

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/125702

発行日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)

(43) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 6 4
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 31 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2015-545213 (P2015-545213)	(71) 出願人	591063394 公益財団法人東京都医学総合研究所 東京都世田谷区上北沢2-1-6
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/053930	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(22) 国際出願日	平成27年2月13日 (2015. 2. 13)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(11) 特許番号	特許第5997394号 (P5997394)	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(45) 特許公報発行日	平成28年9月28日 (2016. 9. 28)	(74) 代理人	100180231 弁理士 水島 亜希子
(31) 優先権主張番号	特願2014-28449 (P2014-28449)	(72) 発明者	松田 憲之 東京都世田谷区上北沢2-1-6 公益財 団法人東京都医学総合研究所内
(32) 優先日	平成26年2月18日 (2014. 2. 18)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パーキンソン病のバイオマーカーおよびその利用

(57) 【要約】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを標的分子とする抗体を提供する。また、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを標的分子とするパーキンソン病の早期かつ特異的な検出方法、ならびに、パーキンソン病の根本的な治療または予防のための医薬組成物およびそのスクリーニング方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者から単離された試料について、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを検出または定量するステップを含むパーキンソン病の検査方法。

【請求項 2】

前記検出または定量するステップが、免疫学的手法により行われる、請求項 2 に記載の検査方法。

【請求項 3】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンからなるパーキンソン病検出用バイオマーカー。

【請求項 4】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体。

【請求項 5】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬。

【請求項 7】

65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬。

【請求項 8】

(1) PINK 1 を発現する細胞を提供するステップと、
 (2) 前記細胞中のミトコンドリアを傷害するステップと、
 (3) 前記細胞に候補化合物を接触させるステップと、
 (4) 前記細胞において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップと
 を含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法。

【請求項 9】

(1) ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを含有するリン酸化反応溶液を調製するステップと、
 (2) 前記リン酸化反応溶液に候補化合物を添加するステップと、
 (3) 前記リン酸化反応溶液において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップと
 を含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法。

【請求項 10】

前記リン酸化反応溶液が細胞抽出液である、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、パーキンソン病の診断用バイオマーカーおよびそれに対する抗体、パーキンソン病の検査・診断方法、ならびにパーキンソン病の治療薬または予防薬およびそのスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

パーキンソン病は、65歳以上の人口における罹患率が1%を超える、加齢に伴って高頻度で発症する神経変性疾患である。今後、人口の高齢化とともに患者数が大幅に増加することが予想されており、パーキンソン病の診断・予防・治療方法の早期確立が急務である。

【0003】

10

20

30

40

50

パーキンソン病は、中脳の黒質におけるドーパミン神経細胞が変性・脱落することによって発症することが知られており、L-ドーパの投与によるドーパミン補充療法が、パーキンソン病の主な予後治療として行われている。しかし、ドーパミン補充療法は対症療法に過ぎず、パーキンソン病の症状を抑制するためには投薬を継続しなければならない。さらに、長期間にわたるL-ドーパの投与は、薬効の継続時間が短くなることによるウェアリング・オフや、ジスキネジアと呼ばれる異常な不随意性運動などの深刻な副作用をもたらすという問題がある。また、診断についても、パーキンソン病に特徴的な症状に基づいた診断方法しかないため、症状が軽い早期の段階では他の神経疾患との明確な区別ができないのが現状である。パーキンソン病の根本療法および早期かつ特異的な診断方法の確立のためには、パーキンソン病の発症機序、すなわちドーパミン神経細胞の変性が起こるメカニズムが解明される必要があり、その早急な解明が望まれている。

10

【0004】

パーキンソン病の大多数は孤発性であるが、一部は家族性（遺伝性）であり、複数の原因遺伝子が単離・同定されている。孤発性パーキンソン病と遺伝性パーキンソン病は臨床症状が共通していることから、ドーパミン細胞の変性における共通のメカニズムの存在が推定されており、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子の解析が孤発型パーキンソン病の発症メカニズムの解明につながることを期待されている。遺伝性劣性若年性パーキンソン症候群の原因遺伝子としては、PINK1およびParkinが同定されている（非特許文献1）。PINK1はミトコンドリアに局在するSer/Thrキナーゼを、Parkinはユビキチンリガーゼ（E3）を、それぞれコードしており、PINK1とParkinが膜電位の消失したミトコンドリア上に集積し、ミトコンドリアをユビキチン化することにより、不良ミトコンドリアのみを選択的に分解へと導く（非特許文献2）。この不良ミトコンドリアの選択的分解機構（マイトファジー）の異常が、パーキンソン病における神経変性の一因と考えられている。

20

【0005】

Parkinは、ユビキチンリガーゼ（E3）である。E3は、ユビキチン-プロテアソーム系における基質特異性を決定する上で最も重要な酵素であり、マイトファジー異常によるパーキンソン病の発症メカニズムを解明する上で、Parkin活性化のメカニズムを理解することは極めて重要である。Parkinは、通常は不活性型の状態で細胞質に存在するが、不良ミトコンドリアに移行すると活性化されて、E3酵素として機能するようになる。このParkinのミトコンドリアへの移行と活性化の両方に、PINK1が必須であることが知られている（非特許文献3）。さらに最近の研究により、ミトコンドリアの膜電位の低下に伴ってPINK1の自己リン酸化が起こると、PINK1依存的にParkinがリン酸化され、その結果、Parkinは、ミトコンドリアへと移行するとともに、E3酵素として活性化されることが見出された（非特許文献4、非特許文献5）。しかし、Parkinの活性化にはリン酸化が必須である一方、それのみでは不十分であることも確認されており、Parkin活性化のメカニズムは依然として部分的な理解にとどまっている。

30

【0006】

E3酵素として活性化されたParkinは、ミトコンドリア外膜上の基質タンパク質をユビキチン化し、ミトコンドリアを分解へと導く。ユビキチンは、全ての真核生物に普遍的に存在する76個のアミノ酸からなるタンパク質であり、そのアミノ酸配列は高度に保存されている。ユビキチン研究の歴史は古く、ユビキチンは、基質タンパク質を分解へと誘導する目印として働く以外にも、DNA修復や細胞内のシグナル伝達などの種々の機能に関与することが明らかにされている。また、ユビキチンは、7つのリジン残基を有しており、これらのリジン残基を介して他のユビキチンのC末端のグリシン残基と結合してポリユビキチン鎖を形成することができ、その際の結合パターンの違い（すなわちポリユビキチン鎖の形状の違い）によって、種々の異なる機能が発揮されることも詳細に研究されている。しかし、ユビキチン自体が何らかの翻訳後修飾を受けて、その機能が変化するという報告は、今までに一例もなされていない。

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Nature, Vol. 392, pp. 605 - 608, 1998

【非特許文献2】Nature, Vol. 441, pp. 1162 - 1166, 2006

【非特許文献3】J. Cell Biol., Vol. 189, pp. 211 - 221, 2010

【非特許文献4】Sci. Rep., Vol. 2, srep01002, 2012

【非特許文献5】J. Biol. Chem., Vol. 288, pp. 22019 - 22032, 2013

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、Parkinの活性化機構を明らかにし、それに基づくパーキンソン病の早期診断、予防、根本的な治療を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、鋭意研究の結果、Parkinが完全に活性化されるためには、Parkinのリン酸化に加えて、ユビキチンがリン酸化されることが必須であることを見出した。ユビキチンのリン酸化がParkinの活性化のために必須であるという知見が新規であるのみならず、ユビキチン自体が何らかの翻訳後修飾を受けること、また、それによって細胞内シグナル伝達の制御に関与するということは、従来全く知られていなかった驚くべき発見事項である。本発明者らは、この新規な発見に基づき、リン酸化されたユビキチンが、パーキンソン病の検出、診断、予防、治療、およびパーキンソン病の予防・治療薬のスクリーニングに有用であることを見出した。

20

【0010】

すなわち、本発明は、一実施形態によれば、被験者から単離された試料について、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを検出または定量するステップを含む、パーキンソン病の検査方法を提供するものである。

30

【0011】

前記検出または定量するステップは、免疫学的手法により行われることが好ましい。

【0012】

また、本発明は、一実施形態によれば、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンからなるパーキンソン病検出用バイオマーカーを提供するものである。

【0013】

また、本発明は、一実施形態によれば、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体を提供するものである。

【0014】

前記抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることが好ましい。

40

【0015】

また、本発明は、一実施形態によれば、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬を提供するものである。

【0016】

また、本発明は、一実施形態によれば、65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬を提供するものである。

【0017】

また、本発明は、一実施形態によれば、(1) PINK1を発現する細胞を提供するス

50

テップと、(2)前記細胞中のミトコンドリアを傷害するステップと、(3)前記細胞に候補化合物を接触させるステップと、(4)前記細胞において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップとを含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法を提供するものである。

【0018】

また、本発明は、一実施形態によれば、(1)ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを含有するリン酸化反応溶液を調製するステップと、(2)前記リン酸化反応溶液に候補化合物を添加するステップと、(3)前記リン酸化反応溶液において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップとを含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法を提供するものである。

10

【0019】

前記リン酸化反応溶液は、細胞抽出液であることが好ましい。

【発明の効果】

【0020】

本発明に係るリン酸化されたユビキチンは、パーキンソン病の発症プロセスを測定・評価できるバイオマーカーとして、パーキンソン病の早期かつ特異的な診断や、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニングに有用である。また、本発明に係るリン酸化されたユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体は、前記バイオマーカーの検出・測定に有用である。

【0021】

また、本発明に係るリン酸化されたユビキチンおよびリン酸化模倣型ユビキチンは、パーキンソン病の治療薬または予防薬として有用であり、早期かつ根本的なパーキンソン病の治療を可能とする。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】CCC P処理細胞におけるユビキチンのリン酸化をPhos-tagアッセイにより確認した図である。

【図2】無細胞系におけるユビキチンのリン酸化をPhos-tagアッセイにより確認した図である。

【図3】ユビキチンのリン酸化部位を特定するための質量分析の結果を示す図である。

30

【図4】無細胞系における組換えユビキチンのリン酸化部位が65番目のセリン残基であることをPhos-tagアッセイにより確認した図である。

【図5】CCC P処理細胞における組換えユビキチンのリン酸化部位が65番目のセリン残基であることをPhos-tagアッセイにより確認した図である。

【図6】PINK1^{-/-}細胞におけるユビキチンのリン酸化をPhos-tagアッセイにより確認した図である。

【図7】単離PINK1によるユビキチンのリン酸化をPhos-tagアッセイにより確認した図である。

【図8】リン酸化模倣型ユビキチンによるParkin活性化を細胞内ユビキチン化アッセイにより確認した図である。

40

【図9】C末端改変ユビキチンによるParkin活性化を細胞内ユビキチン化アッセイにより確認した図である。

【図10】ミトコンドリアのユビキチン化を示す多重蛍光免疫染色像である。

【図11】無細胞系における組換えユビキチンまたは65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンによるParkinの活性化を示す図である。

【図12】Parkinの活性化メカニズムの模式図である。

【図13】抗リン酸化ユビキチンウサギポリクローナル抗体による、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンの検出を示す図である。

【図14】抗リン酸化ユビキチンモルモットポリクローナル抗体による、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンの検出を示す図である。

50

【図15】細胞内における65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンの存在を、質量分析により確認した図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

【0024】

本発明の第一の局面は、パーキンソン病の早期検出に関する。この局面では、パーキンソン病検出用のバイオマーカーおよびその用途が提供される。

【0025】

本発明は、一実施形態によれば、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンからなるパーキンソン病検出用バイオマーカーである。本実施形態における「パーキンソン病検出用バイオマーカー」とは、パーキンソン病の罹患の有無もしくは罹患の程度を検出するための指標となる生体分子を意味する。

【0026】

「パーキンソン病」とは、臨床的には、(1)四肢の筋固縮、(2)安静時振戦などの不随意運動、(3)寡動や無動、(4)姿勢保持反射障害の少なくとも2つ以上の症状を呈し、病理学的には、黒質におけるドーパミン神経細胞の変性脱落を特徴とする神経変性疾患である。本発明に係る「パーキンソン病」には、いわゆるパーキンソン病(孤発性パーキンソン病)の他にも、若年性パーキンソニズム、家族性(遺伝性)パーキンソニズム、線条体黒質変性症(多系統萎縮症)などが包含される。

【0027】

本実施形態におけるパーキンソン病検出用バイオマーカーは、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンからなる。以降、本明細書では、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを、「Ser65リン酸化ユビキチン」と記載する。

【0028】

本実施形態における「Ser65リン酸化ユビキチン」には、特定のアミノ酸配列(配列番号1)からなるユビキチンだけでなく、リン酸化された65番目のセリン残基が保存されていることを限度として、配列番号1のアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなるユビキチンが包含され得る。ここで、「1~数個」とは、好ましくは「1~3個」、「1または2個」、または「1個」である。

【0029】

また、本実施形態における「Ser65リン酸化ユビキチン」には、リン酸化された65番目のセリン残基が保存され、かつ、配列番号1からなるユビキチンと同等の生理機能が維持されていることを限度として、配列番号1と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるユビキチンが包含され得る。アミノ酸配列の同一性は、好ましくは、約90%以上、95%以上、96%以上、97%以上であり、特に好ましくは、98%以上または99%以上である。アミノ酸配列の同一性は、配列解析ソフトウェアを用いて、または、当分野で慣用のプログラム(FASTA、BLASTなど)を用いて決定することができる。

【0030】

本実施形態のパーキンソン病検出用バイオマーカーは、正常(パーキンソン病に罹患していない)被験者においては、ミトコンドリア異常に伴って産生され、その後消失するが、パーキンソン病患者においては、PINK1の機能喪失のために産生されないか、Parkinの機能喪失やミトコンドリアストレスの亢進によって、その濃度が上昇すると予想される。すなわち、本実施形態のパーキンソン病検出用バイオマーカーは、パーキンソン病に罹患していない被験者の正常値と比較して逸脱(減少または増加)を指標とすることにより、パーキンソン病を早期かつ特異的に検出することができる。

【0031】

10

20

30

40

50

本発明は、一実施形態によれば、被験者から単離された試料について、Ser 65リン酸化ユビキチンからなるパーキンソン病検出用バイオマーカーを検出または定量するステップを含む、パーキンソン病の検査方法である。

【0032】

本実施形態において「検査」とは、Ser 65リン酸化ユビキチンからなるパーキンソン病検出用バイオマーカーを指標として、数値的に定量またはその有無を検出することを意味する。この検査結果に基づけば、医師は、被験者がパーキンソン病に罹患しているか否かを判定・診断し、適切な治療方針を決定し得る。

【0033】

本実施形態において「被験者」とは、パーキンソン病に罹患し得る動物個体である。動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、非ヒト霊長類、ヒトなどの哺乳動物が挙げられ、好ましくはヒトである。

10

【0034】

本実施形態における「試料」は、被験者から採取し得る生体試料であり、例えば被験者由来の組織、細胞または体液などであってよいが、特に限定されない。組織試料または細胞試料としては、例えば、脳、心筋、骨格筋などが挙げられる。体液試料としては、例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液などが挙げられる。試料は、当業者に周知の方法により被験者から得ることができる。

【0035】

本実施形態において、Ser 65リン酸化ユビキチンの検出または定量は、当分野において周知の方法により行うことができ、例えば、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、イムノプロットティング、免疫沈降、免疫組織化学的染色法などの免疫学的手法や、液体クロマトグラフィー、質量分析などの手法により行うことができる。好ましい検出または定量方法は、免疫学的手法である。免疫学的手法によるSer 65リン酸化ユビキチンの検出または定量は、例えば、Ser 65リン酸化ユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体を用いて行うことができる。

20

【0036】

Ser 65リン酸化ユビキチンの検出または定量を質量分析により行う場合には、試料から精製されたユビキチンをトリプシンやエンドプロテイナーゼLys - Cなどのプロテアーゼにより切断し、例えば、前駆イオンの m/z (Precursor m/z) が574.297、荷電状態(charge state)が+2であるペプチド断片：E(pS)TLHLVLR(リン酸化ユビキチンの64~72番目のアミノ酸に相当)に由来するシグナルを検出する。また、その際に、前駆イオンの m/z が534.314、荷電状態が+2であるペプチド断片：ESTLHLVLR(リン酸化されていないユビキチンの64~72番目のアミノ酸に相当)に由来するシグナルを、陽性対照として検出することができる。

30

【0037】

本実施形態のパーキンソン病の検査方法は、上記検出または定量の結果を、パーキンソン病に罹患していない対照由来の試料(正常対照試料)について予め決定されたバイオマーカープロファイルと比較するステップをさらに含んでもよい。この比較の結果に基づいて、被験者由来の試料におけるパーキンソン病検出用バイオマーカーが正常値から有意に逸脱していることが示された場合、被験者がパーキンソン病に罹患している可能性があることが判定される。その意味で、本実施形態によるパーキンソン病の検査方法は、被験者がパーキンソン病に罹患しているかどうかを評価判別する方法、すなわち診断方法であり得る。また、検出または定量の結果を、例えば治療薬の投与の前後において同一人について比較し、治療効果を判断することもできる。

40

【0038】

本実施形態のパーキンソン病の検査方法は、パーキンソン病の早期かつ特異的な検出を可能とするものであり、極めて有用である。

【0039】

50

本発明は、一実施形態によれば、Ser 65リン酸化ユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体である。以降、本明細書では、Ser 65リン酸化ユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体を、「抗Ser 65リン酸化ユビキチン抗体」と記載する。

【0040】

本実施形態における「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または、Fab、F(ab')₂、scFvなどの抗体断片であってよい。これらの抗体の作製方法は、当分野において周知の方法により作製することができる。本実施形態における抗体は、好ましくは、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。

【0041】

具体的には、本実施形態における抗体がポリクローナル抗体である場合には、Ser 65リン酸化ユビキチンまたはその部分ペプチド(リン酸化Ser 65を含み、長さが6~30アミノ酸、好ましくは9~25アミノ酸の断片)を抗原とし、抗原をラット、ウサギ、モルモット、ヤギなどの哺乳動物に免疫する。その後、前記動物の血清を回収して精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

【0042】

また、本実施形態における抗体がモノクローナル抗体である場合には、上記と同様の手順により作製した免疫感作動物から抗体産生細胞を回収し、前記抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製する。その後、抗原に対して高い特異的親和性を示す抗体を産生するハイブリドーマクローンを選択し、選択されたクローンの培養液を回収して精製することによりモノクローナル抗体を取得することができる。

【0043】

キメラ抗体は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、可変領域がヒト以外の動物のイムノグロブリン由来であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来である抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ウサギなど、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものを用いてもよい。キメラ抗体は、当分野において周知の方法により作製することができる。

【0044】

ヒト化抗体(ヒト型CDR移植抗体)は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部がヒト以外の動物のモノクローナル抗体に由来するものであり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来である抗体を意味する。ヒト化抗体は、当分野において周知の方法により作製することができる。

【0045】

Fab、F(ab')₂、scFvなどの抗体断片は、上述した抗体の抗原結合領域を含む部分または当該領域から誘導された部分である。抗体断片は、当分野において周知の方法により作製することができる。

【0046】

本実施形態の抗Ser 65リン酸化ユビキチン抗体は、細胞内または組織内のSer 65リン酸化ユビキチンの検出または定量に使用することができる。

【0047】

本実施形態の抗Ser 65リン酸化ユビキチン抗体は、任意の標識物質を結合させることにより、パーキンソン病の検査用試薬とすることもできる。ここでいう任意の標識物質とは、当該分野で公知のあらゆる核酸用標識物質であってよく、例えば、ビオチン、蛍光色素、発光物質、放射性同位元素、酵素などが挙げられる。また、Ser 65リン酸化ユビキチン検出試薬は、更に必要に応じて、容器、緩衝液、陽性対照、陰性対照、検査プロトコールなどの付加的な要素と組み合わせることにより、パーキンソン病の検査用キットとすることもできる。

【0048】

本発明の第二の局面は、パーキンソン病の治療または予防に関する。この局面では、パ

10

20

30

40

50

ーキンソン病の治療薬または予防薬が提供される。

【0049】

すなわち、本発明は、一実施形態によれば、Ser 65リン酸化ユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬である。Ser 65リン酸化ユビキチンは、Parkinを活性化し、ミトファジーを正常化することにより、パーキンソン病を根本的に治療または予防することができる。

【0050】

本発明において、「治療」とは、パーキンソン病を完全に治癒することのみならず、パーキンソン病の症状を寛解させる、状態を緩和する、または、病態の進行を遅らせるもしくは停止させることをも含む。

【0051】

本実施形態におけるSer 65リン酸化ユビキチンには、特定のアミノ酸配列（配列番号1）からなるユビキチンだけでなく、リン酸化された65番目のセリン残基が保存されていることを限度として、配列番号1のアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなるユビキチンが包含され得る。ここで、「1～数個」とは、好ましくは「1～3個」、「1または2個」、または「1個」である。

【0052】

また、本実施形態における「Ser 65リン酸化ユビキチン」には、リン酸化された65番目のセリン残基が保存され、かつ、配列番号1からなるユビキチンと同等の生理機能が維持されていることを限度として、配列番号1と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるユビキチンが包含され得る。アミノ酸配列の同一性は、好ましくは、約90%以上、95%以上、96%以上、97%以上であり、特に好ましくは、98%以上または99%以上である。アミノ酸配列の同一性は、配列解析ソフトウェアを用いて、または、当分野で慣用のプログラム（FASTA、BLASTなど）を用いて決定することができる。

【0053】

本実施形態におけるSer 65リン酸化ユビキチンは、遺伝子工学的手法による生合成や、化学合成により製造することができる。

【0054】

遺伝子工学的手法により生合成する場合には、例えば、ユビキチンをコードするDNAを含む発現ベクターにより宿主細胞を形質転換することによってユビキチンを発現させ、ユビキチンを精製した後、リン酸化を行うことにより、Ser 65リン酸化ユビキチンを製造することができる。

【0055】

ユビキチンを発現させる宿主細胞としては、例えば、菌、酵母、哺乳動物細胞などを使用することができる。好ましくは、BL21(DE3)やRosetta(DE3)などの大腸菌や、HeLa細胞、CHO細胞、COS7細胞などのヒト由来の細胞を宿主細胞として用いることができる。発現ベクターとしては、大腸菌を宿主細胞とする場合には、例えば、pT7（シグマ・アルドリッチ社製）やpET（メルクミリポア社製）などの大腸菌発現プラスミドを用いることができ、哺乳動物細胞を宿主細胞とする場合には、例えば、pcDNA3.1（インビトロジェン社製）などの動物細胞発現プラスミドや、レトロウイルスやアデノウイルスなどの動物ウイルスベクターなどを用いることができる。形質転換は、リン酸カルシウム共沈殿法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法などの周知の方法により行うことができる。

【0056】

ユビキチンのリン酸化は、宿主細胞から単離精製されたユビキチンを、膜電位を低下させることによりPINK1を蓄積させたミトコンドリア、PINK1を含有する免疫沈降産物、またはPINK1と反応させることにより行うことができる。前記反応は、マグネシウムなどの2価イオンおよびATPなどのリン酸供与体を含有するバッファー中で行う

10

20

30

40

50

ことができる。

【0057】

化学合成により製造する場合には、例えば、ペプチド合成機によりユビキチンを合成した後、リン酸化修飾を行うことにより、Ser65リン酸化ユビキチンを製造することができる。化学合成を実施するための操作は、全て公知の方法により行うことができる。

【0058】

本実施形態におけるSer65リン酸化ユビキチンは、カルボキシル末端に細胞膜透過性ペプチドが融合されたものであってもよい。細胞膜透過性ペプチドを融合させたSer65リン酸化ユビキチンは、細胞内に効率よく送達されることができ、好ましい。細胞膜透過性ペプチドとは、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸を多く含み、細胞膜を透過する性質を有するペプチドである。本実施形態における細胞膜透過性ペプチドには、特に限定されないが、例えば、HIV-1 Tat、HIV-1 Rev、BMV-gag、HTLV-1 IIRexなどが挙げられる。

10

【0059】

本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬は、Ser65リン酸化ユビキチンを有効成分として含有する。この治療薬または予防薬は、有効成分のみから構成されていてもよいが、さらに任意の成分として、薬学的に許容される公知の希釈液、担体、賦形剤などを含んでもよい。

【0060】

本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬を製造するためには、Ser65リン酸化ユビキチンを、必要に応じて上記公知の希釈液、担体、賦形剤などと組み合わせて製剤化すればよい。パーキンソン病の治療薬または予防薬において、有効成分であるSer65リン酸化ユビキチンは、各形態に応じた範囲で適切な投与量となるように含有されればよい。Ser65リン酸化ユビキチンは、その投与量が、通常成人1日当たり0.001mg/kg(体重)以上、好ましくは0.01mg/kg(体重)以上となるように、薬剤中の含有量が決定されることが好ましいが、かかる範囲には限定されず、患者の症状、年齢、性別などにより適宜調整されることが可能である。投与量の上限は、1日当たり、10mg/kg(体重)以下が好ましく、1mg/kg(体重)以下がより好ましい。

20

【0061】

本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬は、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤、直腸投与剤などに製剤化してもよい。従って、本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬は、経口、腹腔内、皮内、静脈内、筋肉内などの投与を含む、種々の方法により達成することができる。

30

【0062】

パーキンソン病の治療薬または予防薬の経口用製剤は、例えば、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤などの固形剤とすることができる。この場合には、適切な添加物、例えば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩などの添加剤や、さらに所望により結合剤、崩壊剤、潤沢剤、着色剤、香料などを配合することができる。または、パーキンソン病の治療薬または予防薬の経口用製剤は、例えばシロップ剤などの液剤とすることができ、この場合には、滅菌水、生理食塩水、エタノールなどを担体として使用し得る。さらに所望により、懸濁剤などの補助剤、甘味剤、風味剤、防腐剤などを添加してもよい。

40

【0063】

パーキンソン病の治療薬または予防薬の非経口製剤は、例えば、注射剤や直腸投与剤などの液剤とすることができる。この場合には、定法に従って、有効成分であるSer65リン酸化ユビキチンを、注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどに溶解ないし懸濁させ、さらに必要に応じて、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えることにより調製することができる。また、固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して調

50

製することもできる。

【0064】

本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬は、パーキンソン病の根本的な治療または予防に有用である。

【0065】

また、本発明は、一実施形態によれば、65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬である。65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチンは、Ser65リン酸化ユビキチンと同様にParkinを活性化し、ミトファジーを正常化することにより、パーキンソン病を根本的に治療または予防することができる。以降、本明細書では、65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチンを、「Ser65Aspリン酸化模倣型ユビキチン」と記載する。

10

【0066】

本実施形態におけるSer65Aspリン酸化模倣型ユビキチンには、特定のアミノ酸配列（配列番号2）からなるユビキチンだけでなく、65番目のアスパラギン酸残基が保存されていることを限度として、配列番号2のアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなるユビキチンが包含され得る。ここで、「1～数個」とは、好ましくは「1～3個」、「1または2個」、または「1個」である。

【0067】

また、本実施形態における「Ser65Aspリン酸化模倣型ユビキチン」には、65番目のアスパラギン酸残基が保存され、かつ、Ser65リン酸化ユビキチンと同等の生理機能が維持されていることを限度として、配列番号2と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるユビキチンが包含され得る。アミノ酸配列の同一性は、好ましくは、約90%以上、95%以上、96%以上、97%以上であり、特に好ましくは、98%以上または99%以上である。アミノ酸配列の同一性は、配列解析ソフトウェアを用いて、または、当分野で慣用のプログラム（FASTA、BLASTなど）を用いて決定することができる。

20

【0068】

本実施形態におけるSer65Aspリン酸化模倣型ユビキチンは、上記のSer65リン酸化ユビキチンと同様に、遺伝子工学的手法による生合成や、化学合成により製造することができる。

30

【0069】

本実施形態におけるSer65Aspリン酸化模倣型ユビキチンは、上記のSer65リン酸化ユビキチンと同様に、カルボキシル末端に細胞膜透過性ペプチドが融合されたものであってもよい。

【0070】

本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬は、Ser65Aspリン酸化模倣型ユビキチンを有効成分として含有する。この治療薬または予防薬は、有効成分のみから構成されていてもよいが、さらに任意の成分として、薬学的に許容される公知の希釈液、担体、賦形剤などを含んでもよい。

40

【0071】

本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬は、上記のSer65リン酸化ユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬と同様にして製剤化されることができる。

【0072】

本実施形態によるパーキンソン病の治療薬または予防薬は、パーキンソン病の根本的な治療または予防に有用である。

【0073】

本発明の第三の局面は、パーキンソン病の新規治療薬または新規予防薬の開発に関する

50

。この局面では、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法が提供される。

【0074】

本発明は、一実施形態によれば、(1) P I N K 1 を発現する細胞を提供するステップと、(2) 前記細胞中のミトコンドリアを傷害するステップと、(3) 前記細胞に候補化合物を接触させるステップと、(4) 前記細胞において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップとを含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法である。本実施形態の方法は、ユビキチンのSer 65のリン酸化を促進する化合物を、パーキンソン病の治療薬または予防薬に有効な物質として取得できるものである。

10

【0075】

本実施形態のスクリーニング方法は、P I N K 1 を発現する細胞を調製して使用する。以降、本明細書では、P I N K 1 を発現する生細胞を、「P I N K 1 発現細胞」と記載する。

【0076】

本実施形態におけるP I N K 1 発現細胞には、動物個体から採取された細胞を用いることができる。動物個体由来の細胞は、P I N K 1 を発現する組織、例えば、脳や筋肉などの組織から、当業者に周知の方法により採取することができる。動物個体は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、非ヒト霊長類、ヒトなどであり、好ましくはヒトである。

20

【0077】

本実施形態におけるP I N K 1 発現細胞には、P I N K 1 を発現する哺乳動物細胞株を用いてもよい。哺乳動物細胞株としては、例えば、He L a 細胞、C H O 細胞、C O S 7 細胞などのヒト由来の細胞株を用いることが好ましい。

【0078】

次いで、P I N K 1 発現細胞中のミトコンドリアを傷害する。ミトコンドリアの傷害は、従来公知の方法により行うことができ、例えば、C C C P 処理、ロテノン処理、パラコート処理、M P T P 処理などによってミトコンドリアを傷害することができる。

【0079】

次いで、ミトコンドリアが傷害されたP I N K 1 発現細胞に、候補化合物を接触させる。候補化合物には、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、非ペプチド性化合物、合成化合物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

30

【0080】

上記細胞と候補化合物との接触は、例えば、P I N K 1 発現細胞を培養する培地や、リン酸緩衝生理食塩水やトリス塩酸緩衝液などの各種緩衝液に対して候補化合物を添加し、その中で一定時間細胞をインキュベートすることにより行うことができる。添加される候補化合物の濃度は、化合物の種類により異なるが、例えば、0.1 n M ~ 100 n M の範囲で適宜選択することができる。インキュベートは、好ましくは、10分~24時間行うことができる。

【0081】

次いで、前記細胞におけるSer 65リン酸化ユビキチン量を測定する。Ser 65リン酸化ユビキチン量は、上記パーキンソン病の検査方法におけるSer 65リン酸化ユビキチンの検出または定量と同様に、例えば、抗Ser 65リン酸化ユビキチン抗体を用いたE L I S A、免疫組織化学染色、イムノプロットなどの各種免疫学的手法や、質量分析などの手法により行うことができる。

40

【0082】

本実施形態のスクリーニング方法において、細胞におけるSer 65リン酸化ユビキチンが、候補化合物との接触前と比較して有意に増加した場合は、当該候補化合物は、パーキンソン病の治療薬または予防薬として有望であると評価することができる。一方、細胞におけるSer 65リン酸化ユビキチンが、候補化合物との接触前と同等量またはそれ以

50

下の量しか検出されない場合は、当該候補化合物は、パーキンソン病の治療薬または予防薬として有望ではないと評価することができる。

【0083】

また、本発明は、一実施形態によれば、(1)ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを含有するリン酸化反応溶液を調製するステップと、(2)前記リン酸化反応溶液に候補化合物を添加するステップと、(3)前記リン酸化反応溶液において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップとを含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法である。本実施形態の方法は、ユビキチンのSer65のリン酸化を促進する化合物を、パーキンソン病の治療薬または予防薬に有効な物質として取得できるものである。

10

【0084】

本実施形態のスクリーニング方法は、ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを含有するリン酸化反応溶液を使用する無細胞系アッセイである。本実施形態におけるリン酸化反応溶液としては、生細胞から調製した細胞抽出液を用いてもよいし、ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを混合して調製した人工的な反応溶液を用いてもよい。本実施形態の好ましいリン酸化反応溶液は、細胞抽出液である。

【0085】

リン酸化反応溶液として、細胞抽出液を用いる場合には、細胞抽出液は、上記のPINK1発現細胞から調製されたものであってもよいし、PINK1を発現しない細胞から調製されたものであってもよい。

20

【0086】

本実施形態における「PINK1を発現しない細胞」には、PINK1を全く発現しない細胞のみならず、PINK1を実質的に発現しない細胞も含まれる。PINK1を実質的に発現しない細胞とは、通常行われる遺伝子発現の検出手段(ノーザンブロット法など)によって、PINK1遺伝子の発現を検出することができない細胞を意味する。PINK1を実質的に発現しない細胞には、例えば、動物個体においてPINK1を実質的に発現しない組織、例えば、肺、脾臓、胸腺、白血球などから、当業者に周知の方法により採取することができる。動物個体は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、非ヒト霊長類、ヒトなどであり、好ましくはヒトである。PINK1を全く発現しない細胞は、PINK1-ノックアウト動物から採取されたものであってもよく、例えば、PINK1-ノックアウトマウスの胎児線維芽細胞(MEFs)などであってよい。

30

【0087】

本実施形態における細胞抽出液は、細胞を物理的に破碎する方法や、CHAPSなどの界面活性剤により溶解する方法など、従来公知の方法により調製することができる。本実施形態における細胞抽出液は、好ましくは、細胞を物理的に破碎して調製する。

【0088】

リン酸化反応溶液として、ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを混合して調製した反応溶液を用いる場合には、キナーゼによるリン酸化反応に適した反応バッファー中に、ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを混合することにより調製することができる。反応バッファーには、例えば、 Mg^{2+} または Mn^{2+} を含有するトリス塩酸バッファーなどを使用することができる。リン酸化反応溶液における各成分の組成は、細胞から調製した細胞抽出液の組成に準じて適切に決定することができる。

40

【0089】

本実施形態におけるユビキチンは、任意の真核生物由来のものであってもよいが、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、非ヒト霊長類、ヒトなどの哺乳動物由来のものであり、特に好ましくはヒト由来のユビキチンである。本実施形態におけるユビキチンは、上記のSer65リン酸化ユビキチンと同様に、遺伝子工学的手法による生合成や、化学合成により調製することができる。

【0090】

本実施形態におけるキナーゼには、PINK1の他にも、ERK1/2、ERK5、E

50

R K 7、J N K / S A P K、p 3 8 などの M A P キナーゼや、プロテインキナーゼ A (P K A)、プロテインキナーゼ C (P K C)、C a M キナーゼ、M o s / R a f キナーゼ、c d c 2 などの任意の S e r / T h r キナーゼを使用することができる。好ましくは、本実施形態におけるキナーゼは、P I N K 1 である。本実施形態におけるキナーゼは、任意の真核生物由来のものであってよいが、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、非ヒト霊長類、ヒトなどの哺乳動物由来のものであり、特に好ましくはヒト由来のキナーゼである。本実施形態におけるキナーゼは、遺伝子工学的的手法による生合成により調製することができる。

【0091】

本実施形態におけるリン酸供与体には、例えば、A T P、C T P、G T P、T T P、U T P、d A T P、d C T P、d G T P、d T T P、d U T P などを使用することができる。本実施形態における好ましいリン酸供与体は、A T P または G T P である。

10

【0092】

次いで、リン酸化反応溶液に、候補化合物を添加する。候補化合物には、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、非ペプチド性化合物、合成化合物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。添加される候補化合物の濃度は、化合物の種類により異なるが、例えば、0 . 1 n M ~ 1 0 0 n M の範囲で適宜選択することができる。リン酸化反応は、好ましくは、1 0 分 ~ 2 4 時間行うことができる。

【0093】

次いで、前記細胞における S e r 6 5 リン酸化ユビキチン量を測定する。S e r 6 5 リン酸化ユビキチン量は、上記パーキンソン病の検査方法における S e r 6 5 リン酸化ユビキチンの検出または定量と同様に、例えば、抗 S e r 6 5 リン酸化ユビキチン抗体を用いた E L I S A、免疫組織化学染色、イムノブロットなどの各種免疫学的手法や、質量分析などの手法により行うことができる。

20

【0094】

本実施形態のスクリーニング方法において、リン酸化反応溶液中の S e r 6 5 リン酸化ユビキチンが、候補化合物の添加前と比較して有意に増加した場合は、当該候補化合物は、パーキンソン病の治療薬または予防薬として有望であると評価することができる。一方、リン酸化反応溶液中の S e r 6 5 リン酸化ユビキチンが、候補化合物の添加前と同等量またはそれ以下の量しか検出されない場合は、当該候補化合物は、パーキンソン病の治療薬または予防薬として有望ではないと評価することができる。

30

【実施例】

【0095】

以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本発明を何ら限定するものではない。

【0096】

< 実施例 1 : ミトコンドリア膜電位の消失に応じてユビキチンがリン酸化される >

1 - 1 . C C C P 処理細胞におけるユビキチンのリン酸化

H e L a 細胞は、1 x 非必須アミノ酸 (ライフテック社製)、1 x ビルビン酸ナトリウム (ライフテック社製) および 1 0 % ウシ血清 (ライフテック社製) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) (シグマ・アルドリッチ社製) 中で、5 % C O ₂、3 7 ° C にて培養した。H e L a 細胞を、1 5 ~ 3 0 μ M の C C C P (和光純薬社製) により 3 時間処理した後、細胞抽出用バッファー (2 0 m M の T r i s - H C l (p H 7 . 5)、1 5 0 m M の N a C l、1 m M の E D T A、1 % の N P - 4 0) 中に懸濁し、細胞溶解物を調整した。また、C C C P 処理を行わずに、それ以外同様の手順により調製した細胞溶解物を陰性対照とした。

40

【0097】

得られた細胞溶解物は、5 0 μ M の P h o s - t a g アクリルアミド (和光純薬社製) および 1 0 0 μ M の M n C l ₂ を含有する 1 2 . 5 - 1 5 % のポリアクリルアミドゲルに

50

供され、電気泳動された。また、対照として、Phos-tagを含有しないポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、0.01%のSDSおよび1mMのEDTAを含有する転写バッファー中で10分間洗浄した後、EDTAを含有しない0.01%SDS転写バッファー中で10分間インキュベートした。その後、PVD膜に転写し、抗ユビキチン抗体P4D1（セルシグナリングテクノロジー社製）（1:1000）を一次抗体として、ヤギ抗マウスIgG-AP抗体（サンタクルズバイオテクノロジー社製）（1:10000）を二次抗体として用いて、イムノプロットを行った。検出は、BCIP/NBT試薬（ナカライテスク社製）により行った。

【0098】

結果を図1に示す。図1左は、Phos-tagを含有しないポリアクリルアミドゲルにより電気泳動を行った結果であり、図1右は、Phos-tagを含有するポリアクリルアミドゲルにより電気泳動を行った結果である。CCC P処理を行った細胞溶解物をPhos-tag含有ゲルで泳動したのものには、泳動の遅れたバンド（図中、記号「*」により表示）が確認された。この結果から、CCC P処理を行った細胞では、ユビキチンがリン酸化されていることが示唆された。

【0099】

1-2. 無細胞系におけるユビキチンのリン酸化

ミトコンドリアの膜電位消失によってユビキチンのリン酸化が起こることを確認するために、無細胞系におけるユビキチンのリン酸化アッセイを行った。HeLa細胞を、上記1-1と同様の手順によりCCC P処理した後、EDTAフリープロテアーゼインヒビターカクテル（ロシュ・ダイアグノスティクス社製）を添加した無細胞系アッセイ用バッファー（20mMのHEPES-KOH（pH7.5）、220mMのソルビトール、10mMのKAc、70mMのスクロース）中に懸濁した。細胞懸濁液を、25ゲージの注射針に30回通過させることにより細胞を破碎し、細胞ホモジネート液を得た。次いで、細胞ホモジネート液を、4、800×gにて10分間遠心分離し、核除去後上清を回収した。核除去後上清を、4、10,000×gにて20分間さらに遠心分離し、ミトコンドリアペレットを回収した。

【0100】

ミトコンドリアを、5mMのMgCl₂、5mMのATP、2mMのDTTおよび1%のグリセロールを添加した無細胞系アッセイ用バッファーにより調製された、終濃度40ng/μLのユビキチン（ボストンバイオケム社製）、HA-ユビキチン（ボストンバイオケム社製）、またはHis₆-ユビキチン（ボストンバイオケム社製）中で、30で1時間インキュベートした。その後、4、16,000×gにて10分間遠心分離し、ミトコンドリアを除去した。得られた上清について、上記1-1と同様の手順により、Phos-tagアッセイを行った。また、CCC P処理を行わずに調製したものを陰性対照とした。イムノプロットは、抗ユビキチン抗体（ダコジャパン社製）（1:500）を一次抗体として、ヤギ抗ウサギIgG-AP抗体（サンタクルズバイオテクノロジー社製）（1:5000）を二次抗体として用いて行った。検出は、BCIP/NBT試薬（ナカライテスク社製）により行った。

【0101】

結果を図2に示す。CCC P処理を行った細胞から単離したミトコンドリアと反応させたユビキチンはリン酸化されたのに対し（図2右、レーン8、「pUb」と表示されたバンド）、CCC P処理を行わなかった細胞から単離したミトコンドリアと反応させたユビキチンにはリン酸化は見られなかった（図2右、レーン7）。なお、図2中、記号「*」により表示されたバンドは、抗体の交差反応による。この結果から、ミトコンドリアの膜電位消失に応じてユビキチンのリン酸化が起こることが示された。また、ユビキチンのN末端にHAタグまたはHis₆タグを付加しても、ユビキチンのリン酸化は阻害されないことを確認した（図2右、レーン10および12）。

【0102】

<実施例2：ユビキチンのリン酸化部位は65番目のセリン残基である>

2 - 1 . 質量分析法によるユビキチンのリン酸化部位の解析

ユビキチンのリン酸化部位を特定するために、液体クロマトグラフタンデム型質量分析法 (LC - MS / MS) による解析を行った。ユビキチンは、上記 1 - 2 と同様にして C C C P 処理を行ったミトコンドリアと無細胞系において反応させた後、S D S - P A G E に供された。泳動後、ゲルを C C B 染色によりバンドを検出した。ゲルを超純水により洗浄後、目的のバンドを切り出した。切り出されたゲル片を、 1 mm^2 の小片に切り刻み、 1 mL の 50 mM の重炭酸アンモニウム / 50% のアセトニトリル (ACN) 中で 1 時間攪拌し、脱水した。その後、 100% ACN によりゲル小片を完全に脱水した。 50 mM の重炭酸アンモニウム / 5% の ACN (pH 8.0) を用いて $20 \text{ ng} / \mu \text{L}$ に調製されたシーケンシンググレード改変トリプシン (プロメガ社製) をゲル小片に加え、37

10

【0103】

消化反応後、 $50 \mu \text{L}$ の 50% ACN / 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を添加し、1 時間振盪することにより、断片化ペプチドの抽出を行った。抽出液を別のチューブに回収した後、さらに残ったゲル小片に対して $50 \mu \text{L}$ の 70% ACN / 0.1% TFA を加え、30 分間振盪することにより、追加の抽出を行った。回収された抽出液は、Speed Vac (アイラ社製) により、 $20 \mu \text{L}$ に濃縮された。濃縮された断片化ペプチドに $20 \mu \text{L}$ の 0.1% TFA を加え、LC - MS / MS 用サンプルとした。LC - MS / MS には、ナノフロー U H P L C 装置として Easy - n L C 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、Q - E x a c t i v e 質量分析計 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) およびを、解析ソフトウェアとして X c a l i b u r (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を使用した。断片化ペプチドのスペクトルは、M A S C O T 検索エンジンにより、UniProt データベースにて検索した。

20

【0104】

結果を図 3 に示す。C C C P 処理を行った細胞から単離したミトコンドリアと反応させたユビキチン由来のペプチド断片について解析した結果、ユビキチンの 55 ~ 72 番目のアミノ酸に相当するペプチド断片における 65 番目のセリンのリン酸化が確認された (T L S D Y N I Q K E (p S) T L H L V L R)。さらに、ユビキチンの 64 ~ 72 番目のアミノ酸に相当するペプチド断片における 65 番目のセリンのリン酸化 (E (p S) T L H L V L R) も確認された。上記のリン酸化ペプチド断片は、C C C P 処理を行わなかった細胞から単離したミトコンドリアと反応させた対照からは検出されなかった。これらの結果から、ユビキチンの 65 番目のセリン残基 (Ser 65) がリン酸化部位であることが示された。

30

【0105】

2 - 2 . 無細胞系におけるユビキチンのリン酸化部位の解析

ミトコンドリア膜電位の消失に応じてユビキチンの Ser 65 がリン酸化されることをさらに確認するために、Ser 65 に変異を導入した組換えユビキチンを用いて、上記 1 - 2 と同様の手順により、Phos - tag アッセイを行った。組換えユビキチンとして、Ser 65 をアラニンに置換したもの (S 65 A) と、Ser 65 をアスパラギン酸に置換したもの (S 65 D) を用い、対照として野生型 (WT) を用いた。

40

【0106】

組換えユビキチンおよび野生型ユビキチンは、以下の手順により調製した。N 末端に His₆ タグ配列を付加した上記変異型または野生型ユビキチンをコードする DNA を組み込んだ p T 7 ベクター (シグマ・アルドリッチ社製) により、大腸菌 Rosetta 2 (DE3) (ノバジェン社製) を形質転換した。得られた形質転換体は、 $100 \mu \text{g} / \text{mL}$ のアンピシリンおよび $24 \mu \text{g} / \text{mL}$ のクロラムフェニコールを添加した LB 培地 20 mL 中で 37 にて一晩前培養し、その後 200 mL の培地に移した。37 で 2 時間のインキュベーション後、終濃度 1 mM の IPTG を添加し、さらに 6 時間の培養を行った。回収した菌体を、 20 mM の Tris - HCl (pH 7.5) 40 mL に懸濁し、超音波処理により破砕した。8,000 rpm にて 10 分間遠心分離後、上清を回収し、通常の

50

方法により精製し、バッファー A (50 mM の Tris - HCl (pH 7.5) / 100 mM の NaCl / 10% グリセロール) に対して透析した。

【0107】

結果を図 4 に示す。Ser 65 を有する野生型のユビキチンはリン酸化された一方 (図 4 右、レーン 2)、Ser 65 が置換された組換えユビキチンには、いずれもリン酸化が見られなかった (図 4 右、レーン 4 および 6)。この結果から、ユビキチンの Ser 65 がリン酸化部位であることが確認された。

【0108】

2 - 3 . C C C P 処理細胞におけるユビキチンのリン酸化部位の解析

上記 1 - 1 と同様の手順により、C C C P 処理を行った HeLa 細胞の抽出液について、Phos-tag アッセイを行った。S65A 組換えユビキチンおよび WT ユビキチンは、それぞれをコードする DNA を p c DNA 3 ベクター (インビトロジェン社製) に挿入したものを、FuGENE 6 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) を用いて HeLa 細胞に導入することにより発現させた。

【0109】

結果を図 5 に示す。細胞内においても、野生型のユビキチンはリン酸化された一方 (図 5 右、レーン 2)、S65A 組換えユビキチンはリン酸化されなかった (図 5 右、レーン 4)。この結果からも、ユビキチンの Ser 65 がリン酸化部位であることが確認された。

【0110】

< 実施例 3 : PINK1 がユビキチンをリン酸化する >

3 - 1 . PINK1^{-/-} 細胞におけるユビキチンのリン酸化

PINK1 はキナーゼであり、ミトコンドリア膜電位の消失に応じて活性化されることが知られていることから、ユビキチンをリン酸化する酵素は PINK1 である可能性が考えられる。この仮説を検証するために、PINK1^{-/-} ノックアウトマウスの胎児線維芽細胞 (MEFs) を用いて、無細胞系におけるリン酸化試験を行った。

【0111】

PINK1^{-/-} の MEFs は、PINK1^{-/-} マウスの胎児から調製されたものを、Jie Shen 博士 (ハーバード大学) より分与していただいた。野生型 PINK1、キナーゼ活性欠失 (KD) 変異 PINK1、A168P 変異 PINK1 または G386A 変異 PINK1 は、それぞれをコードする遺伝子を pMX-puro ベクター (コスモバイオ社製) を用いてレトロウイルスにパッケージした。得られたレトロウイルスを、PINK1^{-/-} の MEFs に感染させることにより、野生型 PINK1 または変異 PINK1 発現細胞を作製した。それ以外は上記 1 - 2 と同様の手順により、Phos-tag アッセイを行った。

【0112】

結果を図 6 に示す。C C C P 処理した PINK1^{-/-} の MEFs から単離されたミトコンドリアはユビキチンのリン酸化を誘導しないが (図 6 右、レーン 2)、野生型 PINK1 を導入した PINK1^{-/-} の MEFs から単離されたミトコンドリアは、C C C P 処理依存的にユビキチンのリン酸化が見られた (図 6 右、レーン 4)。一方、キナーゼ活性を持たない変異 PINK1 を導入した PINK1^{-/-} の MEFs から単離されたミトコンドリアは、いずれもユビキチンをリン酸化しなかった (図 6 右、レーン 6、8 および 10)。この結果から、ユビキチンのリン酸化は PINK1 によるものであることが示された。

【0113】

3 - 2 . C C C P 処理細胞から単離された PINK1 によるユビキチンのリン酸化

PINK1 がユビキチンをリン酸化するものであることをさらに確認するために、C C C P 処理した細胞から PINK1 を単離し、ユビキチンをリン酸化するかどうかを試験した。マウスレトロウイルス受容体である mCAT1 を一過性発現させた HeLa 細胞に対し、上記 3 - 1 と同様の手順により、pMX-puro ベクター (コスモバイオ社製) を

10

20

30

40

50

用いてPINK1-3×Flag遺伝子を導入し、安定発現細胞を得た。細胞を、上記1-2と同様の手順により、無細胞系アッセイ用バッファー中に懸濁した。次いで、10mg/mLのジギトニンにより4で15分処理して細胞を可溶化した後、抗FLAG抗体2H8(トランスジェニック社製)をコンジュゲートさせたプロテインGセファロース4FastFlow(GEヘルスケア・ライフサイエンス社製)と4で1時間反応させ、免疫沈降を行った。反応後の免疫沈降物は、上記バッファーにより洗浄後、遠心分離により回収した。得られた免疫沈降物を、SDS-PAGE電気泳動後、上記1-1と同様にしてイムノブロットを行った。ミトコンドリアタンパク質の検出には、抗VDAC抗体ab2(カルピオケム社製)(1:1,000)、抗マイトフュージン2抗体ab56889(アブカム社製)(1:500)、抗FoF1-ATPase(上野博士より供与)(1:1,000)を使用した。

10

【0114】

結果を図7に示す。免疫沈降反応の結果、PINK1のみが単離され、他のミトコンドリアタンパク質(VDAC、マイトフュージン2、FoF1-ATPase)は除去されたことが示された(図7左)。

【0115】

次いで、ミトコンドリアに代えて単離PINK1を用いる以外は上記1-2と同様の手順により、Phos-tagアッセイを行った。また、ミトコンドリアを用いたものを対照とした。

【0116】

結果を図7に示す。CCC P処理細胞から単離されたPINK1は、CCC P処理細胞から単離されたミトコンドリアと同様にユビキチンをリン酸化することが示された(図7右、レーン4)。この結果から、PINK1がユビキチンをリン酸化していることが明確に示された。

20

【0117】

<実施例4:Ser65リン酸化ユビキチンはParkinの活性化因子である>

4-1.細胞内におけるリン酸化模倣型ユビキチンによるParkinの活性化(1)

PINK1が活性化されると、ParkinのE3酵素としての活性化とミトコンドリアへの移行が起こることが知られている。そこで、PINK1が活性化されてリン酸化されたユビキチンがどのような役割を果たしているのかを調べるために、リン酸化模倣型ユビキチンを用いてParkinを活性化することができるかどうかを試験した。

30

【0118】

リン酸化模倣型ユビキチンとしては、S65Dユビキチンを使用した。S65Dユビキチンは、S65DユビキチンをコードするDNAを挿入したpcDNA3ベクター(インビトロジェン社製)を、FuGENE6(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いてHeLa細胞に導入することにより発現させた。GFP-野生型Parkin(GFP-Parkin WT)またはGFP-組換えParkinも、同様にしてHeLa細胞に導入することにより発現させた。GFP-組換えParkinとして、E3酵素としての活性化とミトコンドリアへの移行に必須であるSer65のリン酸化を模倣したもの(GFP-Parkin S65E)と、部分的活性化型Parkinとして知られる403番目のシステイン残基をアラニンに置換したもの(GFP-Parkin W403A)を用いた。

40

【0119】

ParkinのE3酵素としての活性化は、Parkinの自己ユビキチン化に基づいて評価した。細胞内ユビキチン化アッセイは、GFP-ParkinまたはGFP-組換えParkinと、野生型ユビキチンまたはリン酸化模倣型ユビキチンとを含有するHeLa細胞の細胞質画分を、上記1-1の手順により単離して、イムノブロットすることにより行った。CCC P処理は、上記1-1と同様の手順により行った。

【0120】

結果を図8に示す。S65D組換えユビキチンは、CCC P処理不在下、すなわちPI

50

N K 1 が活性化されない条件下では、野生型 P a r k i n を活性化しなかった（図 8 左、レーン 3）。一方、S 6 5 E 組換え P a r k i n および W 4 0 3 A 組換え P a r k i n は、C C C P 処理不在下であっても、S 6 5 D 組換えユビキチンによって活性化されることが示された（図 8 中央、レーン 3 および図 8 右、レーン 3）。この結果から、リン酸化されたユビキチンが、P a r k i n の活性化因子であることが示唆された。

【 0 1 2 1 】

4 - 2 . 細胞内におけるリン酸化模倣型ユビキチンによる P a r k i n の活性化（ 2 ）

リン酸化されたユビキチンの P a r k i n 活性化における役割をさらに調べるために、ポリユビキチン鎖の形成に必要であるユビキチン C 末端のグリシン残基を欠失した組換えユビキチン（G G A A または G G V V）および組換えリン酸化模倣型ユビキチン（S 6 5 D G G A A または S 6 5 D G G V V）を用いて、上記 4 - 1 と同様の手順により、細胞内ユビキチン化アッセイを行った。

10

【 0 1 2 2 】

結果を図 9 に示す。C 末端のグリシン残基を欠失した S 6 5 D リン酸化模倣型ユビキチンも、C 末端のグリシン残基を有する S 6 5 D リン酸化模倣型ユビキチンと同様に、S 6 5 E 組換え P a r k i n および W 4 0 3 A 組換え P a r k i n を活性化することが示された（図 9、レーン 4 ~ 6）。この結果から、リン酸化されたユビキチンは、P a r k i n によって付加されるポリユビキチン鎖に使用されるのではなく、それとは独立のメカニズムにより、P a r k i n の活性化因子として機能するものであることが示唆された。

20

【 0 1 2 3 】

< 実施例 5 : ミトコンドリア上の基質タンパク質に付加されるユビキチンはリン酸化されていない >

5 - 1 . 多重蛍光免疫染色によるミトコンドリアのユビキチン化の可視化解析

上記 4 - 2 から示唆される事項についてさらに検証するために、リン酸化されない S 6 5 A 組換えユビキチンがミトコンドリア上の基質タンパク質に付加されるかどうかを試験した。上記 2 - 3 と同様の手順により、H e L a 細胞に S 6 5 A 組換えユビキチンを発現させた。また、野生型ユビキチンを発現させたものを対照とした。C C C P 処理は、上記 1 - 1 と同様の手順により行った。

【 0 1 2 4 】

細胞を、4 %ホルムアルデヒドを用いて固定後、5 0 m g / m L のジギトニンにより細胞を可溶化し、一次抗体として、抗 G F P 抗体 a b 6 5 5 6（アブカム社製）（1 : 5 0 0）、抗 F l a g 抗体 2 H 8（トランスジェニック社製）（1 : 5 0 0）および抗 T o m 2 0 抗体 F L - 1 4 5（サンタクルズバイオテクノロジー社製）（1 : 3 , 0 0 0）を用い、二次抗体として A l e x a F l u o r 4 8 8 または 5 6 8 標識抗マウスまたはウサギ I g G 抗体（インビトロジェン社製）（1 : 2 , 0 0 0）を用いて免疫染色を行った。染色後の細胞は、共焦点レーザースキャン顕微鏡システム L S M 5 1 0（カールツァイス社製）により観察した。統計的分析は、3 回の実験を通して 1 0 0 個以上の細胞を解析し、スチューデントの t 検定により行った。

30

【 0 1 2 5 】

結果を図 1 0 に示す。リン酸化されない S 6 5 A 組換えユビキチンも、野生型ユビキチンと同様に、ミトコンドリア上の基質タンパク質に付加されることが示された。この結果からも、P a r k i n によって付加されるポリユビキチン鎖がリン酸化されたユビキチンに由来するものに限られるわけではないことが確認された。

40

【 0 1 2 6 】

< 実施例 6 : S e r 6 5 リン酸化ユビキチンは P a r k i n の完全な活性化に必須である >

6 - 1 . 無細胞系における S e r 6 5 リン酸化ユビキチンによる P a r k i n の活性化

最後に、組換え P a r k i n と組換えユビキチンまたは S e r 6 5 リン酸化ユビキチンを用いた無細胞系アッセイにより、P a r k i n の活性化を評価した。W T、S 6 5 E または W 4 0 3 A の G F P - P a r k i n は、C C C P 処理されていない H e L a 細胞また

50

は P I N K 1 の M E F s から、以下の手順により調製した。前記細胞を、E D T A フリープロテアーゼインヒターカクテル（ロシュ・ダイアグノスティクス社製）を添加した無細胞系アッセイ用バッファー（20 mM の H E P E S - K O H (p H 7 . 5) 、 220 mM のソルビトール、10 mM の K A c 、 70 mM のスクロース）中に懸濁した。細胞懸濁液を、25 ゲージの注射針に30回通過させることにより細胞を破碎し、細胞ホモジネート液を得た。次いで、細胞ホモジネート液を、4、800 × g にて10分間遠心分離し、核除去後上清を回収した。核除去後上清を、4、16,000 × g にて20分間さらに遠心分離し、上清を回収することで、ミトコンドリアを除去した細胞質画分を得た。この上清に、5 mM の M g C l ₂、5 mM の A T P、2 mM の D T T および 1 % のグリセロールを添加した。W T、S 6 5 A、S 6 5 D の H i s ₆ - ユビキチンまたは H i s ₆ - S e r 6 5 リン酸化ユビキチンは、上記 2 - 1、2 - 2 の手順により調製した。

10

【0127】

P a r k i n の E 3 酵素としての活性化は、P a r k i n の自己ユビキチン化に基づいて評価した。無細胞系ユビキチン化アッセイは、G F P - P a r k i n または G F P - 組換え P a r k i n を含有する H e L a 細胞の細胞質画分に、上記 1 - 2、2 - 1 の手順により調製された野生型ユビキチン、S 6 5 D 組換えユビキチンまたは S e r 6 5 リン酸化ユビキチン（終濃度 50 μ g / m L ）を添加し、30 で 2 時間インキュベートすることにより行った。

【0128】

結果を図 1 1 に示す。S 6 5 E 組換え P a r k i n および W 4 0 3 A 組換え P a r k i n は、膜電位の消失したミトコンドリアが存在せずとも、S 6 5 D リン酸化模倣型ユビキチンによって活性化されるが（図 1 1 上段、レーン 1 2 および 1 8 ）、野生型 P a r k i n は、S 6 5 D リン酸化模倣型ユビキチンによって活性化されなかった（図 1 1 上段、レーン 6 ）。野生型ユビキチンあるいは S 6 5 A 組換えユビキチンは、S 6 5 E 組換え P a r k i n および W 4 0 3 A 組換え P a r k i n を活性化しなかった（図 1 1 上段、レーン 1 0、1 6 ）。また、P I N K 1 の影響を排除しても、全く同様の結果が得られた（図 1 1 中段）。さらに、S 6 5 D リン酸化模倣型ユビキチンに代えて、実際に S e r 6 5 がリン酸化されたユビキチンを用いた場合にも同様の結果が確認された（図 1 1 下段）。

20

【0129】

以上の実施例の結果から想定される P a r k i n の活性化メカニズムを図 1 2 に示す。活性化された P I N K 1 は、P a r k i n とユビキチンの両方をリン酸化する。また、P a r k i n の活性化には、P I N K 1 による P a r k i n のリン酸化が必要であるが、それのみでは部分的な活性化しか起こらず、完全に P a r k i n が活性化されるためには、S e r 6 5 がリン酸化されたユビキチンの存在が必要である。

30

【0130】

このように、本発明に係る S e r 6 5 リン酸化ユビキチンは、P a r k i n の活性化に必須の構成分子であり、パーキンソン病検出用バイオマーカーとして使用し得るものであることが確認された。また、本発明に係るパーキンソン病検出用バイオマーカーを使用することにより、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法を提供することができることが示唆された。さらに、S e r 6 5 リン酸化ユビキチンおよび S e r 6 5 A s p リン酸化模倣型ユビキチンは、P a r k i n を活性化する効果を有し、パーキンソン病の治療薬または予防薬として使用し得るものであることが示唆された。

40

【0131】

< 実施例 7 : 抗 S e r 6 5 リン酸化ユビキチン抗体の作製 >

次いで、S e r 6 5 リン酸化ユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体を作製した。リン酸化 S e r 6 5 を含むユビキチン断片である C N I Q K E (p S) T L H をウサギに、C N I Q K E (p S) T L H L V をモルモットに、2 週間間隔で 4 ~ 5 回にわたって免疫した後、全採血し、血清を得ることにより、ポリクローナル抗体を含有する抗血清を得た。

【0132】

50

ポリクローナル得られた抗体の結合能評価は、上記1 - 2と同様の手順により調製したユビキチンサンプルを用いて行った。また、陽性対照には、抗ユビキチン抗体Z0458（ダコ社製）を用いた。

【0133】

結果を図13および図14に示す。陽性対照では、リン酸化されたユビキチン（図中、記号「*」により表示）とリン酸化されていないユビキチン（図中、記号「**」により表示）の両方が検出されているのに対し、抗ユビキチンウサギポリクローナル抗体と抗ユビキチンモルモットポリクローナル抗体はいずれも、リン酸化されたユビキチンのみを特異的に検出した。

【0134】

このように、本発明に係る抗Ser65リン酸化ユビキチン抗体は、Ser65リン酸化ユビキチンに対して特異的な結合能を有し、上記パーキンソン病の検出方法に使用できるものであることが示唆された。

【0135】

<実施例8：質量分析法を用いたSer65リン酸化ペプチドの検出>

実際に生体内において、ミトコンドリア膜電位の消失に応じて、ユビキチンのSer65がリン酸化されるかどうかを確認するために、細胞抽出液についてLC-MS/MS測定を行った。細胞抽出液を、上記1-1と同様の手順により、CCCP処理されたまたは処理されていないHeLa細胞から調製し、SDS-PAGEに供した。次いで、ユビキチンの分子量に相当する付近のゲルを切り出し、上記2-1と同様にしてサンプルを調製し、LC-MS/MS機器を用いて質量分析解析に処した。ただし、プロテアーゼによる切断に際しては、トリプシン（プロメガ社製）に加えて、エンドプロテイナーゼLys-C（和光純薬社製）を用いた。LC-MS/MS測定後、ユビキチンの64~72番目のアミノ酸に相当するリン酸化ペプチド（E(pS)TLHLVLR）および非リン酸化ペプチド（ESTLHLVLR）に由来するフラグメントイオンに関して、曲線下面積値（The area under the curves: AUC）を、PinPoint software（サーモフィッシャー社製）を用いて算出した。

【0136】

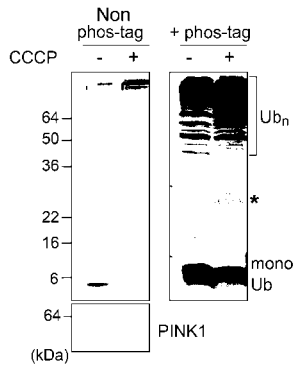
結果を図15に示す。CCCP処理を行ったHeLa細胞の抽出液からは、リン酸化ペプチド断片（E(pS)TLHLVLR）に由来するシグナルが検出された一方、CCCP処理を行わなかったHeLa細胞の抽出液からは、リン酸化ペプチド断片は検出されなかった。非リン酸化ペプチド断片（ESTLHLVLR）に由来するシグナルはCCCP処理・未処理両方のHeLa細胞の抽出液から検出された。これらの結果から、実際に生体内において、ミトコンドリア膜電位の消失に応じたユビキチンのSer65のリン酸化を、質量分析法によって検出できることが示された。

10

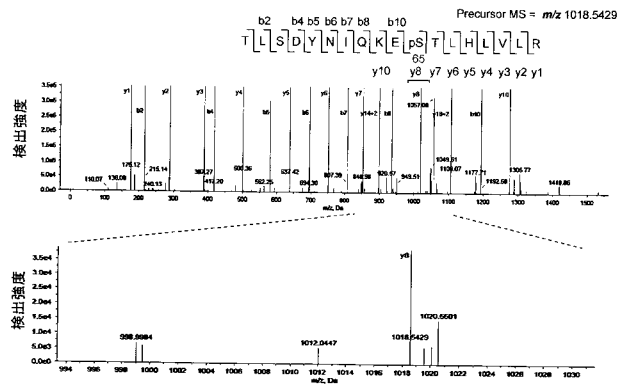
20

30

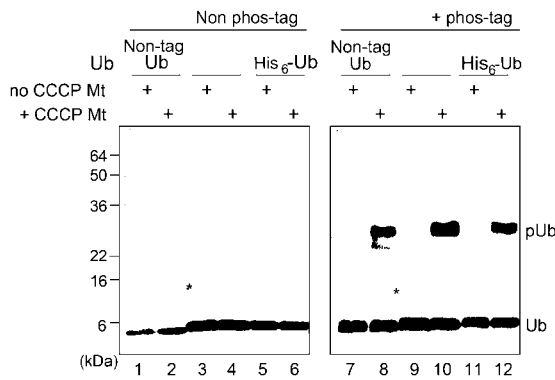
【 図 1 】



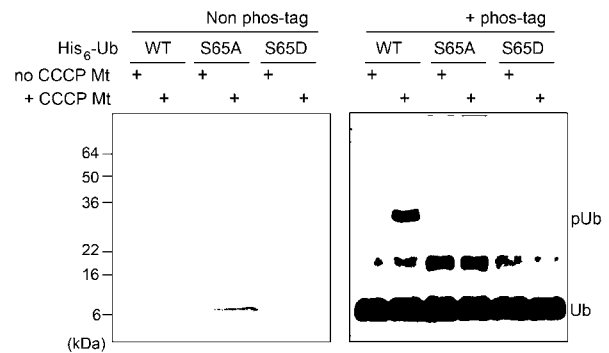
【 図 3 】



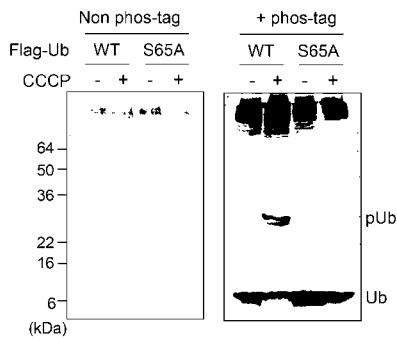
【 図 2 】



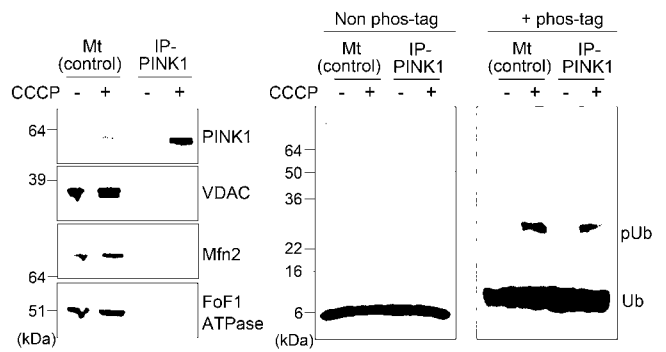
【 図 4 】



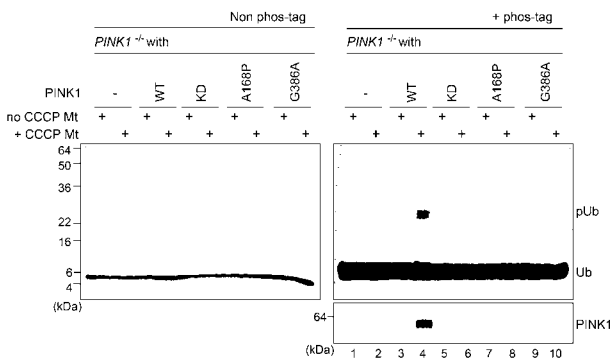
【 図 5 】



【 図 7 】



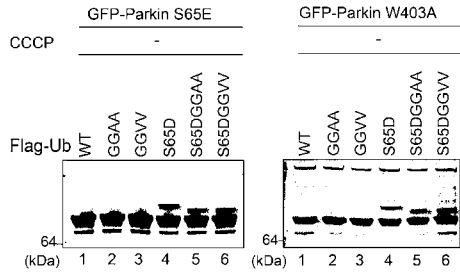
【 図 6 】



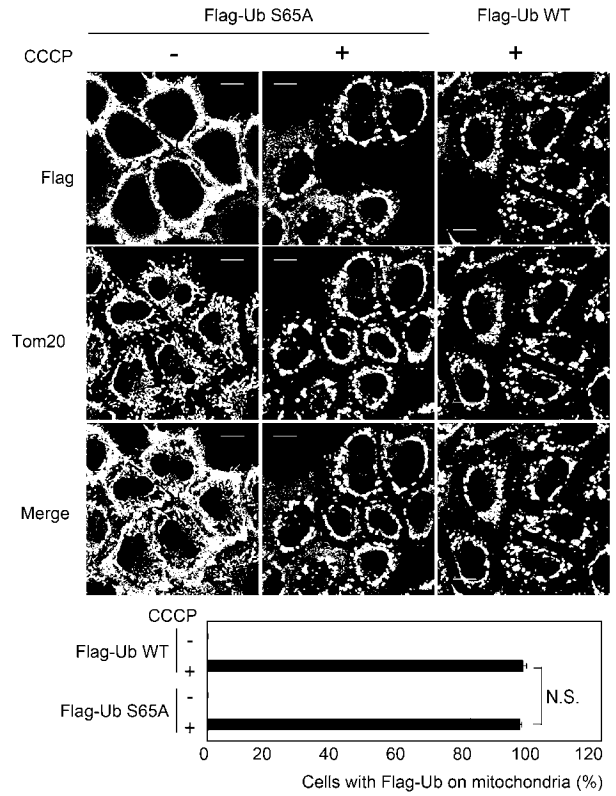
【 図 8 】



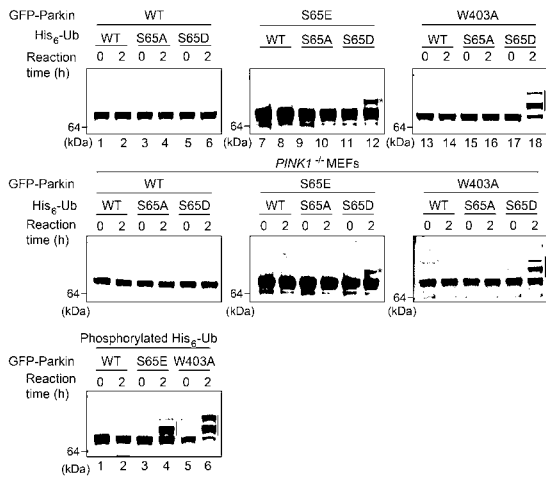
【 図 9 】



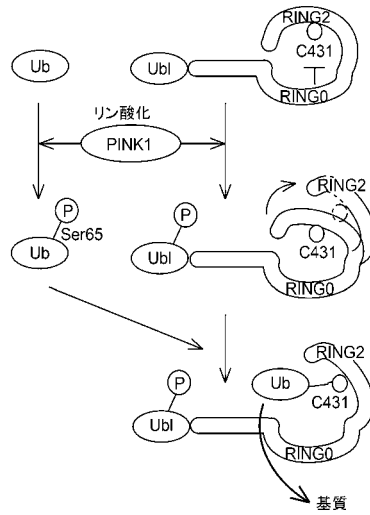
【 図 1 0 】



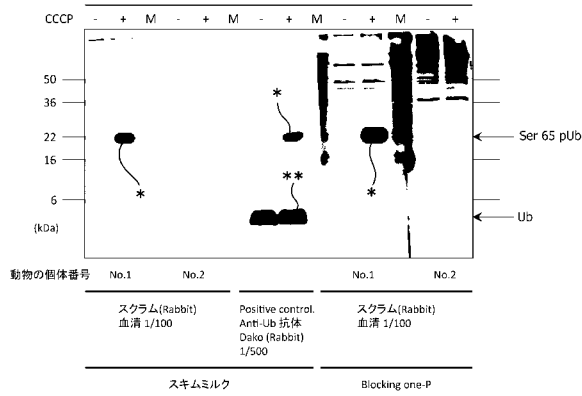
【 図 1 1 】



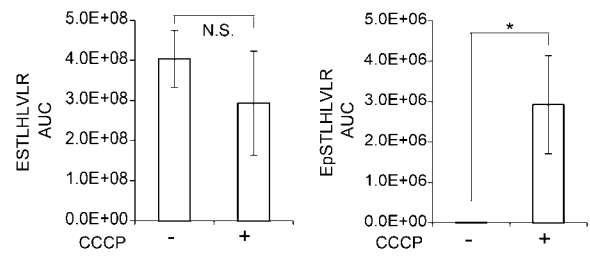
【 図 1 2 】



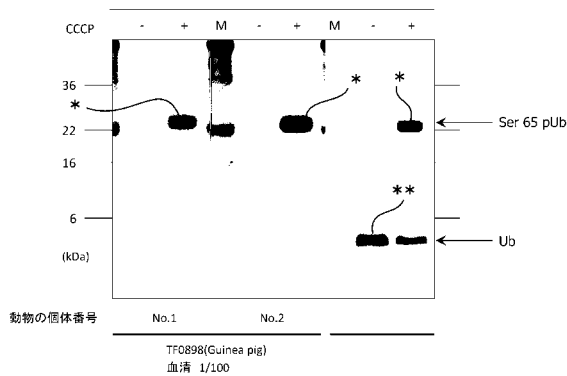
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

2015125702000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成27年10月14日(2015.10.14)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン(配列番号1)、または、配列番号1のアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加され、かつ、リン酸化された65番目のセリン残基が保存されたアミノ酸配列からなるユビキチン。

【 請求項 2 】

65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチン(配列番号2)、または、配列番号2のアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加され、かつ、65番目のアスパラギン酸残基が保存されたアミノ酸配列からなるリン酸化模倣型ユビキチン。

【 請求項 3 】

被験者から単離された試料について、65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを検出または定量するステップを含むパーキンソン病の検査方法。

【 請求項 4 】

前記検出または定量するステップが、免疫学的手法により行われる、請求項3に記載の

検査方法。

【請求項 5】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンからなるパーキンソン病検出用バイオマーカー。

【請求項 6】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体。

【請求項 7】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、請求項6に記載の抗体。

【請求項 8】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬。

【請求項 9】

65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチンを含んでなるパーキンソン病の治療薬または予防薬。

【請求項 10】

(1) PINK1を発現する細胞を提供するステップと、

(2) 前記細胞中のミトコンドリアを傷害するステップと、

(3) 前記細胞に候補化合物を接触させるステップと、

(4) 前記細胞において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップと

を含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法。

【請求項 11】

(1) ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを含有するリン酸化反応溶液を調製するステップと、

(2) 前記リン酸化反応溶液に候補化合物を添加するステップと、

(3) 前記リン酸化反応溶液において生成された65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップと

を含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法。

【請求項 12】

前記リン酸化反応溶液が細胞抽出液である、請求項11に記載の方法。

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月30日(2016.5.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

65番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン。

【請求項 2】

ヒト由来のものである、請求項1に記載のリン酸化されたユビキチン(配列番号1)。

【請求項 3】

N末端および/またはC末端にタグが付加された、請求項1または2に記載のリン酸化されたユビキチン。

【請求項 4】

65番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたリン酸化模倣型ユビキチン。

【請求項 5】

ヒト由来のものである、請求項4に記載のリン酸化模倣型ユビキチン(配列番号2)。

【請求項 6】

N 末端および / または C 末端にタグが付加された、請求項 4 または 5 に記載のリン酸化模倣型ユビキチン。

【請求項 7】

被験者から単離された試料について、65 番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンを検出または定量するステップを含むパーキンソン病の検査方法。

【請求項 8】

前記検出または定量するステップが、免疫学的手法により行われる、請求項 7 に記載の検査方法。

【請求項 9】

65 番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンからなるパーキンソン病検出用バイオマーカー。

【請求項 10】

65 番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチンに対して特異的結合能を有する抗体。

【請求項 11】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

(1) PINK 1 を発現する細胞を提供するステップと、
(2) 前記細胞中のミトコンドリアを傷害するステップと、
(3) 前記細胞に候補化合物を接触させるステップと、
(4) 前記細胞において生成された 65 番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップと
を含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法。

【請求項 13】

(1) ユビキチンと、キナーゼと、リン酸供与体とを含有するリン酸化反応溶液を調製するステップと、
(2) 前記リン酸化反応溶液に候補化合物を添加するステップと、
(3) 前記リン酸化反応溶液において生成された 65 番目のセリン残基がリン酸化されたユビキチン量を測定するステップと
を含む、パーキンソン病の治療薬または予防薬のスクリーニング方法。

【請求項 14】

前記リン酸化反応溶液が細胞抽出液である、請求項 13 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/053930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N33/53(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n		
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) G01N33/53, A61K39/395, A61P25/16, C07K16/18, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/153386 A1 (UNIVERSITY OF DUNDEE), 17 October 2013 (17.10.2013), entire text; all drawings & GB 201206382 D	1-10
A	Tomoko KANAOKA, "The molecular mechanism underlying PINK1-mediated mitochondrial maintenance", Grants-in-Aid for Scientific Research (Kagaku Kenkyuho Hojokin) Kenkyu Seika Hokokusho, 27 August 2013 (27.08.2013)	1-10
A	Noriyuki MATSUDA, "The molecular basis for how E3 activity of Parkin is re-established by damaged mitochondria", Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2013, vol.247, no.10, pages 1013 to 1018	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 20 April 2015 (20.04.15)		Date of mailing of the international search report 28 April 2015 (28.04.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/053930

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-025764 A (Okayama University), 06 February 2014 (06.02.2014), entire text; all drawings (Family: none)	1-10
A	WO 2010/005077 A1 (Japan Health Sciences Foundation), 14 January 2010 (14.01.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-10
P,X	Koyano F et al., Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin., Nature, 2014.06.05, Vol.510,No.7503, Page.162-166	1-10
P,X	Noriyuki MATSUDA, "Idensei Parkinson-byo Kanren Bunshi PINK1 ni yotte Rinsan-ka sareta Ubiquitin ga Parkin o Kasseika suru", Cell technology, 22 August 2014 (22.08.2014), vol. 33, no.9, pages 974 to 976	1-10
P,X	Kazlauskaitė A et al., Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65., Biochem J, 2014.05.15, Vol.460,No.1, Page.127-139	1-10
P,X	Kane LA et al., PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity., J Cell Biol, 2014.04.21, Vol.205, No.2, Page.143-153	1-10
P,X	Kazlauskaitė A et al., PINK1 and Parkin - mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease., FEBS J, 2015.01, Vol.282,No.2, Page.215-223	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 3 9 3 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, A61K39/395, A61P25/16, C07K16/18, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	WO 2013/153386 A1 (UNIVERSITY OF DUNDEE) 2013.10.17, 全文・全図等参照 & GB 201206382 D	1-10	
A	金尾智子, パーキンソン病原因遺伝子産物がミトコンドリアの品質管理を行う分子, 科学研究費助成事業 (科学研究費補助金) 研究成果報告書, 2013.08.27	1-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 20.04.2015		国際調査報告の発送日 28.04.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 草川 貴史	2 J 4 0 7 5 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 3 9 3 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	松田憲之, ユビキチン連結酵素 P a r k i n がミトコンドリアの異常によって活性化される仕組み, 医学のあゆみ, 2013, Vol. 247, No. 10, Page. 1013-1018	1-10
A	JP 2014-025764 A (国立大学法人 岡山大学) 2014. 02. 06, 全文・全図等参照 (ファミリーなし)	1-10
A	WO 2010/005077 A1 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2010. 01. 14, 全文・全図等参照 (ファミリーなし)	1-10
P, X	Koyano F、外 1 5 名, Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin., Nature, 2014. 06. 05, Vol. 510, No. 7503, Page. 162-166	1-10
P, X	松田憲之, 遺伝性パーキンソン病関連分子 P I N K 1 によってリン酸化されたユビキチンが P a r k i n を活性化する, 細胞工学, 2014. 08. 22, Vol. 33, No. 9, Page. 974-976	1-10
P, X	Kazlauskaitė A、外 9 名, Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65., Biochem J, 2014. 05. 15, Vol. 460, No. 1, Page. 127-139	1-10
P, X	Kane LA、外 7 名, PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity., J Cell Biol, 2014. 04. 21, Vol. 205, No. 2, Page. 143-153	1-10
P, X	Kazlauskaitė A、外 1 名, PINK1 and Parkin - mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease., FEBS J, 2015. 01, Vol. 282, No. 2, Page. 215-223	1-10

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00	(2006.01)		A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)		A 6 1 P 25/16	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)		C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 14/00	(2006.01)		C 0 7 K 14/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 小谷野 史香
東京都世田谷区上北沢 2 - 1 - 6 公益財団法人東京都医学総合研究所内

(72) 発明者 尾勝 圭
東京都世田谷区上北沢 2 - 1 - 6 公益財団法人東京都医学総合研究所内

(72) 発明者 呉 越
東京都世田谷区上北沢 2 - 1 - 6 公益財団法人東京都医学総合研究所内

(72) 発明者 木村 まゆみ
東京都世田谷区上北沢 2 - 1 - 6 公益財団法人東京都医学総合研究所内

(72) 発明者 佐伯 泰
東京都世田谷区上北沢 2 - 1 - 6 公益財団法人東京都医学総合研究所内

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA24 AA25 AA29 AA40 BA13 BB20 CA25 CA26 CB01
CB17 DA15 DA20 DA36 FA12 FA16 FA34 FB01 FB03 FB06
FB12 GC15
4B063 QA01 QA20 QQ79 QR07 QR48 QR77 QS28 QS33 QX02
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA13
4C084 AA02 BA44 NA05 ZA021
4H045 AA11 BA10 BA21 EA20 EA21 EA50 FA74

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

专利名称(译)	帕金森病的生物标志物及其用途		
公开(公告)号	JPWO2015125702A1	公开(公告)日	2017-03-30
申请号	JP2015545213	申请日	2015-02-13
申请(专利权)人(译)	公益财団法人东京都医学総合研究所		
[标]发明人	松田憲之 小谷野史香 尾勝圭 呉越 木村まゆみ 佐伯泰		
发明人	松田 憲之 小谷野 史香 尾勝 圭 呉 越 木村 まゆみ 佐伯 泰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C07K16/18 C12Q1/02 A61K38/00 A61P25/16 C12P21/08 C07K14/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/16 C07K14/47 C12Y207/11001 G01N2440/14 C07K16/18 C12Q1/485 G01N33/5079 G01N33/6896 G01N2333/47 G01N2333/912 G01N2333/91215 G01N2500/00 G01N2500/20 G01N2800/2835		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C07K16/18 C12Q1/02 A61K37/02 A61P25/16 C12P21/08 C07K14/00		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA15 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FA34 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/NA05 4C084/ZA021 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA21 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2014028449 2014-02-18 JP		
其他公开文献	JP5997394B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了靶向泛素的抗体，其中65位的丝氨酸残基被磷酸化。另外，使用泛素将65位丝氨酸残基磷酸化为靶分子的帕金森氏病的早期和特异性检测的方法，以及用于帕金森氏病的基本治疗或预防的药物组合物及其筛选 提供一种方法。

発行日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)

(43) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 6 4
CO 7 K 16/18 (2006. 01)	CO 7 K 16/18	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 31 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2015-545213 (P2015-545213)	(71) 出願人	591063394 公益財団法人東京都医学総合研究所 東京都世田谷区上北沢2-1-6
(2) 国際出願番号	PCT/JP2015/053930		
(1) 特許番号	特許第5997394号 (P5997394)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(45) 特許公報発行日	平成28年9月28日 (2016. 9. 28)		
(31) 優先権主張番号	特願2014-28449 (P2014-28449)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成26年2月18日 (2014. 2. 18)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
		(74) 代理人	100180231 弁理士 水島 亜希子
		(72) 発明者	松田 憲之 東京都世田谷区上北沢2-1-6 公益財 団法人東京都医学総合研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パーキンソン病のバイオマーカーおよびその利用