

rat     KMNPRIRSGA YVLAQFACFS MALQILWEVA HHL        153
        *....*** . *.***..* * ********.* .**
human   KLRAPIRSVT YTLAQLPCAS MALQILWEAA RHL        152
```

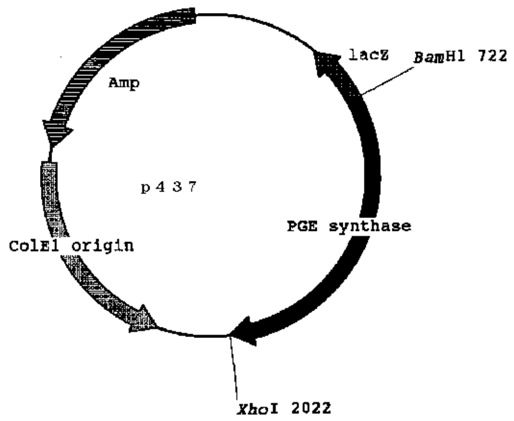
【図２】



【図３】



【図４】



フロントページの続き

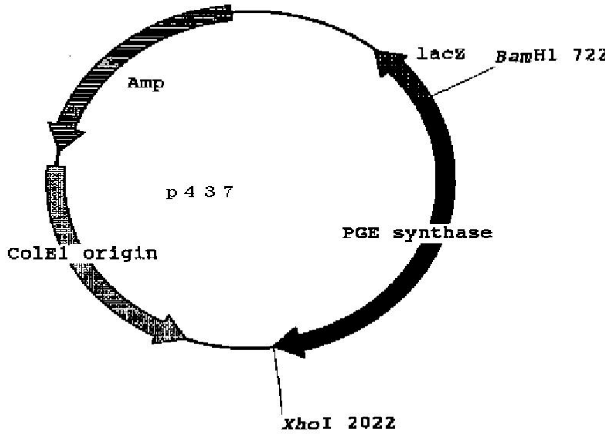
(51)Int.Cl.[7]		識別記号	FI			テーマコード(参考)
Ａ６１Ｋ	39/395		Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｂ０６５
	45/00		Ａ６１Ｐ	25/00		４Ｃ０８４
	48/00			25/28		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	25/00			43/00	１１１	４Ｃ０８６
	25/28		Ｃ０７Ｋ	16/40		４Ｃ０８７
	43/00	１１１	Ｃ１２Ｎ	1/15		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ	16/40			1/19		
Ｃ１２Ｎ	1/15			1/21		
	1/19			9/90		
	1/21		Ｃ１２Ｑ	1/533		
	5/10			1/68	Ａ	
	9/90		Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	1/533			33/50	Ｚ	
	1/68			33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ	33/15		Ｃ１２Ｐ	21/08		
	33/50		(Ｃ１２Ｎ	1/21		

	33/53		Ｃ１２Ｒ	1:19)
// Ｃ１２Ｐ	21/08		Ｃ１２Ｎ	15/00　ＺＮＡＡ
(Ｃ１２Ｎ	1/21		Ａ６１Ｋ	37/02
Ｃ１２Ｒ	1:19)		Ｃ１２Ｎ	5/00　Ａ

Ｆターム(参考)　2G045 AA34 AA35 AA40 BB20 CB01
CB21 DA12 DA13 DA14 DA36
DA77 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA07 BA53 CA04
CA09 DA02 DA06 DA07 DA11
DA12 EA04 GA11 HA03 HA12
4B050 CC03 CC10 DD07 LL01 LL03
4B063 QA01 QA05 QA19 QQ03 QQ39
QQ44 QR19 QR33 QR48 QR51
QR56 QR59 QR74 QR80 QS34
4B064 AG01 AG21 AG27 BA13 CA10
CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA19X AA26X AA72X AA90X
AA90Y AA91Y AB01 AB04
BA02 BA08 CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA13 BA21 CA53
DC32 NA14 ZA022 ZA162
ZC202
4C085 AA14 BB11 CC04 CC21 DD33
FF24
4C086 AA01 EA03 NA14 ZA03 ZA16
4C087 AA01 AA03 BC83 CA12 CA16
NA14 ZA03 ZA16
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA45 DA75 DA76 DA89 EA21
EA50 FA72 FA73 FA74 HA05

专利名称(译)	可以由β淀粉样蛋白诱导的基因		
公开(公告)号	JP2001258575A	公开(公告)日	2001-09-25
申请号	JP2000084673	申请日	2000-03-22
申请(专利权)人(译)	第一制药有限公司		
[标]发明人	横田博 佐藤一紀 鈴木伸之		
发明人	横田 博 佐藤 一紀 鈴木 伸之		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/711 A61K35/30 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/16 C12N9/90 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/533 C12Q1/68 C12R1/19 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	A61K31/711 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.P A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/90 C12Q1/533 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12P21/08 C12R1/19 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K35/30 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/16		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA07 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA12 4B050/CC03 4B050/CC10 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ39 4B063/QQ44 4B063/QR19 4B063/QR33 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR59 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG21 4B064/AG27 4B064/BA13 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA19X 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA21 4C084/CA53 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA162 4C084/ZC202 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/CC21 4C085/DD33 4C085/FF24 4C086/AA01 4C086/EA03 4C086/NA14 4C086/ZA03 4C086/ZA16 4C087/AA01 4C087/AA03 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/CA16 4C087/NA14 4C087/ZA03 4C087/ZA16 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/HA05		
其他公开文献	JP2001258575A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种获得通过用β-淀粉样蛋白治疗诱导或抑制其表达的新基因的方法，以控制神经疾病，例如阿尔茨海默氏病。解决方案：用于获得通过β-淀粉样蛋白处理诱导或抑制表达的新基因的该方法包括应用cDNA（互补脱氧核糖核酸）减法技术。通过上述方法获得的新DNA，由DNA编码的肽，含有该DNA的重组载体，具有该重组载体的转化体，该肽的抗体，该多肽的制备方法，筛选该DNA的方法。通过使用上述DNA等控制前列腺素E合成酶的基因表达和/或其酶活性的化合物，以及通过筛选方法筛选的化合物。此外，通过利用上述化合物和方法，提供了用于与β-淀粉样蛋白有关的神经疾病的药物组合物和诊断措施。

【図４】