(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2007 年9 月27 日 (27.09.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/108557 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 27/06* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 27/12* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
A61P 3/12 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/056529

(22) 国際出願日: 2007 年3 月20 日 (20.03.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2006-077607 2006 年3 月20 日 (20.03.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目１番８号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 御子柴克彦 (MIKOSHIBA, Katsuhiko) [JP/JP]; 〒1810001 東京都三鷹市井の頭２－１９－２５ Tokyo (JP). 安東英明 (ANDO, Hideaki) [JP/JP]; 〒1530064 東京都目黒区下目黒４－３－８ アネスト２０２ Tokyo (JP). 水谷顕洋 (MIZUTANI, Akihiro) [JP/JP]; 〒1420063 東京都品川区荏原７－９－６ コスモ旗の台６０２ Tokyo (JP).

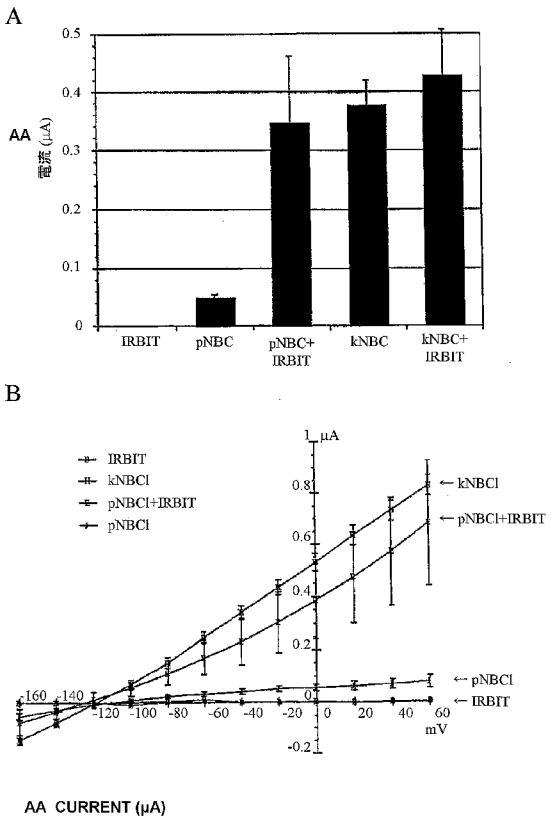
(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

[続葉有]

(54) Title: CONTROL OF INTRACELLULAR TARGET MOLECULE BY IP3 RECEPTOR-BINDING PROTEIN

(54) 発明の名称: ＩＰ３受容体結合タンパク質による細胞内標的分子の制御



(57) **Abstract:** It is intended to provide a composition containing an IP_3 receptor binding protein (IRBIT), a nucleic acid controlling the expression/translation of the IRBIT or an antibody against the IRBIT which aims at controlling at least one intracellular biological function selected from among: (1) synthesis of a protein; (2) metabolism of an inositol phospholipid; and (3)the intracellular pH value.

(57) 要約: この発明は、ＩＰ３受容体結合タンパク質（ＩＲＢＩＴ）、ＩＲＢＩＴの発現／翻訳を制御する核酸、またはＩＲＢＩＴに対する抗体を含む組成物であって、（１）タンパク質合成、（２）イノシトールリン脂質代謝、および（３）細胞内ｐＨ、からなる群から選択される少なくとも１つの細胞内生物学的機能の制御のための組成物を提供する。

WO 2007/108557 A1

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明　細　書

ＩＰ$_3$受容体結合タンパク質による細胞内標的分子の制御

技術分野

本発明は、哺乳動物細胞における生物学的機能を制御するための組成物および方法に関する。さらに具体的には、本発明は、ＩＰ$_3$受容体結合タンパク質（ＩＲＢＩＴ）およびその細胞内標的分子が関与する該生物学的機能を制御するための組成物および方法に関する。

本発明はまた、前記生物学的機能の制御を利用する物質のスクリーニング方法を提供する。

背景技術

細胞膜上の受容体の活性化に伴いホスファチジルイノシトール４，５－ビスホスフェート（ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ　４，５－ｂｉｓｐｈｏｓｐｈａｔｅ）が加水分解されると、細胞内セカンドメッセンジャーであるイノシトール１，４，５－三リン酸（ｉｎｏｓｉｔｏｌ　１，４，５－ｔｒｉｓｐｈｏｓｐｈａｔｅ（ＩＰ$_3$））が生成する。ＩＰ$_3$はＩＰ$_3$受容体（ＩＰ$_3$Ｒ）に結合することにより、細胞内カルシウム貯蔵オルガネラ（主に小胞体）からのＣａ$^{2+}$放出を誘導する。このＩＰ$_3$／Ｃａ$^{2+}$シグナル経路において、ＩＰ$_3$受容体は、ＩＰ$_3$のシグナルをＣａ$^{2+}$のシグナルへ変換する役割を担っている（Ｍ．Ｊ．　Ｂｅｒｒｉｄｇｅ，Ｎａｔｕｒｅ（１９９３）３６１：３１５－３２５；Ｍ．Ｊ．Ｂｅｒｒｉｄｇｅら，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．（２０００）１：１１－２１；Ｔ．　ＦｕｒｕｉｃｈｉおよびＫ．　Ｍｉｋｏｓｈｉｂａ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．（１９９５）６４：９５３－９６０）。

ＩＰ$_3$受容体は、４量体の細胞内ＩＰ$_3$誘導性Ｃａ$^{2+}$放出チャネル（ＩＰ$_3$－ｇａｔｅｄ　Ｃａ$^{2+}$　ｒｅｌｅａｓｅ　ｃｈａｎｎｅｌ）である。哺乳動物では、３種の異なるＩＰ$_3$受容体（すなわち、タイプ１、タイプ２およびタイプ３）が存在する（Ｔ．　Ｆｕｒｕｉｃｈｉら，Ｎａｔｕｒｅ（１９８９）３４２：３２

－３８；T. Sudhofら，EMBO J.（１９９１）１０：３１９９－３２０６；O. Blondelら，J. Biol. Chem.（１９９３）２６８：１１３５６－１１３６３）。このうち、IP_3受容体タイプ１（IP_3R1）は、中枢神経系、特に小脳において高発現している（P. F. Worleyら，Nature（１９８７）３２５：１５９－１６１；T. Furuichiら，Recept. Channels（１９９３）１：１１－２４）。マウスIP_3R1は、２７４９アミノ酸からなり、３つの機能的に異なる領域に分かれている。すなわち、N末端近傍にIP_3結合ドメイン、C末端近傍に６回膜貫通領域を有するチャネル形成ドメイン、およびこれら２つの領域の間に制御領域が存在する。IP_3結合ドメインの欠失突然変異体解析より、IP_3受容体のアミノ酸２２６～５７８残基が特異的かつ高親和性のリガンド結合に必要な最小領域であることが示され、IP_3結合コアと呼ばれている。

IP_3受容体の活性化による細胞質Ca^{2+}濃度の増加によって、多種多様な下流標的分子の活性が制御される。これら下流標的分子は、受精、発生、増殖、分泌、シナプス可塑性など多岐に渡る細胞応答において重要な役割を担っている。

本発明者らは、先に、新規のIP_3受容体結合タンパク質を見出し、IRBIT（IP_3R－binding protein released with inositol 1，4，5－trisphosphate）と命名した（日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報）。IP_3受容体は、ヒト、マウスなどの哺乳動物の例えば脳、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、胸腺などの種々の組織や細胞に広く分布することから、IRBITもそのような組織や細胞に存在すると推定される。ヒトおよびマウスIRBITのアミノ酸および塩基配列は、本発明者らによって決定された（日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報、H. Andoら，J. Biol. Chem.（２００３）２７８：１０６０２－１０６１２）。これらのIRBITは５３０アミノ酸からなり、ヒトおよびマウス間の同一性は１００％である。IP_3受容体との結合領域は、IRBITのN末端領域（ヒトおよびマウスにおいて、アミノ酸１～１０４）に存在する。

IRBITは、（１）中性タンパク質である（推定pI値：６．４８）が、N末端領域は比較的酸性である（推定pI値：４．９８）、（２）N末端領域に複数の

リン酸化部位が集中的に局在しており、リン酸化がIP_3R1との相互作用に必要であると推測される、（３）IP_3R1のIP_3との結合に必須である５０８番目のリジン残基がＩＲＢＩＴとの相互作用においても必須である、（４）IP_3によりIP_3R1との相互作用から解離する、および（５）高塩濃度により、IP_3R1との相互作用から解離し、かつ粗ミクロソーム画分から抽出されることから、IP_3R1との相互作用は静電気的結合によると推測される、などの特徴を有する（日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報）。

ＩＲＢＩＴは、IP_3受容体のIP_3結合領域に結合し、ｉｎ ｖｉｔｒｏでIP_3によりIP_3受容体から解離するという性質をもつ。このため、ＩＲＢＩＴは、IP_3受容体のIP_3結合を抑制することにより、IP_3受容体の活性を抑制する機能をもつことも明らかになっている（日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報）。

本発明者らは、今回、以下に説明するように、ＩＲＢＩＴの標的分子を明らかにし、さらにＩＲＢＩＴが生体内で三次メッセンジャーとして重要な生物学的機能をもつことを明らかにした。

発明の開示

本発明の目的は、ＩＲＢＩＴとその分子標的との相互作用を利用して細胞内の生物学的機能の制御を可能にする組成物および方法を提供することである。

本発明の別の目的は、細胞内においてＩＲＢＩＴとその分子標的との間の結合を抑制または亢進することによって、前記生物学的機能の制御を可能にする物質のスクリーニング方法を提供することである。

本発明者らは、今回、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ＩＲＢＩＴの標的が、タンパク質合成を制御する分子、イノシトールリン脂質を制御する分子、および細胞内のｐＨを制御する分子であることを見出した。また、ＩＲＢＩＴが、細胞内代謝を制御する重要な分子の１つとして、今回見出された３種類の標的分子と結合して該標的分子の働きを制御する三次メッセンジャーとしての役割を有することを証明している。

発明の概要

したがって、本発明は、要約すると、以下の特徴を有する。

本発明は、第１の態様において、 IP_3受容体結合タンパク質（ＩＲＢＩＴ）、ＩＲＢＩＴの発現／翻訳を制御する核酸、またはＩＲＢＩＴに対する抗体を含む組成物であって、

（１）タンパク質合成、

（２）イノシトールリン脂質代謝、および

（３）細胞内ｐＨ、

からなる群から選択される少なくとも１つの細胞内生物学的機能の制御のための上記組成物を提供する。

一の実施形態において、前記タンパク質合成が、切断／ポリアデニレーション特異性因子（ＣＰＳＦ）による細胞質のｍＲＮＡポリアデニレーションが関与するものである。

別の実施形態において、前記イノシトールリン脂質代謝が、細胞内でのPIP_2合成酵素（ＰＩＰＫＩＩ）が関与するものである。

別の実施形態において、前記細胞内ｐＨが、細胞内でのｐ型Ｎａ／HCO_3共トランスポーター１（ｐＮＢＣ１）が関与するものである。

別の実施形態において、前記制御が、抑制または亢進である。

別の実施形態において、前記ＩＲＢＩＴが、ヒトまたはマウス由来のものである。

別の実施形態において、前記ＩＲＢＩＴが、配列番号１または配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、あるいは該アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつＩＲＢＩＴと同等の生物学的活性を有するタンパク質である。

別の実施形態において、前記組成物が、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｅｘ ｖｉｖｏのいずれかで使用されるものである。

別の実施形態において、前記組成物が、疾患の治療用である。

本発明はまた、第２の態様において、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｅｘ ｖｉｖｏでの細胞内のタンパク質合成の制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法を提供する。

その実施形態において、前記ＩＲＢＩＴがＣＰＳＦに結合しＣＰＳＦの機能を

制御する。

本発明はまた、第３の態様において、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内のイノシトールリン脂質代謝の制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法を提供する。

その実施形態において、前記ＩＲＢＩＴがＰＩＰＫＩＩ活性を抑制する。

本発明はまた、第４の態様において、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内ｐＨの制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法を提供する。

その一の実施形態において、前記ＩＲＢＩＴがｐＮＢＣ１を活性化する。

別の実施形態において、前記ｐＮＢＣ１の活性化が前記ＩＲＢＩＴのリン酸化を必要とする。

本発明はまた、第５の態様において、候補物質の存在下で、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１との結合を測定し、該結合を抑制または亢進する物質を同定することを含む、物質のスクリーニング方法を提供する。

その実施形態において、前記物質が治療用または診断用である。

別の実施形態において、前記結合が哺乳動物細胞内で行われる。

さらに別の実施形態において、前記物質が、細胞内のタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝および細胞内ｐＨからなる群から選択される少なくとも１つの細胞内生物学的機能を制御するものである。

定義

本明細書中で使用する「ＩＲＢＩＴ」なる用語は、哺乳動物由来のIP_3受容体結合タンパク質であり、該受容体のIP_3結合部位に結合しており、IP_3の該受容体への結合とともに細胞質に放出されるタンパク質である。本発明では、ＩＲＢＩＴは、ＣＰＳＦ（ｃｌｅａｖａｇｅ／ｐｏｌｙａｄｅｎｙｌａｔｉｏｎ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｆａｃｔｏｒ）、ＰＩＰＫＩＩ（ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ－５－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　４－ｋｉｎａｓｅ）、またはｐＮＢＣ１（ｐａｎｃｒｅａｓ　ｔｙｐｅ　Ｎａ／HCO_3　ｃｏｔｒａｎｓｐｏｒｔｅｒ　１）と結合するが、これらのＩＲＢＩＴ標的タンパク質はＩＲＢＩＴとの結合を介してそれぞれタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝、細胞内ｐＨの維持に関与する重要な生物学的機能を細胞内で果たしている。したがって、

ＩＲＢＩＴは、これらの生物学的機能の制御を担っている。

本明細書で使用する「タンパク質合成」なる用語は、細胞内での遺伝子の転写と翻訳の一連の過程をいい、本発明では、細胞質でのｍＲＮＡポリアデニレーションの制御が関与する。また、イノシトールリン脂質代謝は、IP_3を含むリン脂質の代謝を指す。

本明細書で使用する「抑制」なる用語は、上記生物学的機能の減少、低下または阻害をいう。

本明細書で使用する「亢進」なる用語は、上記生物学的機能の増加、上昇または増進をいう。

本明細書で使用する「ｅｘ　ｖｉｖｏ」なる用語は、一旦生体外に取り出された細胞や組織を本発明の組成物で処理した後、生体内に戻すことをいう。

本明細書で使用する「患者」なる用語は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、家畜動物（例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）などの哺乳動物、好ましくはヒトを指す。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2006-77607 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１は、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ１６０との結合を示すウエスタンブロット図である。図中、Ｉ．Ｂ．はウエスタンブロッティングを表し、Ｉ．Ｐ．は免疫沈降を表わし、ＨＡはタグとしてのヘマグルチニンを表し、ｌｏａｄは細胞抽出液を表す。

図２は、ＩＲＢＩＴがＣＰＳＦのＣＰＳＦ１６０サブユニットのｍＲＮＡ結合部位に結合することを示す模式図である。

図３は、IP_3受容体、ＩＲＢＩＴ、ＰＩＰＫＩＩ、IP_3が関与するイノシトールリン脂質代謝を示す模式図である。図中、ＰＬＣはホスホリパーゼＣを表す。

図４は、マウスＩＲＢＩＴとＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩα，β，γとの結合を示す。（Ａ）は抗Ｍｙｃ抗体による免疫沈降を示す。（Ｂ）は抗ＩＲＢＩＴ抗体による免疫沈降を示す。図中、ｉｎｐｕｔは細胞抽出液を表し、ＩＰは免疫沈降を表し、

対照ＩｇＧ（陰性対照）はこれを用いて免疫沈降を行ったサンプルを表す。

図５は、マウス小脳のＰＩＰＫＩＩαが抗マウスＩＲＢＩＴ抗体と免疫沈降で共沈したことを示す。ｉｎｐｕｔは、図４と同じである。

図６は、ＩＲＢＩＴとＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩγがともに細胞質に局在することを示す。ＭｅｒｇｅはＰＩＰＫＩＩの染色像とＩＲＢＩＴの染色像の重ね合わせを示し、重なっている部分が黄色となる。

図７は、ＩＲＢＩＴ欠失変異体を用いて、ＰＩＰＫＩＩと結合するＩＲＢＩＴの結合部位の特定を示す。（Ａ）はＩＲＢＩＴの欠失変異体の模式図を示す。（Ｂ）はＩＲＢＩＴのＮ末端側からの欠失変異体とＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩαとの結合を示す。（Ｃ）はＩＲＢＩＴのＣ末端側からの欠失変異体とＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩαとの結合を示す。

図８は、ＩＲＢＩＴのＳｅｒ６８及びＳｅｒ７１がＰＩＰＫＩＩと結合することを示す。図中、ｉｎｐｕｔは細胞抽出液を表し、ＩＰは免疫沈降を表し、ＩＢはウエスタンブロッティングを表す。

図９Ａは、ＩＲＢＩＴとＮＢＣ１との結合を示すウエスタンブロット図（上図）である。ｐＮＢＣ１（膵臓型）に特異的な部分を含む組換え型タンパク質２と５にのみＩＲＢＩＴ（黒三角）が結合する。各組換え型タンパク質（１、２、３、４、５、６または７）は、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動図（図９Ａの下図）中、黒丸で示し、かつ、図９Ｂに、ｐＮＢＣ１およびｋＮＢＣ１（腎臓型）の構造とともに、それらの構造を模式的に示した。図中、ＭＢＰは精製のために用いたマルトース結合タンパク質タグを示す。また、ＣＢＢはクマシーブリリアントブルーを表す。

図１０は、ＮＢＣ１の欠失変異体とＩＲＢＩＴとの結合能を示す。図１０Ａは、ｐＮＢＣ１の欠失変異体をそれぞれ大腸菌で発現精製し、ＣＯＳ７細胞に強制発現したＨＡ－ＩＲＢＩＴ（ここで、ＨＡはヘマグルチニンを表わす）との結合（または、相互作用）をプルダウンアッセイ（ｐｕｌｌ　ｄｏｗｎ　ａｓｓａｙ）で検討した結果を示す。また、図１０Ｂの上図は、プルダウンしたサンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥしＣＢＢで染色した結果を示す。図１０Ｂの下図は、プルダウンしたサンプルを抗ＨＡ抗体でウエスタンブロッティングした結果を示す。黒三角は

ＨＡ－ＩＲＢＩＴの泳動位置を、黒点は各欠失変異体タンパク質の泳動位置をそれぞれ示している。

図１１は、ＩＲＢＩＴの欠失変異体とｐＮＢＣ１との結合能を示す。ＩＲＢＩＴの各種欠失変異体をＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）との融合タンパク質としてＣＯＳ７細胞に強制発現し、ｐＮＢＣ１との結合をプルダウンアッセイで検討した。図１１Ａ、図１１Ｂともに、それぞれの欠失変異体を発現した細胞抽出液（ｌｙｓａｔｅ）もしくはプルダウンサンプル（ｐｕｌｌ－ｄｏｗｎ）をＳＤＳ－ＰＡＧＥし抗ＧＦＰ抗体でウエスタンブロッティングした結果を示す。黒三角は各欠失変異体の泳動位置を示している。全長（ＦＬ）以外のＩＲＢＩＴがいずれもｐＮＢＣ１と結合しなくなっていることがわかる。

図１２は、小脳膜画分における内在性ＩＲＢＩＴとＮＢＣ１との結合を示す。小脳膜画分の抽出液から、コントロールとなる免疫前の抗体（対照）、抗ＮＢＣ１抗体、抗ＩＲＢＩＴ抗体でそれぞれ免疫沈降（ＩＰ）を行い、沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥして、抗ＩＲＢＩＴ抗体、抗ＮＢＣ１抗体、抗$ＩＰ_3$受容体抗体でウエスタンブロッティング（ＩＢ）を行った。黒三角はそれぞれのタンパク質の泳動位置を示している。

図１３は、ＣＯＳ７細胞抽出液中の内在性ＩＲＢＩＴとＮＢＣ１との結合を示す。ＣＯＳ７細胞の抽出液からコントロールとなる免疫前の抗体（対照）、抗ＩＲＢＩＴ抗体、抗ＮＢＣ１抗体でそれぞれ免疫沈降（ＩＰ）を行い、沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥして、抗ＮＢＣ１抗体もしくは抗ＩＲＢＩＴ抗体でウエスタンブロッティング（ＩＢ）を行った。黒三角はそれぞれのタンパク質の泳動位置を示している。左三列は$ＣａＣｌ_2$非存在下で、右三列は$ＣａＣｌ_2$存在下でそれぞれ免疫沈降を行った沈降物を用いている。

図１４は、電圧クランプ法によって測定された、ＩＲＢＩＴによるｐＮＢＣ１の活性化を示す。図１４Ａは、膜電位を－２５ｍＶに固定したときの電流値（μＡ）である。また、図１４Ｂは、膜電位を－１６０ｍＶ～＋６０ｍＶの間で変化させたときの電流変化をＩ－Ｖ曲線で示した。

図１５は、ＩＲＢＩＴのリン酸化がｐＮＢＣ１の活性化に必要であることを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

１．組成物

本発明は、第１の態様により、ＩＲＢＩＴ、ＩＲＢＩＴの発現／翻訳を制御する核酸、またはＩＲＢＩＴに対する抗体を含む組成物を提供する。本発明の組成物は、（１）タンパク質合成、（２）イノシトールリン脂質代謝、および（３）細胞内ｐＨからなる群から選択される少なくとも１つの細胞内生物学的機能の制御のために使用される。

以下に、上記３つの生物学的機能の制御について説明する。

タンパク質合成の制御

本発明において、前記タンパク質合成の制御は、細胞内でのＩＲＢＩＴとＣＰＳＦとの結合を介するｍＲＮＡポリアデニレーションの制御である。

ＣＰＳＦは、ＣＰＳＦ１６０、ＣＰＳＦ１００、ＣＰＳＦ７３およびＣＰＳＦ３０の４つのサブユニットからなる複合タンパク質である。本発明者らは、今回、ＣＯＳ細胞での共発現と免疫沈降による共沈試験から、ＩＲＢＩＴがＣＰＳＦ、特にＣＰＳＦ１６０に結合することを見出した（図１）。

ＣＰＳＦは、核内でのｍＲＮＡのポリアデニレーション反応に必須の分子であるが、細胞質でポリ（Ａ）の長さを伸長することによるタンパク質合成を調節する働きを有すること、また、ＣＰＳＦ１６０のｍＲＮＡ結合部位は、ＣＰＳＦがポリ（Ａ）を付加するｍＲＮＡを認識する際に必須の領域であること、などが知られている（Ｃ．　Ｂａｒｎａｒｄ　Ｄａｒｏｎら，Ｃｅｌｌ　２００４，１１９：６４１－６５１、およびＥ．　Ｋｌａｎｎら，　“Ｓｙｎａｐｔｉｃ　Ｐｌａｓｔｉｃｉｔｙ　ａｎｄ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ　Ｉｎｉｔｉａｔｉｏｎ”，Ｌｅａｒｎｉｎｇ　＆　Ｍｅｍｏｒｙ　２００４，１１：３６５－３７２，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ）。具体的には、Ｅ．　Ｋｌａｎｎら（上記）の「細胞質ポリアデニレーションとＣＰＥＢ」（３６７～３６８頁）の項には、ポリアデニレーションは、ｍＲＮＡの３’非翻訳領域中の２つの配列、すなわち細胞質ポリアデニル化要素（ＣＰＥ）およ

びＡＡＵＡＡＡ、によって調節されており、ポリアデニレーションの重要な調節タンパク質であるＣＰＥ結合タンパク質（ＣＰＥＢ）が、特定のプロテインキナーゼ（Ａｕｒｏｒａ）によってリン酸化されるが、該キナーゼが、ＣＰＥＢを誘導して該ＡＡＵＡＡＡ配列上のＣＰＳＦとＣＰＥＢが相互作用することによって、ポリ（Ａ）ポリメラーゼ（ＰＡＰ）を救済しｍＲＮＡのポリ（Ａ）尾部を伸長させることが記載されている。

上記の知見を考慮すると、ＩＲＢＩＴがＣＰＳＦ１６０のｍＲＮＡ結合部位に結合することによって、ＣＰＳＦの機能が制御されると考えられる（図２）。

さらにまた、本発明者らは今回、ＩＲＢＩＴが、ＰＡＰ及びＦｉｐ１（ＣＰＳＦのサブユニット）の存在下でのポリアデニレーション活性（Ｉ．　Ｋａｕｆｍａｎｎら，ＥＭＢＯ　Ｊ．（２００４）２３：６１６－６２６）をさらに増大させる働きがあるという知見を得た。この知見から、ＩＲＢＩＴを抑制することによってタンパク質合成を抑制することが可能になる。

このように、ＩＲＢＩＴは、ＣＰＳＦとの結合を介して、ｍＲＮＡポリアデニレーションの制御、したがってタンパク質合成の制御に関わっている。

したがって、ＩＲＢＩＴ、あるいはその生成および機能を抑制または亢進する物質は、ＣＰＳＦが関連するタンパク質合成の制御を可能にする。

イノシトールリン脂質代謝の制御

ＩＲＢＩＴはまた、ＰＩＰＫＩＩと結合して、該酵素の活性を抑制する（実施例２）。

ＰＩＰＫＩＩは、ホスファチジルイノシトール５リン酸（ＰＩ（５）Ｐ）からホスファチジルイノシトール４，５－二リン酸（ＰＩ（４，５）$Ｐ_2$）を合成する酵素であり、さらに$ＰＩＰ_2$の加水分解により$ＩＰ_3$が産生される。$ＩＰ_3$は、$ＩＰ_3$受容体のリガンドであり、該受容体に結合することによって、カルシウムイオン（$Ｃａ^{2+}$）とＩＲＢＩＴがともに細胞質内に放出されるという事実を考慮すると、ＩＲＢＩＴは、イノシトールリン脂質代謝の制御に関わっているということができる（Ｋａｔｊａ　Ａ．　Ｌａｍｉａら，Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．２００４，２４：５０８０－５０８７）。

したがって、ＩＲＢＩＴ、あるいはその生成および機能を抑制または亢進する

物質は、ＰＩＰＫＩＩが関係するイノシトールリン脂質代謝の制御を可能にする（図３）。

例えば、ＰＩＰＫＩＩは、哺乳動物において、ＰＩＰＫＩＩα、βおよびγの３種類のイソフォームを含むが、ＩＲＢＩＴはそのいずれの酵素にも結合する。特にＰＩＰＫＩＩβについては、その酵素をノックアウトしたトランスジェニックマウスが高いインスリン感受性をもつことから、該酵素の阻害が２型糖尿病の治療に有用であることが示されている（Ｋａｔｊａ　Ａ．　Ｌａｍｉａら，上記）。ＩＲＢＩＴがＰＩＰＫＩＩ活性を抑制するという、本発明者らによる知見は、ＩＲＢＩＴが２型糖尿病の治療に使用しうることを示している。

細胞内ｐＨの制御

ＩＲＢＩＴはさらに、ｐＮＢＣ１に結合し、それを活性化する。

具体的には、アフリカツメガエル卵母細胞にＩＲＢＩＴのｃＲＮＡとＮＢＣ１のｃＲＮＡを注入することにより細胞内ｐＨ変化で検出するｐＮＢＣ１の応答が、約６～７倍高い応答が得られた（図１４）。この結果は、ＩＲＢＩＴがｐＮＢＣ１活性を顕著に増強することを示した。

ＮＢＣ１は、細胞膜上に存在する１０回膜貫通型タンパク質であり、ナトリウムイオンと重炭酸イオンとを一定の割合で細胞膜を横切って同じ方向に運ぶ働きをする。生体内のｐＨは重炭酸イオンと炭酸ガスとの濃度バランスによって巧妙に調節されているので、ＮＢＣ１は生体内のｐＨの調節に関与していると考えられる（Ｅ．　ＧｒｏｓｓとＩ．　Ｋｕｒｔｚ，Ａｍ．　Ｊ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　Ｒｅｎａｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　２００２，２８３：Ｆ８７６－Ｆ８８７）。特に、血液のｐＨが酸性に傾く酸血症の一種である近位尿細管型アシドーシスの原因遺伝子としてＮＢＣ１が同定されたことは、ＮＢＣ１による重炭酸イオンの輸送が生体内のｐＨの維持に欠くことのできない役割を果たしていることを示している。

ＮＢＣ１には、これまでに腎臓型（ｋｉｄｎｅｙ　ｔｙｐｅ：ｋＮＢＣ１）と膵臓型（ｐａｎｃｒｅａｓ　ｔｙｐｅ：ｐＮＢＣ１）の２つのスプライシング変異体が報告されており、ｋＮＢＣ１は主に腎臓に、ｐＮＢＣ１は膵臓を中心として脳神経系を含めた比較的多くの組織に、それぞれ発現している。本発明者らはＩＲＢＩＴがどちらのＮＢＣ１のどの部分と結合するのか明らかにするために、

ＮＢＣ１の細胞質領域を大腸菌に組換え型タンパク質として発現させて精製し、培養細胞に強制発現したＩＲＢＩＴとの結合をプルダウン（ｐｕｌｌ－ｄｏｗｎ）アッセイで検討した。その結果、ＩＲＢＩＴはｐＮＢＣ１に特異的なＮ末側８５アミノ酸と特異的かつ強力に結合することがわかった（図１０）。更に特定の塩の濃度変化によってＩＲＢＩＴとｐＮＢＣ１の結合が制御されていることもわかった。

これらの結果は、種々の臓器におけるｐＮＢＣ１によるｐＨ調節をＩＲＢＩＴが細胞内の状況依存的に制御している可能性を強く示唆している。また、近位尿細管型アシドーシス患者は緑内障や白内障といった眼の疾患、低身長、精神遅滞、膵臓炎といった様々な症状を呈することから、ＮＢＣ１によるｐＨの調節が腎臓以外の臓器でも重要な役割を果たしていると考えられる。それゆえ、ＩＲＢＩＴは、ｐＮＢＣ１を介して緑内障や白内障などの眼の疾患、低身長、精神遅滞、膵臓炎などの疾患の治療法としても有用である（Ｓｅｔｈ Ｌ．Ａｌｐｅｒ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２００２，６４：８９９－９２３）。

したがって、ＩＲＢＩＴ、あるいはその生成および機能を抑制または亢進する物質は、ｐＮＢＣ１が関係する細胞内ｐＨの制御を可能にする。

ＩＰ$_3$受容体結合タンパク質（ＩＲＢＩＴ）

本発明で使用するＩＲＢＩＴは、哺乳動物由来のものである。ＩＲＢＩＴは、哺乳動物の脳、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、胸腺などの組織の細胞内小胞体に存在していることが知られている（日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報）。好ましいＩＲＢＩＴの例は、ヒトＩＲＢＩＴおよびマウスＩＲＢＩＴである（日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報、Ｈ．Ａｎｄｏら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００３，２７８：１０６０２－１０６１２）。特にヒトＩＲＢＩＴが好ましい。ヒトおよびマウスＩＲＢＩＴのアミノ酸および塩基配列は、ＧｅｎＢａｎｋにそれぞれＮＭ＿００６６２１（配列番号１、２参照）およびＮＭ＿１４５５４２（配列番号３、４参照）として登録されている。

また、好ましいＩＲＢＩＴの別の例は、配列番号１または配列番号３に示されるアミノ酸配列と９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、もっとも好ましくは９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつＩ

ＲＢＩＴと同等の生物学的活性を有するタンパク質である。ここで、生物学的活性は、Ｓ－アデノシルホモシステインのアデノシンとホモシステインへの可逆的加水分解を触媒するＳ－アデノシルホモシステインヒドロラーゼ様活性に加えて、タンパク質合成におけるＣＰＳＦとの結合を介するｍＲＮＡポリアデニレーションの制御、ＰＩＰＫＩＩとの結合を介するイノシトールリン脂質代謝の制御、およびｐＮＢＣ１との結合を介する細胞内ｐＨの制御を含む生物学的機能の制御に関わる活性をいう。

同様に、好ましいＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡの例は、配列番号２または配列番号４に示される塩基配列と９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、もっとも好ましくは９９％以上の同一性を有するＤＮＡ、あるいは、ストリンジェントな条件下で該配列番号２または配列番号４の塩基配列とハイブリダイズ可能なＤＮＡである。ここで、ストリンジェントな条件とは、以下のものに限定されないが、約４５～５０℃で２～６×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中でのハイブリダイゼーションと、それに続く、約５０～６５℃での０．２～２×ＳＳＣ／０．１～１％ＳＤＳによる洗浄からなるか、あるいは６０～６５℃で６×ＳＳＣ、Ｄｅｎｈａｒｄｔ溶液、０．２％ＳＤＳ中でのハイブリダイゼーションののち、６０～６５℃での０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳによる洗浄からなる（例えば、Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｂｅｌら，Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（３版）Ａ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｒｏｍ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１９９５年，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．）。

他の哺乳動物由来のＩＲＢＩＴもまた、本発明において使用可能である。そのようなＩＲＢＩＴは、例えばラット、ハムスター、ウサギなどの実験動物のＩＲＢＩＴ、イヌ、ネコなどのペット動物のＩＲＢＩＴ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなどの家畜動物のＩＲＢＩＴなどを含む。これらのＩＲＢＩＴの作製については、文献、データバンク等に記載のアミノ酸または塩基配列に基づいて、あるいはヒトまたはマウスＩＲＢＩＴの公知の配列に基づいて、プローブおよび／またはプライマーを作製し、ＤＮＡクローニング法、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣ

R）などの慣用の手法によって、例えば市販のまたは調製された動物組織からのライブラリーを用いて、ＩＲＢＩＴ　ｃＤＮＡをクローン化および／または増幅し、さらに、得られたＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡを、適当な制御配列を有する例えば市販の発現ベクター（例えばプラスミド）に組み込み、適当な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクションし、得られた細胞を、適当な培地にて培養してＩＲＢＩＴ　ＤＮＡを発現させ、生成したＩＲＢＩＴタンパク質を回収することができる。これらの一連の手法については、例えばＪ．　Ｓａｍｂｒｏｏｋら，　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，　１９８９年，　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｆ．　Ｍ．　Ａｕｓｂｅｌら，　Ｓｈｏｒｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　（３版）　Ａ　Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ　ｏｆ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｒｏｍ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，　１９９５年，　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，　Ｉｎｃ．、実験医学別冊４版松村正實ら編「新遺伝子工学ハンドブック」（２００３年）羊土社、東京、日本などに記載されており、ここに記載されるような手法に従って、種々の哺乳動物由来のＩＲＢＩＴホモログを得ることが可能である。

ＩＲＢＩＴ遺伝子を含む哺乳動物組織をホモゲナイザーを用いて均質化し、約１０，０００ｒｐｍで遠心分離して上清を得た後、例えばグアニジン・酸性フェノール法で全ＲＮＡを回収し、定法に従いｃＤＮＡを合成し、このｃＤＮＡからＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡを得ることができる。ＲＮＡの抽出のためのキット、例えば日本ジーン社のＩＳＯＧＥＮ（商標）、が市販されているので、それを利用してもよい。

ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡを検出するためのプローブのサイズは、通常３０塩基以上、好ましくは５０～１００塩基またはそれ以上である。プローブには、通常、蛍光標識（例えばフルオレサミン、ローダミンまたはそれらの誘導体）、放射性同位元素標識（例えば^{32}Ｐ）などの標識を結合し、これによって目的のＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡとプローブとの結合を検出することができる。

ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡを増幅するためのプライマーのサイズは、通常

１５～３０塩基、好ましくは２０～２５塩基である。プライマーは、ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の３’末端側に相補的な配列を有しているべきである。しかし、増幅すべきＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡの配列が不明の場合には、公知のＩＲＢＩＴ配列に基づいて複数のプライマーを準備し、ＰＣＲによって鋳型ＤＮＡを増幅し、さらに、増幅された鋳型ＤＮＡに基づいて正式のプライマーを作製し、ＰＣＲによって目的の鋳型ＤＮＡを増幅することができる。

ＰＣＲは、一般に、ＤＮＡの変性、プライマーのアニーリングおよび伸長反応を１サイクルとして約２０～４０サイクル行うことからなる。ＤＮＡの変性は、二本鎖ＤＮＡを一本鎖のＤＮＡに解離するための工程であり、通常９４℃で約１５秒～１分の処理を行う。プライマーのアニーリングは、プライマーと、相補的な一本鎖鋳型ＤＮＡとを対合させる工程である。アニーリングに至適な温度や時間はプライマーの塩基配列や長さに依存するが、通常約５５～６０℃で約３０秒～１分の処理を行う。伸長反応は、４種類のｄＮＴＰと耐熱性ＤＮＡポリメラーゼの存在下で鋳型ＤＮＡを伸長する工程であり、通常７２℃で約３０秒～１０分の処理を行う。サイクルを開始する前に、９４℃で約１～５分加熱し完全にＤＮＡを変性することもできる。また、全サイクルの終了後に、７２℃で約１～５分の加熱処理を行うこともできる。耐熱性ＤＮＡポリメラーゼは、市販されており、例えばＴｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｓ（Ｔａｑ）ポリメラーゼ（ＴａＫａＲａ、パーキンエルマー、ファルマシアなどから販売）を使用することができる。ＰＣＲの手法については、例えば蛋白質核酸酵素「ＰＣＲ法最前線　基礎技術から応用まで」第４１巻第５号１９９６年４月増刊号、共立出版、東京、日本を参照することができる。

発現ベクターは、原核生物または真核生物由来の細胞で使用可能な任意のベクターである。ベクターは、プロモーター、複製開始点、リボソーム結合部位、マルチクローニング部位、ターミネーターなどの制御配列を含むことができる。発現ベクターとしては、プラスミド、ウイルスなどのベクター、特に市販のベクター、例えばｐＧＥＸ－４Ｔ－１（アマーシャム・ファルマシア・バイオテック社）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ、ｐＨＳ１９、ｐＨＳ１５、ｐＧ－１およ

びｐＸＴ１（ストラタジーン社）、ｐＭＡＬおよびｐＴＹＢシリーズ（第一化学薬品）、ｐＱＥシリーズ（キアゲン社）、ｐＥＴシリーズ（ノバジェン社）、ｐＳＶＫ３およびｐＳＶＬ　ＳＶ４０（ファルマシア社）、ｐｃＤＮＡ１およびｐｃＤＭ８（フナコシ）、ｐＨＢ６、ｐＶＢ６、ｐＨＭ６、ｐＶＭ６およびｐＸＭ（ロシュダイアグノスティック社）などを適宜選択して使用することができる。

宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属、枯草菌などのバチルス属、シュードモナス属、コリネバクテリウム属などの細菌類、サッカロマイセス属、ピチア属、シゾサッカロマイセス属などの酵母類、昆虫細胞、植物細胞、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＨＥＫ２９３などの哺乳動物細胞などを挙げることができる。

ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡを宿主細胞に導入する方法には、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルス感染による方法などが含まれる（実験医学別冊４版松村正實ら編「新遺伝子工学ハンドブック」（２００３年）羊土社、東京、日本）。

より具体的には、マウスＩＲＢＩＴについて、成熟マウス小脳からのＩＲＢＩＴの精製、ｃＤＮＡクローニングおよび発現が日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報に記載されており、それらの開示を参照可能である。

ＩＲＢＩＴの生物学的活性は、ＩＲＢＩＴが、Ｓ－アデノシルホモシステインのアデノシンとホモシステインへの可逆的加水分解を触媒するＳ－アデノシルホモシステインヒドロラーゼと相同性を有するため、類似のアッセイ法に基づいて測定することができる。このアッセイ法は、例えばＣ．－Ｓ．　Ｙｕａｎら（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９６，２７１：２８００９－２８０１６）の方法に準ずることができる。簡単に説明すると、ＩＲＢＩＴ（約３μｇ）およびウサギＳ－アデノシルホモシステインヒドロラーゼ（シグマ社）（約２．５μｇ）を用いて上記の加水分解反応を行ない、その生成産物（ホモシステイン）を５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（シグマ社）と反応させて得られる発色を、４１２ｎｍで分光光度計にて測定し吸光度を求めることを含む。

ＩＲＢＩＴの発現／翻訳を制御する核酸

本発明において、ＩＲＢＩＴの発現／翻訳を制御する核酸には、ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡ、ＩＲＢＩＴをコードするｍＲＮＡのアンチセンスＲＮＡもし

くはその断片、ＩＲＢＩＴをコードするｍＲＮＡの切断を可能にするリボザイム、ｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡ）などの機能的ＲＮＡ、あるいは、それらのＤＮＡもしくはＲＮＡ（実際的には、ＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含むベクターＤＮＡが包含される。

ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡは、ヒト、マウスなどの哺乳動物由来のＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡであり、上記の「IP_3受容体結合タンパク質（ＩＲＢＩＴ)」の項で説明したような手法で作製することができる。好ましいＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡは、配列番号１または配列番号３に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡであり、さらに好ましいＤＮＡは、配列番号２または配列番号４に示される塩基配列からなるヒトまたはマウスＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡである。

ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡは、発現ベクター（例えばプラスミドまたはウイルスベクター）に挿入されて、細胞内でのＩＲＢＩＴの発現のために使用可能である。

ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡを発現するためのプラスミドベクターは、ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡ配列及びプロモーターの他に、薬剤耐性遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子など)、ターミネーター、マルチプルクローニングサイト、複製開始点、リボソーム結合部位などの制御配列を含むことができる。

また、ＩＲＢＩＴをコードするＤＮＡを発現するためのウイルスベクターは、たとえばアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター（白血病ウイルスベクターなど)、ヘルペスウイルスベクターなどを使用することができる。ウイルスベクターは、ヒトに使用する際に疾病を引き起こさないように例えば自己複製能を欠損したタイプのものが好ましい。たとえばアデノウイルスベクターの場合には、Ｅ１遺伝子及びＥ３遺伝子を欠失した自己複製能欠損型アデノウイルスベクター（例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社のｐＡｄｅｎｏ－Ｘ）を使用することができる。ウイルスベクターの構築は、文献記載の方法を利用することができる（米国特許第５２５２４７

９号、国際公開ＷＯ９４／１３７８８など)。

プロモーターは、哺乳動物細胞内で外来ＤＮＡの発現が可能なプロモーターを使用することができる。プロモーターの例は、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＥＦプロモーターなどを含む。

プラスミドベクターは、例えばリポフェクタミン、リポフェクチン、セルフェクチン、正電荷コレステロールなどの正電荷リポソームと複合体を形成しカプセル化された状態で患者の体内に導入することができる（例えば、中西守ら，蛋白質核酸酵素，４４巻１１号，４８～５４頁，１９９９年，共立出版、東京、日本；Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ ｒｅｓｅａｒｃｈ ５９：４３２５－４３３３，１９９９；Ｗｕら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９８７，２６２：４４２９)。また、ウイルスベクターは患部に導入し細胞感染させることによって細胞内に遺伝子導入することができる（Ｌ．Ｚｅｎｄｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２００３），１００：７７７９７－７８０２；Ｈ．Ｘｉａら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．（２００２），２０：１００６－１０１０；Ｘ．Ｆ．Ｑｉｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２００３），１００：１８３－１８８；Ｇ．Ｍ．Ｂａｒｔｏｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．，Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２００２），９９：１４９４３－１４９４５；Ｊ．Ｄ．Ｈｏｍｍｅｌら，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．（２００３），９：１５３９－１５４４)。特にアデノウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルスベクターは種々の細胞種に非常に高い効率で遺伝子導入可能であることが確認されている。このベクターはまた、ゲノム中に組み込まれることがないため、その効果は一過性であり安全性も他のウイルスベクターと比べて高いと考えられる。

さらに、ＩＲＢＩＴをコードするｍＲＮＡのアンチセンスＲＮＡもしくはその断片は、ＩＲＢＩＴ遺伝子のＩＲＢＩＴタンパク質への翻訳を阻害することが可能である。

前記断片は、ＩＲＢＩＴ遺伝子又はｍＲＮＡの配列において連続する約３０塩基以上、５０塩基以上、７０塩基以上、１００塩基以上、１５０塩基以上、２０塩基以上又は２５０塩基以上から全長以下の塩基数からなる配列を含むことができる。

アンチセンスＲＮＡもしくはその断片は、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素又はヨウ素)、メチル、カルボキシメチル又はチオ基などの修飾基を含むことができる。

上記アンチセンス核酸は、周知のＤＮＡ／ＲＮＡ合成技術又はＤＮＡ組換え技術を用いて合成することができる。ＤＮＡ組換え技術によって合成する場合、ＩＲＢＩＴの塩基配列を含むベクターＤＮＡを鋳型にして、増幅しようとする配列を挟み込むプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を行って標的配列を増幅し、必要に応じてベクター中にクローニングして、アンチセンスＤＮＡを生成することができる。あるいは、このようにして得られた増幅標的配列を有するＤＮＡをベクターに挿入し、該ベクターを真核又は原核細胞に導入し、その転写系を利用してアンチセンスＲＮＡを得ることができる。

同様の阻害はまた、ＩＲＢＩＴをコードするｍＲＮＡの切断を可能にするリボザイム、ｓｉＲＮＡなどの機能的ＲＮＡによっても可能である。

ｓｉＲＮＡは、例えば配列番号２（ヒトＩＲＢＩＴ）または配列番号４（マウスＩＲＢＩＴ）の塩基配列によってコードされるｍＲＮＡ配列からの連続する約１８～３０、好ましくは約１９～２５、さらに好ましくは約２０～２３ヌクレオチドのセンス鎖配列と、その相補的配列であるアンチセンス鎖配列とを含むことができる。ここで、センス鎖配列とは、前記ｍＲＮＡの標的サイトと同一の塩基配列をいい、また、アンチセンス鎖配列とは、このセンス鎖配列に相補的な塩基配列をいう。センス鎖とアンチセンス鎖は互いに対合して二本鎖のｓｉＲＮＡを形成することができる。ｓｉＲＮＡはさらに、センス鎖およびアンチセンス鎖の各３’末端に１～５個の塩基からなるオーバーハング、例えばＵＵを含むことができる。

ｓｉＲＮＡのセンス鎖配列を選択するためには、例えば標的ＩＲＢＩＴ ｍＲＮＡの標的サイトの選択のための公知の知識、例えば、（ａ）ＧＣ含量が約３０～７０％、好ましくは約５０％である、（ｂ）すべてのヌクレオチドが均等であり、またＧが連続していない、（ｃ）アンチセンス鎖の５’末端のヌクレオチドがＡ、Ｕである、などの基準を使用することができる（Ｄ．Ｍ．Ｄｙｋｘｈｏｏｒｎら，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．（２００３），７７：７１７４－７１８１；Ａ．Ｋｈｖｏｒｏｖａら，Ｃｅｌｌ（２００３），１１５：２０

９－２１６)。また、ＲＮＡ二次構造予測プログラムであるｍｆｏｌｄを用いて上記ｓｉＲＮＡの標的サイトであるＩＲＢＩＴ　ｍＲＮＡ上の候補遺伝子部位を推定することもできる（Ｊ．Ａ．Ｊａｅｇｅｒら，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１９８９，１８３：２８１－３０６；Ｄ．Ｈ．Ｍａｔｈｅｗｓら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９９，２８８：９１１－９４０)。例えば、ｓｉＲＮＡが標的とすることができる配列は、上記の知見に基づいて推定し、実際にその効果を確認することによって決定することができる。本発明で使用可能なｓｉＲＮＡは、非限定的な例として以下の配列を挙げることができる。

IRBIT siRNA-1: AAAUCCAGUUUGCUGAUGACA(配列番号５)

IRBIT siRNA-2: AACUCAGAAUGAAGUAGCUGC(配列番号６)

ｓｉＲＮＡは、周知の化学合成技術を用いて合成することができる。例えば、慣用のＤＮＡ／ＲＮＡ自動合成装置を使用して化学的に合成するか、あるいは、ｓｉＲＮＡ関連の受託合成会社（例えばフナコシ株式会社（東京、日本)、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ社、Ａｍｂｉｏｎ社など）に合成を委託することによって入手可能である。

ｓｉＲＮＡを細胞または組織内に導入するときには、ｓｉＲＮＡを直接細胞または組織内に注入するか、又はｓｉＲＮＡの発現が可能なベクターを使用することが好ましい。あるいは、ｓｉＲＮＡ又はベクターを、リポソーム、例えばリポフェクタミン、リポフェクチン、セルフェクチン及びその他の正電荷リポソーム（例えば、正電荷コレステロール)、又はマイクロカプセル、と複合体形成し、これを使用することもできる（例えば、中西守ら，蛋白質核酸酵素，４４巻１１号，４８～５４頁，１９９９年，共立出版、東京、日本；Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　ｒｅｓｅａｒｃｈ　５９：４３２５－４３３３，１９９９；Ｗｕら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９８７，２６２：４４２９)。

ｓｉＲＮＡを発現するためのベクターでは、ｓｉＲＮＡまたはその前駆体をコードするＤＮＡ配列をプロモーターの調節下に含む。

発現ベクターの１つの例は、ヘアピン型ベクターである。このベクターは、前記センス鎖ＲＮＡ配列と前記アンチセンス鎖ＲＮＡ配列とが一本鎖ループ配列を介して共有結合されているヘアピン型ＲＮＡをコードするＤＮＡを含み、ここで

該ＤＮＡは、細胞内で転写により該ヘアピン型ＲＮＡを形成し、ダイサーによりプロセシングされて前記ｓｉＲＮＡを形成するベクターである。ｓｉＲＮＡをコードするヘアピン型ＤＮＡの３’末端には、転写停止シグナル配列として、あるいはオーバーハングのために、１～６個、好ましくは１～５個のＴからなるポリＴ配列が連結される。ベクターＤＮＡから転写されたｓｉＲＮＡ前駆体としてのショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）は、そのアンチセンス鎖の３’末端に２～４個のＵからなるオーバーハングを有することが望ましく、オーバーハングの存在によって、センス鎖ＲＮＡ及びアンチセンス鎖ＲＮＡはヌクレアーゼによる分解に対して安定性を増すことができる。ヒトには内在性のダイサーが１つ存在し、これが長鎖ｄｓＲＮＡや前駆体マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）をそれぞれｓｉＲＮＡと成熟ｍｉＲＮＡに変換する役割をもつ。プロモーターの例は、ｐｏｌ　ＩＩプロモーター、例えばヒトもしくはマウス由来のＵ６プロモーター又はＨ１プロモーター、ｐｏｌ　ＩＩプロモーター、或いはサイトメガロウイルスプロモーターである。

発現ベクターの別の例は、タンデム型ベクターである。このベクターは、前記ｓｉＲＮＡを構成するセンス鎖ＲＮＡ配列をコードするＤＮＡ配列とアンチセンス鎖ＲＮＡ配列をコードするＤＮＡ配列とを連続して含み、かつ各鎖の５’末端にプロモーターが、また各鎖の３’末端にポリＴ配列がそれぞれ連結されたＤＮＡを含み、ここで該ＤＮＡは、細胞内で転写後に該センス鎖ＲＮＡと該アンチセンス鎖ＲＮＡとがハイブリダイズして前記ｓｉＲＮＡを形成するベクターである。

タンデム型ベクターにおけるプロモーターの例は、ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、例えばヒトもしくはマウス由来のＵ６プロモーター又はＨ１プロモーター、或いはサイトメガロウイルスプロモーターである。また、ポリＴ配列は、１～６個、好ましくは１～５個のＴからなるポリＴ配列である。タンデム型ベクターは、細胞内に導入されたのち、センス鎖とアンチセンス鎖に相当するＲＮＡに転写され、互いにハイブリダイズして目的のｓｉＲＮＡを生成することができる。

上記ヘアピン型及びタンデム型ベクターは、プラスミドベクター又はウイルスベクターである。プラスミドベクターは、後述の実施例に記載の手法又は文献記載の方法を用いて調製してもよいし、或いは市販のベクター系、たとえばｐｉＧ

ＥＮＥ^{TM}Ｕ６系ベクター及びｐｉＧＥＮＥ^{TM}Ｈ１系ベクター（タカラバイオ株式会社、京都、日本）を利用することもできる（Ｔ．Ｒ．Ｂｒｕｍｍｅｌｋａｍｐら，Ｓｃｉｅｎｃｅ（２００２），２９６：５５０－５５３；Ｎ．Ｓ．Ｌｅｅら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．（２００２），２０：５００－５０５；Ｍ．Ｍｉｙａｇｉｓｈｉら，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２００２），２０：４９７－５００；Ｐ．Ｊ．Ｐａｄｄｉｓｏｎら，Ｇｅｎｅｓ＆Ｄｅｖ．（２００２），１６：９４８－９５８；Ｔ．Ｔｕｓｃｈ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ（２００２），２０：４４６－４４８；Ｃ．Ｐ．Ｐａｕｌら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．（２００２），２０：５０５－５０８；多比良和誠ら編、ＲＮＡｉ実験プロトコル、羊土社（東京、日本）、２００３年）。

本発明の組成物の有効成分である別の核酸は、リボザイムである。リボザイムは、触媒活性をもつＲＮＡであり、本発明の標的ＩＲＢＩＴ遺伝子に対応するｍＲＮＡを切断する活性を有している。この切断によって該遺伝子の発現が阻害又は抑制される。

リボザイムの切断可能な標的配列は、一般にはＮＵＸ（Ｎ＝Ａ，Ｇ，Ｃ，Ｕ；Ｘ＝Ａ，Ｃ，Ｕ）、例えばＧＵＣトリプレットを含む配列であることが知られている。このようなリボザイムには、ハンマーヘッド型リボザイムが含まれる。ハンマーヘッド型リボザイムは、センサー部位を構成するヌクレオチド配列、センサー部位にＲＮＡが結合したときのみ安定にMg^{2+}イオンを捕捉する空洞を形成しうる領域を含むヌクレオチド配列、及び標的ＲＮＡの切断部位周辺の配列に相補的である領域を含むヌクレオチド配列を含むことができる。

本発明のリボザイムを細胞内または患者体内に送達するために、リボザイムをリポソーム（好ましくは、正電荷リポソーム）に封入する（日本国特開平９－２１６８２５号公報（１９９７年））、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込む（日本国特表２００２－５４２８０５号公報）などの方法によってドラッグデリバリー系を構築することができる。

リボザイムは、それが発現可能なようにベクターに組み込むことができる。リボザイムを発現するためのプロモーターには、ｐｏｌ ＩＩ又はｐｏｌ ＩＩＩプロモーターが含まれる。好ましいプロモーターは、ｐｏｌ ＩＩＩプロモータ

ー、例えば哺乳動物由来のｔＲＮＡプロモーター、より好ましくはｔＲＮＡ^{Val}プロモーターである（Ｓ．Ｋｏｓｅｋｉら，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７３：１８６８－１８７７，１９９９）。

抗体

ＩＲＢＩＴに対する抗体又はその断片もまた、上記生物学的機能の制御のために使用できる。

このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え型抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、二重特異抗体、合成抗体などが含まれる。

抗体のクラス、サブクラスは任意のタイプでよく、例えばＩｇＧ，ＩｇＭ，ＩｇＥ，ＩｇＤ，ＩｇＡ、ＩｇＧ$_1$，ＩｇＧ$_2$，ＩｇＧ$_3$，ＩｇＧ$_4$，ＩｇＡ$_1$，ＩｇＡ$_2$などが含まれる。

抗体はまた、ペグ化、アセチル化、グリコシル化、アミド化などによって誘導体化されていてもよい。

ポリクローナル抗体の作製は、ＩＲＢＩＴを免疫原（約１μｇ～１００μｇ）として、必要に応じてＦｒｅｕｎｄの完全もしくは不完全アジュバント、水酸化アルミニウム（ａｌｕｍ）、ムラミルジペプチド、リピドＡなどのアジュバントを含む油中水型乳濁液を、ウサギ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどの非ヒト動物に皮内もしくは静脈内に免疫注射し、約２～４週間後に、アジュバント非含有のＩＲＢＩＴを１～２回注射し、ブーストを行う。試験的に採血し、抗体価が十分に上がったことを確認したあとで、動物から採血し、遠心分離により抗血清を回収する。必要に応じて、硫安分画、ＤＥＡＥイオン交換クロマトグラフィーなどにより精製しＩｇＧを得ることができる。

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの作製は、ケラーとミルシュタインの方法（Ｎａｔｕｒｅ　１９７５，　２５６：４９５－４９７）に準じて行うことができる。すなわち、ハイブリドーマは、免疫感作された動物から脾臓またはリンパ節を取り出し、それに含まれる抗体産生細胞と、マウス、ラット、モルモットなどの哺乳動物に由来のミエローマ細胞との細胞融合、ＨＡＴ選択によって得ることができる。細胞融合は、例えばポリエチレングリコール（例えば分

子量１５００～６０００）を用いて行うことができる。目的の抗体の産生は、ハイブリドーマの培養上清の免疫抗原に対する反応性を酵素免疫測定法、放射性免疫測定法、蛍光抗体法などの慣用の方法を用いて測定することができる。

また、ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の作製は、ハイブリドーマをｉｎ ｖｉｔｒｏで培養してその培養上清から単離してもよいし、あるいはマウス、ラット、モルモットなどの腹水等でｉｎ ｖｉｖｏで培養し、腹水から単離してもよい。

あるいは、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングしたのち、これをベクターに組み込み、哺乳動物細胞（例えばＣＨＯ）などに導入し、組換え型抗体を作製することもできる（Ｐ．Ｊ．Ｄｅｌｖｅｓら，ＡＮＴＩＢＯＤＹ ＰＲＯＤＵＣＴＩＯＮ ＥＳＳＥＮＴＩＡＬ ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ．，１９９７，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ）。

ヒト抗体は、例えばファージジスプレイライブラリー（ｐｈａｒｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｙ）法（Ｔ．Ｃ．Ｔｈｏｍａｓら，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３３：１３８９－１４０１，１９９６）又はヒト抗体産生動物（例えばマウス、ウシなど）を用いる方法（Ｉ． Ｉｓｈｉｄａら，Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ４：９１－１０２，２００２）によって製造できる。

例えば、ヒト抗体産生マウスは、ヒト人工染色体にヒト抗体産生遺伝子を含むヒト染色体断片を導入したのち、ミクロセル法を用いて例えばマウス胚性幹細胞ゲノムに人工染色体を組み込み、組換え胚性幹細胞を胚盤胞に注入し、仮親マウスの子宮に移植し、キメラマウスを出産し、雌雄のキメラマウス、またはキメラマウスと野生型マウス、の交配を通して、ヒト抗体遺伝子を含み、したがってヒト抗体の産生が可能である、ホモ接合型の子孫マウスを作出するなどの方法によって作製することができる（例えば、日本国再表０２／０９２８１２号公報、国際公開ＷＯ ９８／２４８９３、ＷＯ ９６／３４０９６など）。このヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、本発明のＩＲＢＩＴタンパク質を抗原として免疫したのち、脾臓を摘出し、この脾臓細胞とマウスミエローマ細胞とを融合してハイブリドーマを形成し、目的のモノクローナル抗体を選抜することができる。

ファージディスプレイライブラリー法は、未処置のヒトリンパ細胞から直接手

に入れた免疫グロブリン遺伝子のライブラリーから、目的の抗体をコードするＤＮＡをスクリーニングし、このＤＮＡと、抗体鎖との間に、ファージ粒子を用いて物理的会合を確立し、これによって、標的に親和性をもつ抗体を提示するファージを親和性スクリーニングによって富化することを含む。この方法を用いて、標的に対する結合親和性をもつ抗体を、通常の手法によって大量に合成することができる（例えば、日本国特表２００３－５２７８３２号公報）。

本発明の組成物は、疾患または障害の治療のために用いることができる。

治療用組成物

本発明において、該疾患または障害とは、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝、および細胞内ｐＨの異常によって引起されるものである。

タンパク質合成の場合、ＣＰＳＦに対するＩＲＢＩＴの結合に伴うタンパク質合成の制御が挙げられる。この場合、ＩＲＢＩＴはタンパク質合成を亢進し、ＩＲＢＩＴの働きを抑制する物質（上記の核酸または抗体）はタンパク質合成を抑制することができる。ＣＰＳＦが関与するタンパク質合成の異常には、例えば腫瘍がある。

イノシトールリン脂質代謝の場合、ＰＩＰＫＩＩの異常な活性化に伴う疾患、例えば２型糖尿病が挙げられる。ＩＲＢＩＴはＰＩＰＫＩＩ活性を抑制する作用があるため、２型糖尿病の治療のために使用できる。

細胞内ｐＨの場合、細胞内のｐＨの維持にｐＮＢＣ１が重要な働きをしているが、特にｐＨが酸性に傾くことによる疾患に、緑内障や白内障などの眼の疾患、低身長症、精神遅滞、膵臓炎などの疾患が含まれる。ＩＲＢＩＴは、ｐＮＢＣ１と結合し、細胞内ｐＨの正常な状態への調節を可能にする。

本発明の組成物中の有効成分の含有量は、制限されないが、約１μｇ～１００ｍｇである。その含有量は、有効成分の種類に応じて変化しうる。

本発明の組成物中のＩＲＢＩＴの用量は、１投与単位あたり約１μｇ～１ｍｇ、好ましくは約５０μｇ～５００μｇであるが、この範囲に限定されない。

本発明の組成物中の核酸の用量は、ｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はリボザイムに換算すると、以下のものに限定されないが、１投与単位あたり、約１ｎＭ～１００μＭ、好ましくは約１０ｎＭ～５０μＭである。

本発明の組成物中の抗体又はその断片の用量は、以下のものに限定されないが、１投与単位あたり、約１～１００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは約５～７０ｍｇ／ｍｌである。

しかし、上記の用量又は投与量は、患者の状態、年齢、性別、重篤度などに応じて変化しうるものであり、専門医の判断により用量又は投与量が決定されるべきである。

本発明の組成物は、通常、製薬上許容可能な担体（すなわち、賦形剤又は希釈剤）、例えば滅菌された水、生理食塩水、緩衝液、非水性液体（例えば、アーモンド油、植物油、エタノールなど）などを含むことができる。該組成物にはさらに、製薬上許容可能な安定剤（例えばメチオニンなどのアミノ酸類）、保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチル、ソルビン酸）、等張化剤（例えば塩化ナトリウム）、乳化剤（例えばレシチン、アラビアガム）、懸濁化剤（例えばセルロース誘導体）などを含有させることができる。

好ましい医薬製剤は、溶液剤、懸濁液剤、乳剤などである。

本発明の組成物の投与方法は、経口投与、非経口投与、例えば静脈内投与、局所投与などを含む。局所投与には、外科手術又は内視鏡下で患部に直接注射する方法などが含まれる。また、専門医が決定した治療計画に基づいて、一定の時間間隔、例えば１週間、２週間、３週間、１ヶ月、２ヶ月、６ヶ月、１年などの間隔で、患者に対して、本発明の組成物を１～数回に分けて投与することができる。

また、患者への抗体又はその断片の送達は、単独か又は例えばリポソーム（好ましくは、正電荷リポソーム）、マイクロカプセル又はナノ粒子中に抗体又はその断片を封入した形態で、通常は適当な担体（賦形剤又は希釈剤）と組み合わせて、経口経路、非経口経路（例えば、静脈内投与又は局所投与）にて行うことができる。

本発明の組成物は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｅｘ　ｖｏｖｏで使用可能である。

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでは、治療用物質のスクリーニングのために、本発明の組成物を利用することができる（下記参照）。

ｅｘ　ｖｏｖｏでは、一旦患者から生体外に取り出された細胞や組織を、本発

明の有効成分で処理した後、体内に戻すことができる。これによって、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝または細胞内ｐＨの異常が生じた細胞や組織を正常に復することが可能となる。

２．ＩＲＢＩＴの使用例

本発明はまた、ＩＲＢＩＴをｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏで使用する下記の方法を提供する。

第１に、本発明は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内のタンパク質合成の制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法を提供する。

この方法は、ＩＲＢＩＴがＣＰＳＦに結合してＣＰＳＦの機能を制御するという作用をもつことに基づく。

第２に、本発明は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内のイノシトールリン脂質代謝の制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法を提供する。

この方法は、ＩＲＢＩＴがＰＩＰＫＩＩ活性を抑制するという作用をもつことに基づく。

第３に、本発明は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内ｐＨの制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法を提供する。

この方法は、ＩＲＢＩＴがｐＮＢＣ１を活性化するという作用をもつことに基づく。また、ｐＮＢＣ１の活性化には、ＩＲＢＩＴのリン酸化が必要である。

上記のとおりＩＲＢＩＴは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでは、細胞内でのタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝または細胞内ｐＨの制御を可能にする物質のスクリーニングのために使用できるし、また、ｅｘ　ｖｉｖｏでは、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝または細胞内ｐＨの異常が生じた細胞や組織を正常な状態に戻すために使用することができる。

３．スクリーニング

本発明はさらに、候補物質の存在下で、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１との結合を測定し、該結合を抑制または亢進する物質を同定することを含む、物質のスクリーニング方法を提供する。

上記結合は、試験管内で、あるいは細胞（特に哺乳動物細胞）内で、候補物質の存在下でＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１との結合を測

定することができる。哺乳動物細胞には、例えばＣＨＯ、ＣＯＳ、ＨＥＫ２９３、ＨｅＬａ、ＮＩＨ３Ｔ３などが含まれる。

同定された物質は、例えば治療用または診断用として使用できる。特に、該物質は、細胞内のタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝および細胞内ｐＨからなる群から選択される少なくとも１つの細胞内生物学的機能を制御するものである。

上記結合を試験管内で実施するときには、例えば、適当なバッファ中に、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１とを存在させ、これに候補物質を加え、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１との結合のレベルを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびイッムノブロット法で検出することができる。この系は、上記結合を抑制または阻害する物質の検出に有効である。ＩＲＢＩＴ、ＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１の組換えタンパク質の作製は、上記のＩＲＢＩＴの項で記載したと同様の手法で行うことができる。

上記結合を細胞内で実施するときには、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１とを同時にまたは別個に発現させうるように、それぞれのタンパク質をコードするＤＮＡを同一のまたは異なるベクターに組込み、該ベクターで哺乳動物細胞を形質転換またはトランスフェクションする。翻訳されたタンパク質は細胞内、特に細胞質に存在するように、好ましくは、ベクターＤＮＡは分泌シグナル配列を含まないようにするのがよい。

ＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１のアミノ酸および塩基配列は、ＧｅｎＢａｎｋや文献などから入手可能であり、それぞれ例えば（ＡＢ０９２５０４）、（ＡＦ０３０５５８、ＡＦ０３３３５５）、（ＮＭ＿００３７５９、ＮＭ＿０１８７６０）の登録番号が付与されている。ＩＲＢＩＴのアミノ酸および塩基配列については、上記のとおりである。

発現ベクターは、好ましくは哺乳動物細胞で使用可能な任意のベクターである。ベクターは、プロモーター、エンハンサー、複製開始点、リボソーム結合部位、マルチクローニング部位、ターミネーター、ポリＡシグナルなどの制御配列を含むことができる。発現ベクターとしては、ｐＳＧ５、ｐＸＴ１（ストラタジーン社）、ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧおよびｐＳＶＬ　ＳＶ４０（ファルマシア

社)、ｐＨＭ６、ｐＶＭ６およびｐＸＭ（ロシュダイアグノスティック社）などの市販のベクターを適宜選択して使用することができる。

プロモーターには、例えばＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＥＦプロモーターなどが含まれる。

ＩＲＢＩＴ、ＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１をコードするＤＮＡを宿主細胞に導入する方法には、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルス感染による方法などが含まれる（実験医学別冊４版松村正實ら編「新遺伝子工学ハンドブック」（２００３年）羊土社、東京、日本)。

或いは、公知の手法により非ヒト動物の卵母細胞または胚性幹細胞を使用してＩＲＢＩＴ遺伝子を外来的にゲノムに組込み、強制的に発現可能にしたトランスジェニック非ヒト動物（例えばマウス)、ならびに、ＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１遺伝子を外来的にゲノムに組込み、強制的に発現可能にしたトランスジェニック非ヒト動物（例えばマウス）をそれぞれ作製し、両動物を交配して、ＩＲＢＩＴ遺伝子と、ＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１遺伝子とを発現可能にしたキメラ非ヒト動物およびその子孫を作製することができる。

細胞内またはトランスジェニック非ヒト動物内で強制的に発現されたＩＲＢＩＴと、ＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１との結合が、細胞内または動物内に取り込んだ候補物質の存在下でどのように影響を受けるかを、該結合をプルダウン法、免疫沈降法などによって測定することによって調べる。同時に、ある特定のタンパク質の細胞内合成に及ぼす影響、イノシトールリン脂質代謝に及ぼす影響、細胞内のｐＨに及ぼす影響を調べる。

タンパク質の細胞内合成に及ぼす影響は、例えば、特定のタンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法などによって測定することができる。

イノシトールリン脂質代謝に及ぼす影響は、例えば［^{3}Ｈ］ラベル、あるいはＰＩＰ２結合タンパク質を用いたＰＩＰ２量定量などによって測定することができる。

細胞内のｐＨに及ぼす影響は、例えば蛍光ｐＨ指示薬を用いた細胞内ｐＨ測定などによって測定することができる。

候補物質は、有機小分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）などを含むが、これらに限定されない。

上で説明したように、ＩＲＢＩＴは、細胞内での代謝、ｐＨ変化、イオンバランス、リン脂質代謝の調節、タンパク質合成の制御、Ca^{2+}放出の制御などを調節する上で大変重要な意義を全ての細胞で有している。ＩＲＢＩＴの濃度や発現パターンを制御することにより、上記の様々な生物学的機能を制御しうることが今回判明した。本発明のスクリーニング法で同定される物質は、このような制御のために有用である。

実施例

本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって限定されないものとする。

＜実施例１＞

細胞質内ｐｏｌｙ（Ａ）付加反応へのＩＲＢＩＴの関与

ＣＰＳＦは、ＣＰＳＦ１６０、ＣＰＳＦ１００、ＣＰＳＦ７３およびＣＰＳＦ３０の４つのサブユニットからなる複合タンパク質群であるため、まず、この４つのサブユニットの内、どのサブユニットに結合するのかを明らかにするために、各サブユニットにｍｙｃタグを付けたｃＤＮＡを様々のコンビネーションで、ＩＲＢＩＴと共にＣＯＳ細胞等に発現し、ＩＲＢＩＴまたはＣＰＳＦを免疫沈降した時の共沈のされ方を調べた。

ＣＰＳＦは、マウス由来のＣＰＳＦであり、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＢ０９２５０４の全長および４つの各サブユニットの塩基配列に基づき、ＲＴ－ＰＣＲによってクローニングした（Ｈ．　Ａｎｄｏら，２００３，上記）。また、ＩＲＢＩＴは、マウス由来のＩＲＢＩＴであり、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＮＭ＿１４５５４２の塩基配列に基づき、ＲＴ－ＰＣＲによってクローニングした（Ｈ．　Ａｎｄｏら，２００３，上記）。

ＣＰＳＦの全長または各サブユニットをコードするｃＤＮＡに、ｍｙｃタグをコードするＤＮＡを融合したＤＮＡを作製し、哺乳動物用ベクターに挿入した。

一方、ＩＲＢＩＴをコードするｃＤＮＡもまた、同じベクターに挿入した。作製されたベクターを、ＣＯＳ細胞に形質転換し、上記ＤＮＡを共発現した。

細胞を遠心分離によって分離し、細胞を溶解し、細胞質画分を回収し、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦとの結合を、抗ＩＲＢＩＴ抗体（日本国特許出願公開第２００４－１２９６１２号公報）および抗ｍｙｃ抗体を用いて検出した。

その結果、ＩＲＢＩＴは、ＣＰＳＦ１６０サブユニットを介して、ＣＰＳＦと結合することが判明した（図１）。

さらにまた、ＣＰＳＦ１６０の欠失変異体を使った同様の実験から、ＩＲＢＩＴはＣＰＳＦ１６０のｍＲＮＡ結合部位に結合することが判明した（図２）。

ＣＰＳＦ１６０のｍＲＮＡ結合部位は、ＣＰＳＦがｐｏｌｙ（Ａ）を付加するｍＲＮＡを認識する際に必須の領域であることから、ＩＲＢＩＴがこの領域に結合することは、ＩＲＢＩＴがＣＰＳＦ機能を阻害する可能性があり、これを確かめるために、精製蛋白質を用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏ再構成系で、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦとの結合、及びそれによるポリアデニレーション反応への影響を調べた。

ＣＰＳＦは、ｍＲＮＡのポリアデニレーション反応に必須の分子であるが、それが働く場所は主に核の中であり、ＤＮＡから転写されたばかりのＲＮＡに対して、それがｍＲＮＡとなって核外へ出て行くまでの成熟反応の一つとして、働く。しかし例外的に、卵母細胞の成熟過程、あるいは、神経細胞の局所での新たなタンパク質合成といった局面では、細胞質でｍＲＮＡのポリアデニレーションに関与し、ｐｏｌｙ（Ａ）の長さを調節することで、目的分子のタンパク質合成を調節する（Ｄａｒｏｎ　Ｃ．　Ｂａｒｎａｒｄら，Ｃｅｌｌ　２００４，１１９：６４１－６５１）。この細胞質内ポリアデニレーション反応は、例外的現象であるが、卵母細胞の成熟、神経可塑性を成立させる上では、必須の現象となっている。ＩＲＢＩＴの細胞内分布を調べてみると、核内には殆ど存在しないことから、本発明者らは、ＩＲＢＩＴの細胞質内ポリアデニレーション反応への関与に焦点を絞って検討した。

細胞質内ポリアデニレーション反応を調べる上で、Ｘｅｎｏｐｕｓ卵母細胞の系が優れていることから、本発明者らは、先ず、Ｘｅｎｏｐｕｓ卵母細胞からのＩＲＢＩＴ　ｃＤＮＡのクローニングおよび単離を、定法に従って行った。Ｘｅ

ｎｏｐｕｓ卵母細胞には、哺乳動物細胞とは異なり、３種類のＩＲＢＩＴ mRＮＡが発現しており、この３種類とも、ＣＰＳＦ１６０と結合することが判明した。

IP_3受容体mＲＮＡの３’末端は、細胞質内ポリアデニレーション反応を受ける可能性のある配列を有しており、実際、小脳Ｐｕｒｋｉｎｊｅ細胞では、樹状突起内にこのmＲＮＡが存在している。このことは、IP_3受容体から放出されたＩＲＢＩＴがＣＰＳＦとの結合を介して、IP_3受容体自身のタンパク質合成を制御している可能性を示している。

さらに、本発明者らは、ＩＲＢＩＴが、ＰＡＰ及びＦｉｐ１（ＣＰＳＦのサブユニット）の存在下でのポリアデニレーション活性（Ｉ． Ｋａｕｆｍａｎｎら，ＥＭＢＯ Ｊ．（２００４）２３：６１６－６２６）をさらに増大させる働きがあることを見出した。

上記の結果から、ＩＲＢＩＴが、細胞内でＣＰＳＦとの結合を介して、タンパク質合成を制御していることが示された。

＜実施例２＞

ＩＲＢＩＴとＰＩＰキナーゼＩＩ型（ＰＩＰＫＩＩ）との相互作用

本発明者らはさらに、ＩＲＢＩＴと相互作用する分子を探索した。

実施例１と同様の手順で、ＨＥＫ２９３細胞にＦＬＡＧ－ＩＲＢＩＴを過剰発現し、抗ＦＬＡＧ抗体で免疫沈降してＩＲＢＩＴと共沈してくるタンパク質を、質量分析器で解析した。その結果、リン脂質リン酸化酵素であるｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ－５－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ４－ｋｉｎａｓｅγ（ＰＩＰＫＩＩγ）が同定された。ＰＩＰＫＩＩファミリー（ＰＩＰＫＩＩα，ＰＩＰＫＩＩβ，ＰＩＰＫＩＩγ）はPIP_2を合成する酵素であり、PIP_2の加水分解によりIP_3が産生されることを考えると、IP_3受容体、ＩＲＢＩＴ、ＰＩＰＫＩＩγからなる情報伝達機構が存在する可能性が考えられる（図３）。

さらに、次の実験を行い、同時にその結果も以下に示す。

（１）マウスＩＲＢＩＴとＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩα，β，γをＣＯＳ－７に過剰発現し、免疫沈降を行った。具体的には、Ｌｙｓｉｓバッファー（１０mＭ Ｈｅｐｅｓ，１００mＭ ＮａＣｌ，２mＭ ＥＤＴＡ，１％Ｐ－４０，ｐＨ７．

４）で細胞を可溶化し、遠心（２００００×ｇ，３０分）して上清を回収後、抗Ｍｙｃ抗体あるいは抗ＩＲＢＩＴ抗体を添加し、１時間反応させた。さらにプロテインＧセファロースを添加して１時間反応後、免疫複合体をＬｙｓｉｓバッファーで洗浄し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥサンプルバッファーで溶出した。その後、抗Ｍｙｃ抗体あるいは抗ＩＲＢＩＴ抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、ＩＲＢＩＴはＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩα，β，γのいずれとも共沈した（図４）。

（２）マウス小脳から抗ＩＲＢＩＴ抗体で免疫沈降を行ったところ、ＰＩＰＫＩＩαが共沈した（図５）。その結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＩＲＢＩＴとＰＩＰＫＩＩとの結合が確認された。

（３）マウスＩＲＢＩＴとＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩγをＣＯＳ－７に過剰発現し、免疫染色を行った。具体的には、４％パラフォルムアルデヒドで固定、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で膜透過処理、２％ヤギ血清でブロッキング処理を行った後、マウス抗Ｍｙｃ抗体およびウサギ抗ＩＲＢＩＴ抗体を添加し、室温で１時間反応させた。Ａｌｅｘａ４８８結合抗マウスＩｇＧ抗体およびＡｌｅｘａ５９４結合抗ウサギＩｇＧ抗体を二次抗体として添加し、３７℃で４５分反応させた。その結果、ＩＲＢＩＴとＭｙｃ－ＰＩＰＫＩＩγのいずれも細胞質に局在することが判かった（図６）。

（４）マウスＩＲＢＩＴの欠失変異体（配列番号３のアミノ酸配列における６０－５３０，７８－５３０，１０５－５３０，１－２７７，１－１０４，１－９０および１－７７）は対応する配列をＰＣＲで増幅し、ＧＦＰ融合タンパク発現ベクターｐＥＧＦＰ－Ｃ１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）にクローニングして作製し、これらの変異体の各々とＰＩＰＫＩＩαとの結合を調べたところ、ＩＲＢＩＴのＮ末端領域にあるセリンに富む領域が上記結合に重要であることが明らかになった（図７）。

（５）マウスＩＲＢＩＴのセリンに富む領域の点突然変異体（配列番号３のアミノ酸配列におけるＴ５２Ａ，Ｔ５８Ａ，Ｓ６２Ａ，Ｓ６４Ａ，Ｓ６６Ａ，Ｓ６８Ａ，Ｓ７０Ａ，Ｓ７１Ａ，Ｔ７２Ａ，Ｓ７４Ａ，Ｓ７６Ｇ，Ｓ７７Ａ，Ｓ８０Ａ，Ｄ８３Ａ，Ｓ９０ＡおよびＴ９７Ａ）は、部位特異的変異体作成キット（Ｓ

ｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて作製し、これらの変異体の各々とＰＩＰＫＩＩαとの結合を調べた。その結果、ＩＲＢＩＴのＳｅｒ６８及びＳｅｒ７１が上記結合に重要であった（図８）。

以上の結果より、ＩＲＢＩＴがＰＩＰＫＩＩファミリーに結合することが確認された。さらに予備的データから、ＩＲＢＩＴはＰＩＰＫＩＩ活性を抑制することを見いだしているため、ＩＲＢＩＴはイノシトールリン脂質代謝の活性制御をおこなっていると結論づけられた。

＜実施例３＞

ＩＲＢＩＴによるＮＢＣ１　（Ｎａ／HCO_3　ｃｏｔｒａｎｓｐｏｒｔｅｒ１）の活性化

本発明者らはさらに、ＩＲＢＩＴに結合する蛋白質として、細胞膜上でナトリウムイオンと重炭酸イオンの輸送を行うＮＢＣ１（ｓｏｄｉｕｍ　ｂｉｃａｒｂｏｎａｔｅ　ｃｏ－ｔｒａｎｓｐｏｒｔｅｒ１）蛋白質を同定した。

ＮＢＣ１には、ｐ型とｋ型の２つのスプライシング変異体が存在することが知られているが（Ｓｅｔｈ　Ｌ．Ａｌｐｅｒ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２００２，６４：８９９－９２３）、ＩＲＢＩＴは、そのうちｐ型のＮＢＣ１（ｐＮＢＣ１という）と結合すること、また、ＩＲＢＩＴにおけるいくつかのセリン残基のリン酸化がｐＮＢＣ１との結合に必要であることが明らかになった。以下に、具体的に実験および結果を示す。

（１）ｐＮＢＣ１におけるＩＲＢＩＴ結合領域の同定

ｐＮＢＣ１のｐ型特異的なＮ末端配列（１－８５アミノ酸）がＩＲＢＩＴとの結合に必要不可欠であった。この８５アミノ酸内に更なる欠失変異体を作製し、それら変異体とＩＲＢＩＴとの結合をプルダウンアッセイ（ｐｕｌｌ　ｄｏｗｎ　ａｓｓａｙ）を用いて検討した。具体的には、以下の実験を行った。

ＣＯＳ－７細胞にＨＡ－ＩＲＢＩＴを過剰発現し、細胞抽出液を調製した。ＭＢＰ－ｐＮＢＣ１の欠失変異体のリコンビナントタンパク質を添加し、反応後、結合したタンパク質をａｍｙｌｏｓｅレジンでプルダウンした。ＨＡ－ＩＲＢＩＴを抗ＨＡ抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。

その結果、ｐ型特異的な配列のうちＮ末端６２アミノ酸があればＩＲＢＩＴと

結合しうることが示された（図９、図１０）。しかしこの６２アミノ酸から更にN末側やC末側を削ると、ＩＲＢＩＴとの結合が見られなくなり、これ以上ＩＲＢＩＴ結合領域を狭めるのは難しいと考えられた。この結果からＩＲＢＩＴとの結合にはｐＮＢＣ１の特定の数アミノ酸の配列が関与しているのではなく、数十アミノ酸からなる三次元的な構造が必要である可能性が示唆された。

（２）ＩＲＢＩＴにおけるｐＮＢＣ１結合領域の同定

次に、マウスＩＲＢＩＴ（全長５３０アミノ酸；配列番号３）の各種欠失変異体をＣＯＳ７細胞に発現させ、それぞれの変異体のｐＮＢＣ１結合能をプルダウンアッセイで調べた。具体的には、以下の実験を行った。

ＣＯＳ－７細胞にＧＦＰ－ＩＲＢＩＴの欠失変異体を過剰発現し、細胞抽出液を調整した。ＭＢＰ－ｐＮＢＣ１（１－８５）のリコンビナントタンパク質を添加し、反応後、結合したタンパク質をａｍｙｌｏｓｅレジンでプルダウンした。ＧＦＰ－ＩＲＢＩＴの欠失変異体を抗ＧＦＰ抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。

その結果を図１１に示す。図から、IP_3受容体との結合が確認されているＩＲＢＩＴのN末側を発現する欠失変異体（１－１０４、１－２７７）ですらｐＮＢＣ１とは結合できないことがわかった。またIP_3受容体と結合できないことが既に確認されているＩＲＢＩＴのC末側を発現する欠失変異体（１０５－５３０）もまたｐＮＢＣ１とは結合できなかった。ｐＮＢＣ１との結合に必要であることが示されているセリンリン酸化部位は１－１０４に全て含まれることから、１－１０４の中に短いｐＮＢＣ１結合配列が存在するにも関わらず何らかの立体構造によってｐＮＢＣ１との結合が阻害されている可能性も考えられた。そこで、１－１０４を更に細かく欠失させた欠失変異体を作製しｐＮＢＣ１との結合を解析したが、いずれもｐＮＢＣ１との結合は見られなかった。

以上の結果から、ＩＲＢＩＴのN末側とC末側を含む全体の構造がｐＮＢＣ１との結合に必要であることが明らかとなり、ＩＲＢＩＴのN末側だけで十分であるとされるＩＲＢＩＴとIP_3受容体との結合様式との違いが明らかとなった。

（３）内在性ＩＲＢＩＴとＮＢＣ１との結合

次に、内在性のＩＲＢＩＴとＮＢＣ１との結合を、免疫沈降法を用いて確認す

る実験を行った。

そもそもＮＢＣ１は小脳の膜画分におけるＩＲＢＩＴ結合蛋白質として同定されたので、まず小脳膜画分抽出液を用いて免疫沈降を行った。また小脳膜画分においてＩＲＢＩＴはIP_3受容体とも結合していることがわかっているので、ＮＢＣ１、ＩＲＢＩＴ、IP_3受容体からなる三者複合体を形成しうるか否かを検討した。具体的には、以下の実験を行った。

小脳膜画分を界面活性剤で可溶化後、抗ＩＲＢＩＴ抗体、抗ＮＢＣ抗体、あるいはコントロール抗体を添加して反応させた。さらにプロテインＧセファロースを添加して免疫複合体を抽出した。その後、抗ＩＲＢＩＴ抗体、抗ＮＢＣ抗体あるいは抗IP_3Ｒ抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

その結果、抗ＮＢＣ１抗体免疫沈降物中に内在性のＩＲＢＩＴが、また抗ＩＲＢＩＴ抗体免疫沈降物中に内在性のＮＢＣ１が、それぞれ含まれることがわかり、内在性のＩＲＢＩＴとＮＢＣ１が小脳膜画分で複合体を形成することが確認された（図１２）。一方で、既にＡｎｄｏら（２００３，上記）によって報告されているように、抗ＩＲＢＩＴ免疫沈降物中にはIP_3受容体が検出されたが、抗ＮＢＣ１沈降物中にはIP_3受容体が検出できなかった。この結果から、内在性ＮＢＣ１の多くがＩＲＢＩＴとIP_3受容体を含む三者複合体を形成していないことが示された。

さらにＩＲＢＩＴとＮＢＣ１との結合が普遍的であることを確認するために、ＣＯＳ７細胞の抽出液を用いて内在性のＩＲＢＩＴとＮＢＣ１との結合を、先ほどと同様の免疫沈降法を用いて検討した。具体的には、以下の実験を行った。

ＣＯＳ－７細胞の細胞抽出液に抗ＩＲＢＩＴ抗体、抗ＮＢＣ抗体、あるいはコントロール抗体を添加して反応させた。さらにプロテインＧセファロースを添加して免疫複合体を抽出した。その後、抗ＩＲＢＩＴ抗体あるいは抗ＮＢＣ抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

その結果を図１３に示す。図から、小脳膜画分の抽出液を調製する時に用いたものと同じバッファーでＣＯＳ７細胞を抽出した場合、内在性のＩＲＢＩＴとＮＢＣ１の結合が検出されないことがわかった。しかし、このバッファーに２ｍＭ$CaCl_2$を加えて同様の実験を行ったところ、内在性のＩＲＢＩＴとＮＢＣ１

の結合が検出された。このバッファーは既に２ｍＭのＥＤＴＡを含んでいることから、２ｍＭ　$CaCl_2$を加えた時のカルシウムイオン濃度は数μＭであると考えられる。これらの結果から、内在性のＮＢＣ１とＩＲＢＩＴとの結合が小脳膜画分とＣＯＳ７細胞とでは異なった様式で制御されている可能性が示唆された。

（４）ＩＲＢＩＴによるＮＢＣ１の活性化

アフリカツメガエル卵母細胞（Ｘｅｎｏｐｕｓｅ　Ｏｏｃｙｔｅ）の培養細胞にマウスＩＲＢＩＴのｃＲＮＡとヒトｐＮＢＣ１またはｋＮＢＣ１のｃＲＮＡを同時注入し、膜電位を－２５ｍＶにし、ＮＤ９６溶液（９６ｍＭ　ＮａＣｌ，２ｍＭ　ＫＣｌ，１ｍＭ　$MgCl_2$，５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ，ｐＨ７．４）から$ND96+HCO_3^-$溶液に変えた時の電流変化を測定した。コントロールには、ＩＲＢＩＴ、ｐＮＢＣ１、ｋＮＢＣ１を使用した。

その結果、ｐＮＢＣ１活性のみが、ＩＲＢＩＴの同時注入によって約６～７倍増強された（図１４Ａ）。同様に、$ND96+HCO_3^-$溶液中で膜電位を－１６０ｍＶから＋６０ｍＶの範囲で変化させたときにも、ｐＮＢＣ１活性のみが、ＩＲＢＩＴの同時注入によって顕著に増強された（図１４Ｂ）。

さらにまた、ＩＲＢＩＴのリン酸化部位をアラニン（Ａ）に置換したＩＲＢＩＴ変異体（Ｓ６８Ａ，Ｓ７１Ａ，Ｓ７４ＡまたはＳ７７Ａ）を作製し、上記と同様に、アフリカツメガエル卵母細胞にＩＲＢＩＴ変異体のｃＲＮＡとヒトｐＮＢＣ１のｃＲＮＡを同時注入し、膜電位を－２５ｍＶにし、ＮＤ９６溶液から$ND96+HCO_3^-$溶液に変えた時の電流変化を測定した。

その結果、リン酸化部位をアラニンに置換したすべてのＩＲＢＩＴ変異体において、ＩＲＢＩＴのｐＮＢＣ１活性への増強作用は消失した（図１５）。このことは、ＩＲＢＩＴのリン酸化がｐＮＢＣ１の活性化に必要であることを示している。

産業上の利用可能性

本発明の組成物および方法は、ＩＲＢＩＴが、哺乳動物細胞内でＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１との結合を介してそれぞれ、タンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝、または細胞内ｐＨの維持に関与しているため、このような生物学的機能を制御するＩＲＢＩＴ、ＩＲＢＩＴの発現／翻訳を制御する核酸、

またはＩＲＢＩＴに対する抗体は、該機能の異常に伴う疾患の治療に有用である。

本発明により、ＩＲＢＩＴは、細胞内での代謝、ｐＨ変化、イオンバランス、リン脂質代謝の調節、タンパク質合成の制御、Ca^{2+}放出の制御などを調節する上で大変重要な意義を全ての細胞で有していることが判明した。ＩＲＢＩＴの濃度や発現パターンを制御することにより、このような様々な生物学的機能を制御しうる。ＩＲＢＩＴは、例えば脳神経系では脈絡叢（ｃｈｏｒｏｉｄ　ｐｌｅｘｕｓ）や神経細胞、グリア細胞で強く発現しており、脳神経系の機能制御にも貢献している。また、ＩＲＢＩＴは、細胞内のｐＨの維持に重要なｐＮＢＣ１の働き活性化して、特にｐＨが酸性に傾くことによる疾患、例えば緑内障や白内障などの眼の疾患、低身長症、精神遅滞、膵臓炎などの疾患の治療に有用である。さらにまた、ＩＲＢＩＴは、ＰＩＰＫＩＩの活性を抑制または阻害する働きがあるため、２型糖尿病の治療に使用することができる。このように、本発明により、ＩＲＢＩＴが標的とする３つのタンパク質が特定されたことによって、ＩＲＢＩＴおよびその抑制剤、亢進剤が、標的タンパク質が生体内で果たす生物学的機能の制御のために役立つ。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1．　IP_3受容体結合タンパク質（ＩＲＢＩＴ）、ＩＲＢＩＴの発現／翻訳を制御する核酸、またはＩＲＢＩＴに対する抗体を含む組成物であって、

（１）タンパク質合成、

（２）イノシトールリン脂質代謝、および

（３）細胞内ｐＨ、

からなる群から選択される少なくとも１つの細胞内生物学的機能の制御のための上記組成物。

2．　前記タンパク質合成が、切断／ポリアデニレーション特異性因子（ＣＰＳＦ）による細胞質のｍＲＮＡポリアデニレーションが関与するものである、請求項１に記載の組成物。

3．　前記イノシトールリン脂質代謝が、細胞内でのPIP_2合成酵素（ＰＩＰＫＩＩ）が関与するものである、請求項１に記載の組成物。

4．　前記細胞内ｐＨが、細胞内でのｐ型Ｎａ／HCO_3共トランスポーター１（ｐＮＢＣ１）が関与するものである、請求項１に記載の組成物。

5．　前記制御が、抑制または亢進である、請求項１に記載の組成物。

6．　前記ＩＲＢＩＴが、ヒトまたはマウス由来のものである、請求項１に記載の組成物。

7．　前記ＩＲＢＩＴが、配列番号１または配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、あるいは該アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつＩＲＢＩＴと同等の生物学的活性を有するタンパク質である、請求項１または６に記載の組成物。

8．　前記組成物が、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏのいずれかで使用される、請求項１～７のいずれか１項に記載の組成物。

9．　前記組成物が、疾患の治療用である、請求項１に記載の組成物。

１０．　ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内のタンパク質合成の制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法。

１１．　前記ＩＲＢＩＴがＣＰＳＦに結合しＣＰＳＦの機能を制御する、請求

項１０に記載の方法。

１２．　ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内のイノシトールリン脂質代謝の制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法。

１３．　前記ＩＲＢＩＴがＰＩＰＫＩＩ活性を抑制する、請求項１２に記載の方法。

１４．　ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞内ｐＨの制御におけるＩＲＢＩＴの使用方法。

１５．　前記ＩＲＢＩＴがｐＮＢＣ１を活性化する、請求項１４に記載の方法。

１６．　前記ｐＮＢＣ１の活性化が前記ＩＲＢＩＴのリン酸化を必要とする、請求項１５に記載の方法。

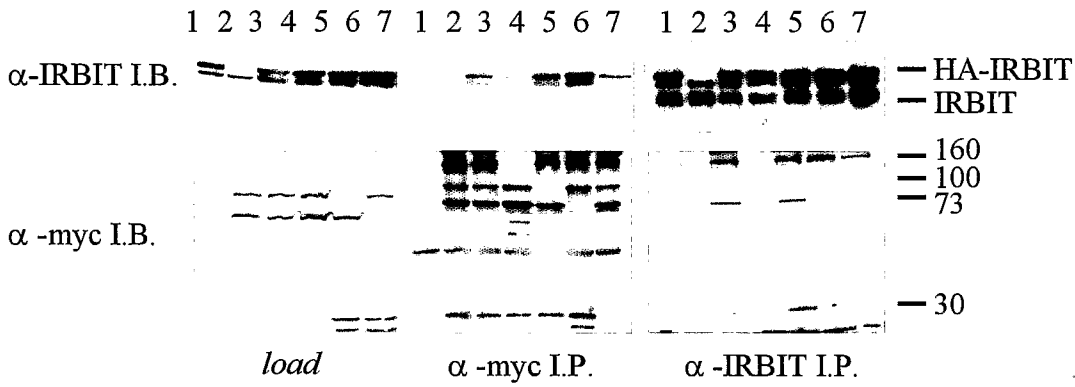
１７．　候補物質の存在下で、ＩＲＢＩＴとＣＰＳＦ、ＰＩＰＫＩＩまたはｐＮＢＣ１との結合を測定し、該結合を抑制または亢進する物質を同定することを含む、物質のスクリーニング方法。

１８．　前記物質が治療用または診断用である、請求項１７記載の方法。

１９．　前記結合を哺乳動物細胞内で行う、請求項１７記載の方法。

２０．　前記物質が、細胞内のタンパク質合成、イノシトールリン脂質代謝および細胞内ｐＨからなる群から選択される少なくとも１つの細胞内生物学的機能を制御するものである、請求項１７に記載の方法。

図 1



1: IRBIT のみ
2:CPSF 複合体のみ
3:IRBIT+CPSF
4:IRBIT+CPSF-160 kDa サブユニット
5: IRBIT+CPSF-100 kDa サブユニット
6: IRBIT+CPSF-73 kDa サブユニット
7: IRBIT+CPSF-30 kDa サブユニット

図 2

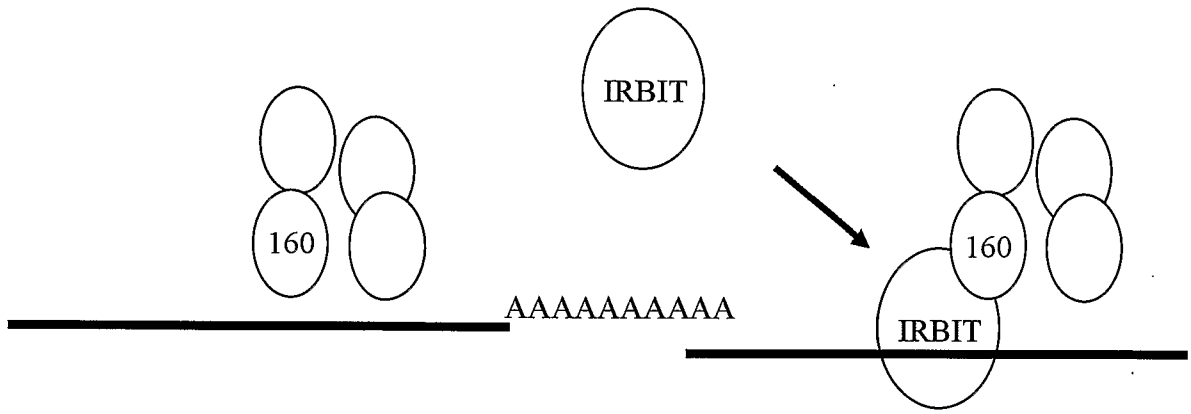


図 3

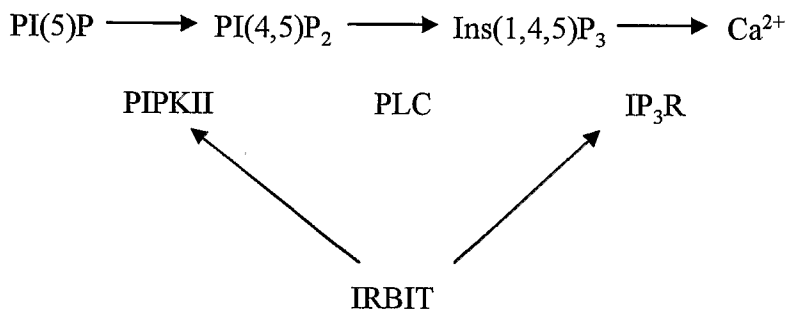


図 4

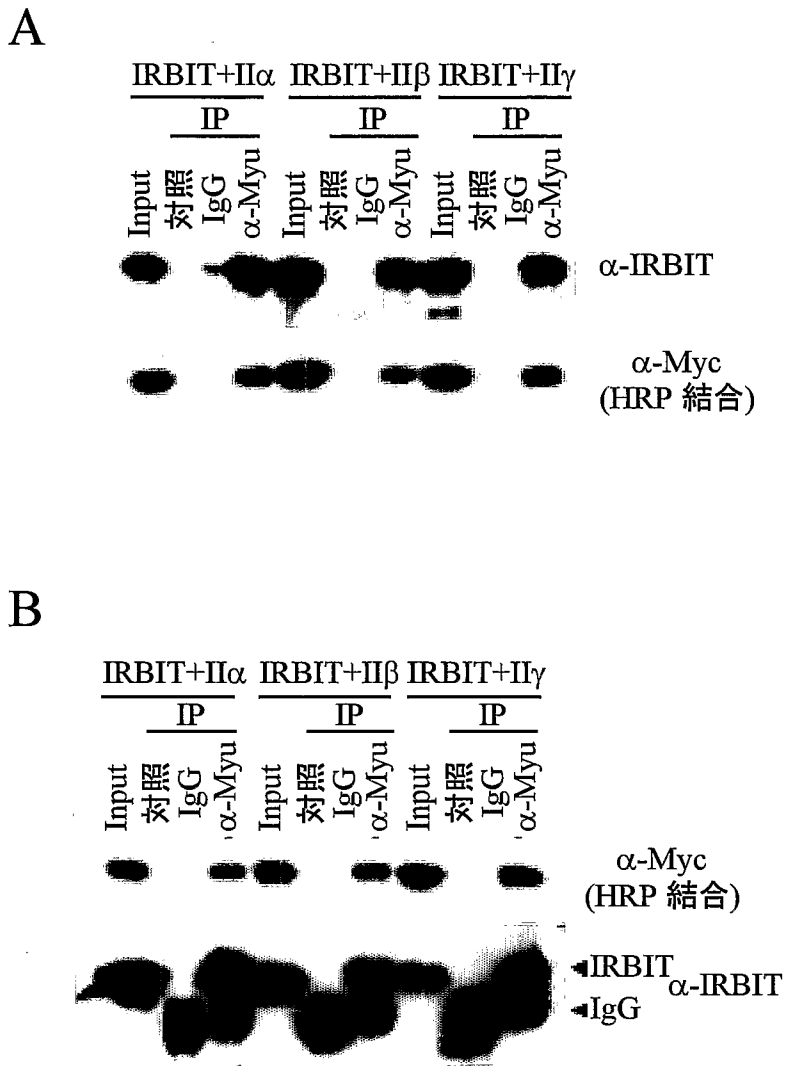

A
IRBIT+IIα
IRBIT+IIβ
IRBIT+IIγ
IP
Input
対照
IgG
α-Myu
α-IRBIT
α-Myc
(HRP 結合)
B
IRBIT+IIα
IRBIT+IIβ
IRBIT+IIγ
IP
Input
対照
IgG
α-Myu
α-Myc
(HRP 結合)
IRBIT
IgG
α-IRBIT

図5

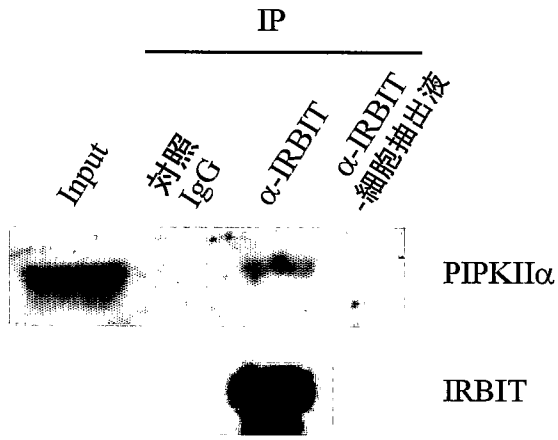


図 6

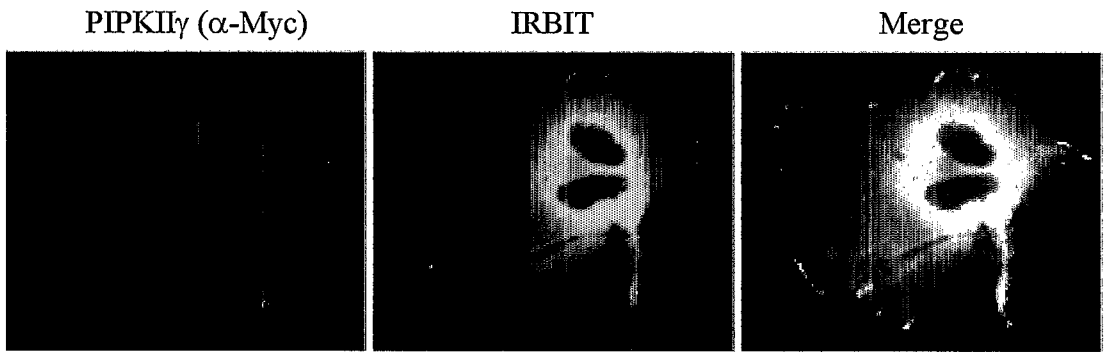


図 7

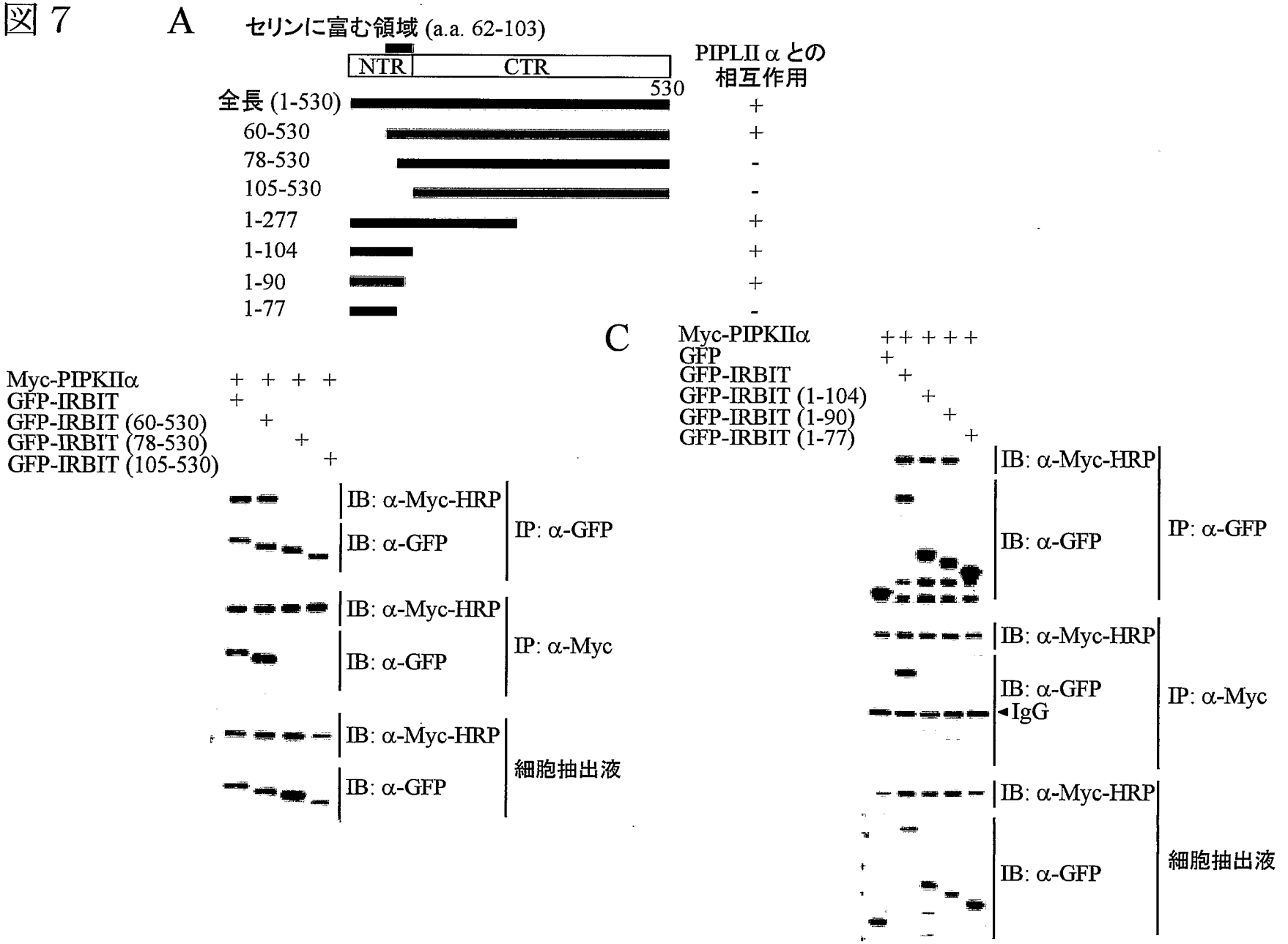

A
セリンに富む領域 (a.a. 62-103)
NTR
CTR
530
PIPLIIαとの相互作用
全長 (1-530) +
60-530 +
78-530 -
105-530 -
1-277 +
1-104 +
1-90 +
1-77 -
B
Myc-PIPKIIα + + + +
GFP-IRBIT +
GFP-IRBIT (60-530) +
GFP-IRBIT (78-530) +
GFP-IRBIT (105-530) +
IB: α-Myc-HRP
IB: α-GFP
IP: α-GFP
IB: α-Myc-HRP
IB: α-GFP
IP: α-Myc
IB: α-Myc-HRP
IB: α-GFP
細胞抽出液
C
Myc-PIPKIIα + + + + +
GFP +
GFP-IRBIT +
GFP-IRBIT (1-104) +
GFP-IRBIT (1-90) +
GFP-IRBIT (1-77) +
IB: α-Myc-HRP
IB: α-GFP
IP: α-GFP
IB: α-Myc-HRP
IB: α-GFP
◂IgG
IP: α-Myc
IB: α-Myc-HRP
IB: α-GFP
細胞抽出液

図 8

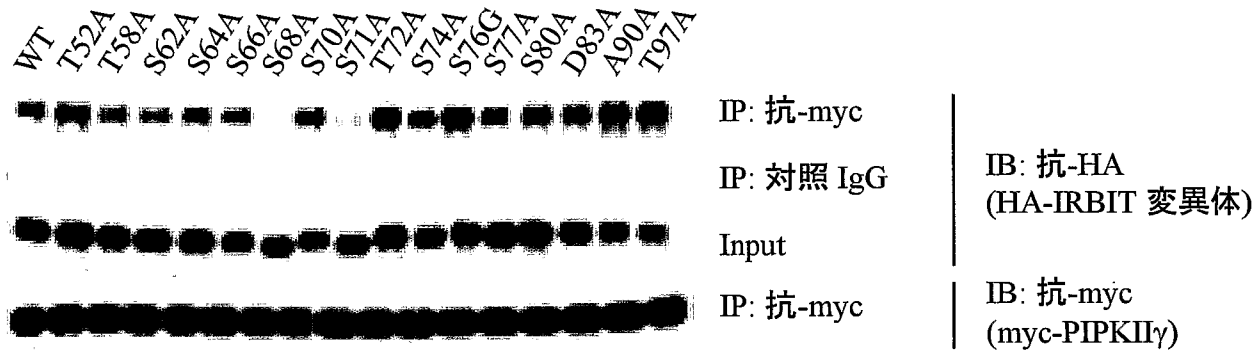
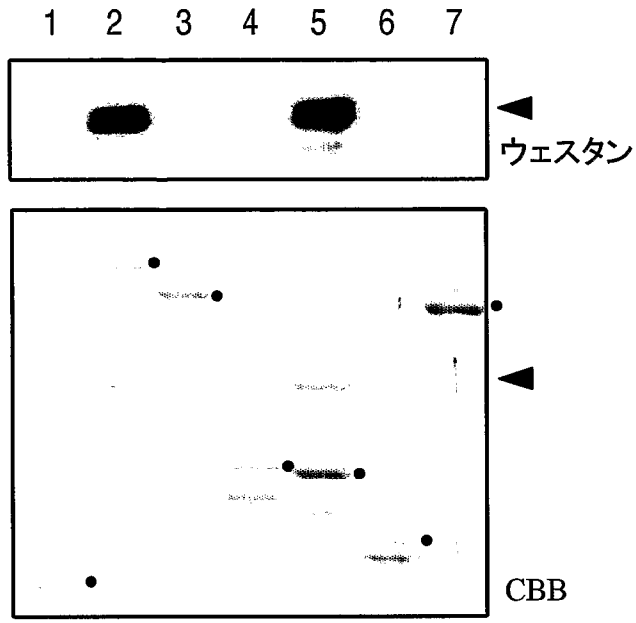

WT
T52A
T58A
S62A
S64A
S66A
S68A
S70A
S71A
T72A
S74A
S76G
S77A
S80A
D83A
A90A
T97A
IP: 抗-myc
IP: 対照 IgG
Input
IP: 抗-myc
IB: 抗-HA
(HA-IRBIT 変異体)
IB: 抗-myc
(myc-PIPKIIγ)

図9

A


1 2 3 4 5 6 7
ウェスタン
CBB

B

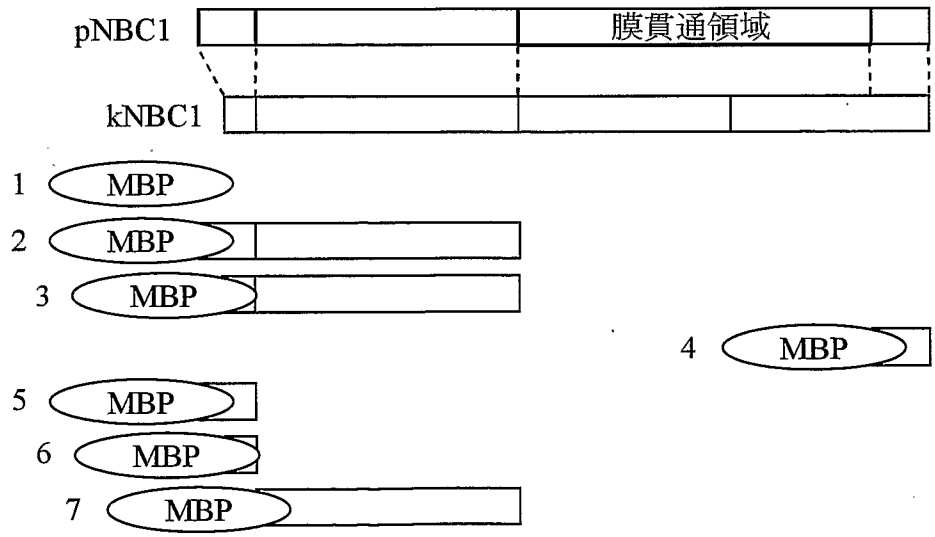
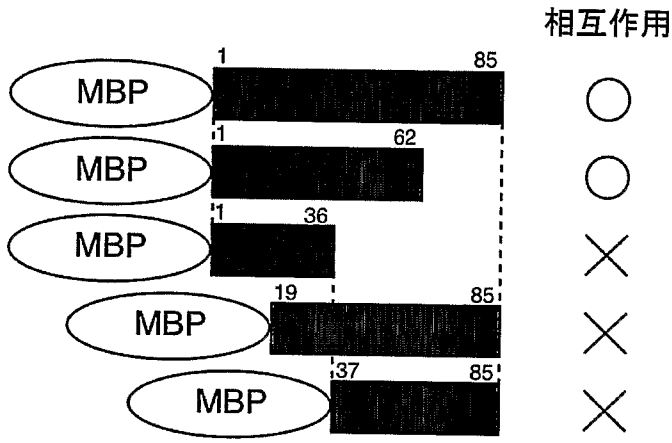

pNBC1
膜貫通領域
kNBC1
1 MBP
2 MBP
3 MBP
4 MBP
5 MBP
6 MBP
7 MBP

図１０

A


相互作用
MBP
1
85
MBP
1
62
MBP
1
36
MBP
19
85
MBP
37
85

B

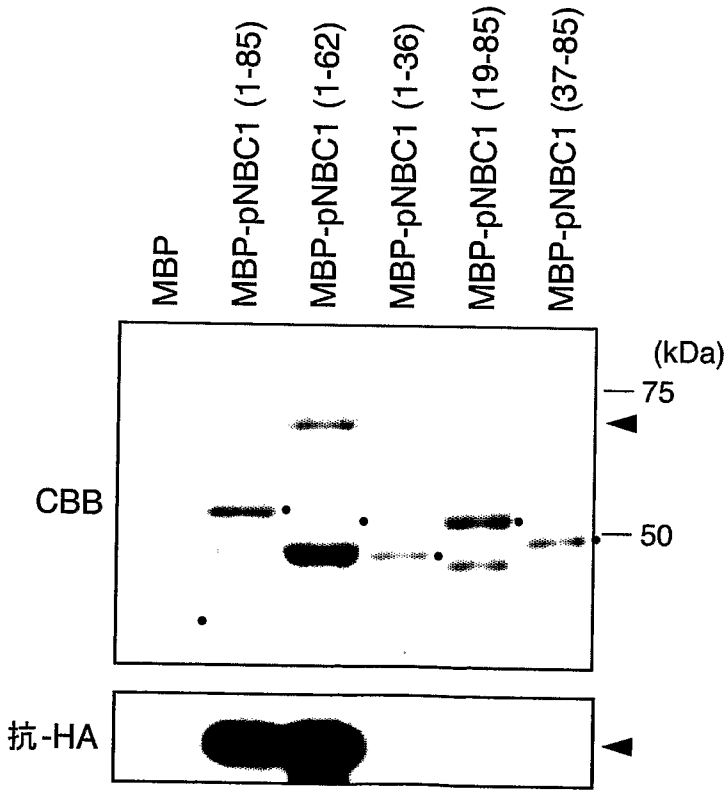
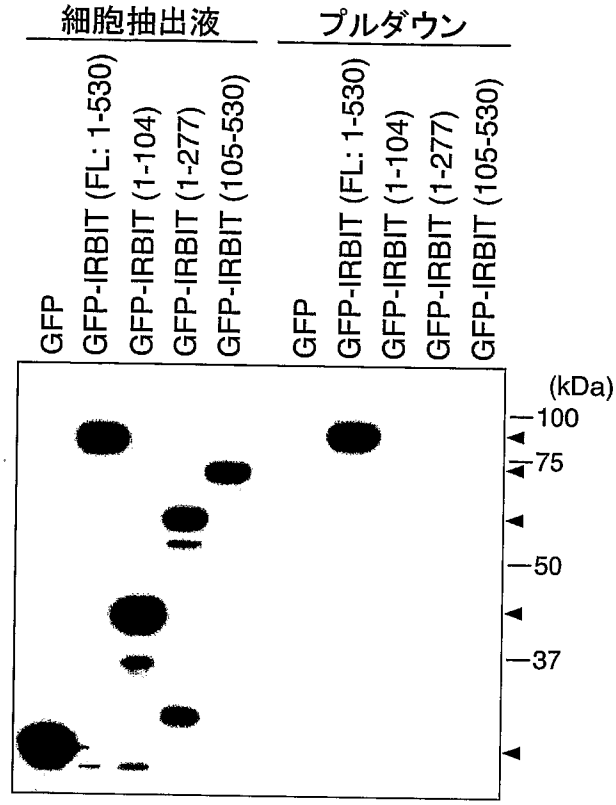

MBP
MBP-pNBC1 (1-85)
MBP-pNBC1 (1-62)
MBP-pNBC1 (1-36)
MBP-pNBC1 (19-85)
MBP-pNBC1 (37-85)
(kDa)
75
50
CBB
抗-HA

図１１

A


細胞抽出液
プルダウン
GFP
GFP-IRBIT (FL: 1-530)
GFP-IRBIT (1-104)
GFP-IRBIT (1-277)
GFP-IRBIT (105-530)
GFP
GFP-IRBIT (FL: 1-530)
GFP-IRBIT (1-104)
GFP-IRBIT (1-277)
GFP-IRBIT (105-530)
(kDa)
100
75
50
37

B

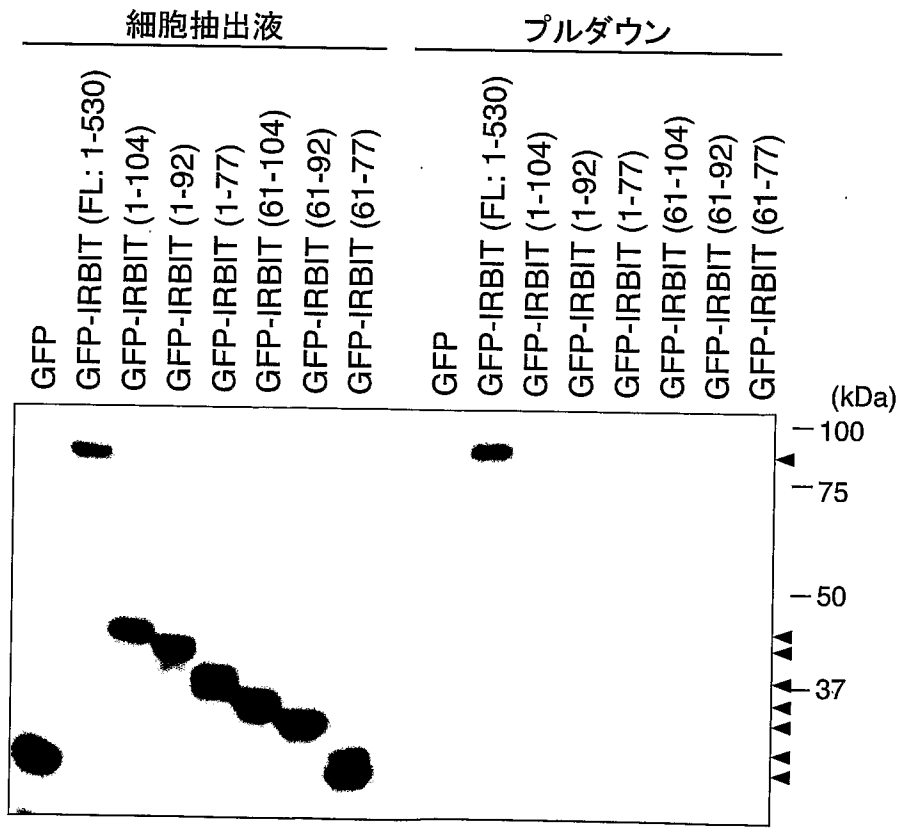

細胞抽出液
プルダウン
GFP
GFP-IRBIT (FL: 1-530)
GFP-IRBIT (1-104)
GFP-IRBIT (1-92)
GFP-IRBIT (1-77)
GFP-IRBIT (61-104)
GFP-IRBIT (61-92)
GFP-IRBIT (61-77)
GFP
GFP-IRBIT (FL: 1-530)
GFP-IRBIT (1-104)
GFP-IRBIT (1-92)
GFP-IRBIT (1-77)
GFP-IRBIT (61-104)
GFP-IRBIT (61-92)
GFP-IRBIT (61-77)
(kDa)
100
75
50
37

図１２

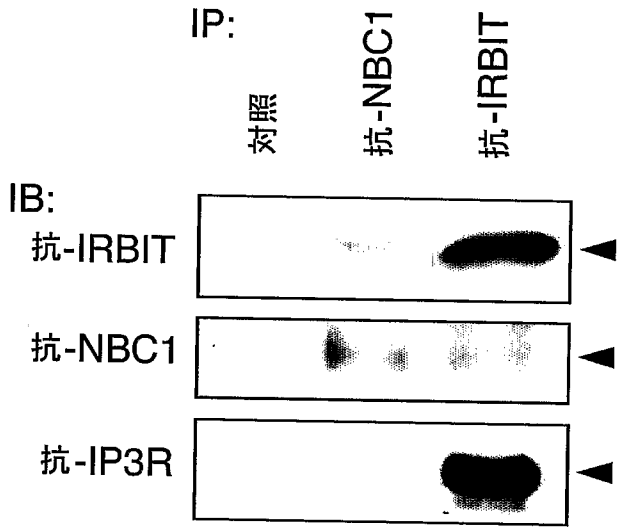


図１３

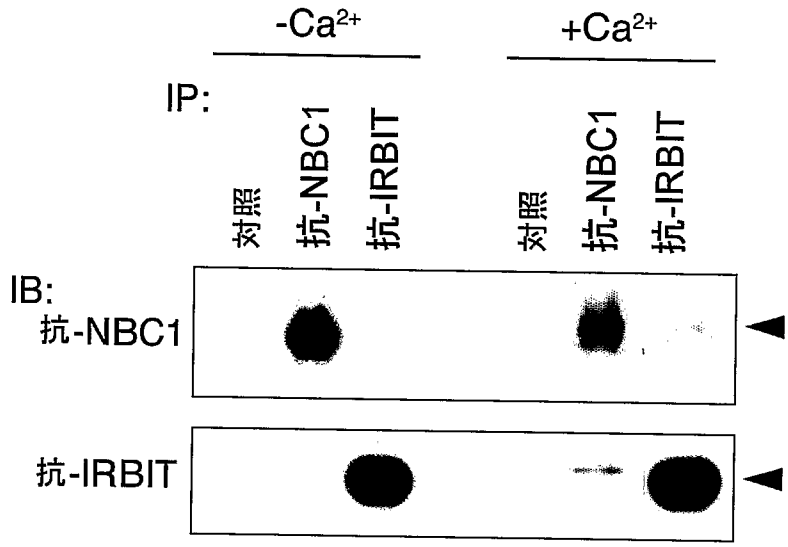
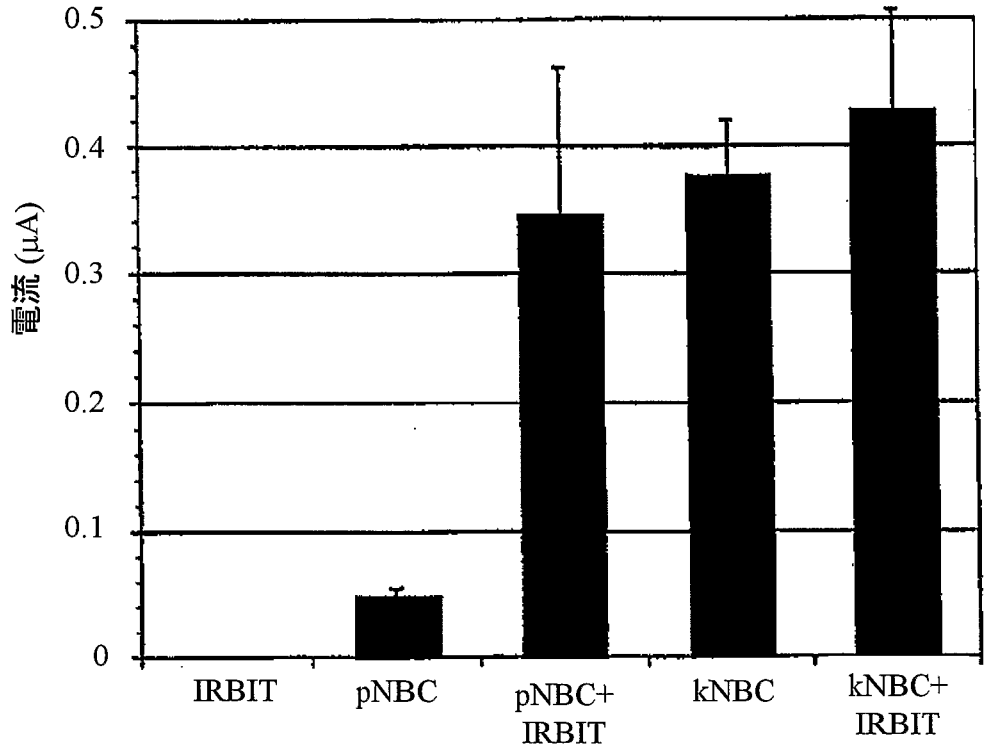


図１４

A


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
電流 (μA)
IRBIT
pNBC
pNBC+ IRBIT
kNBC
kNBC+ IRBIT

B

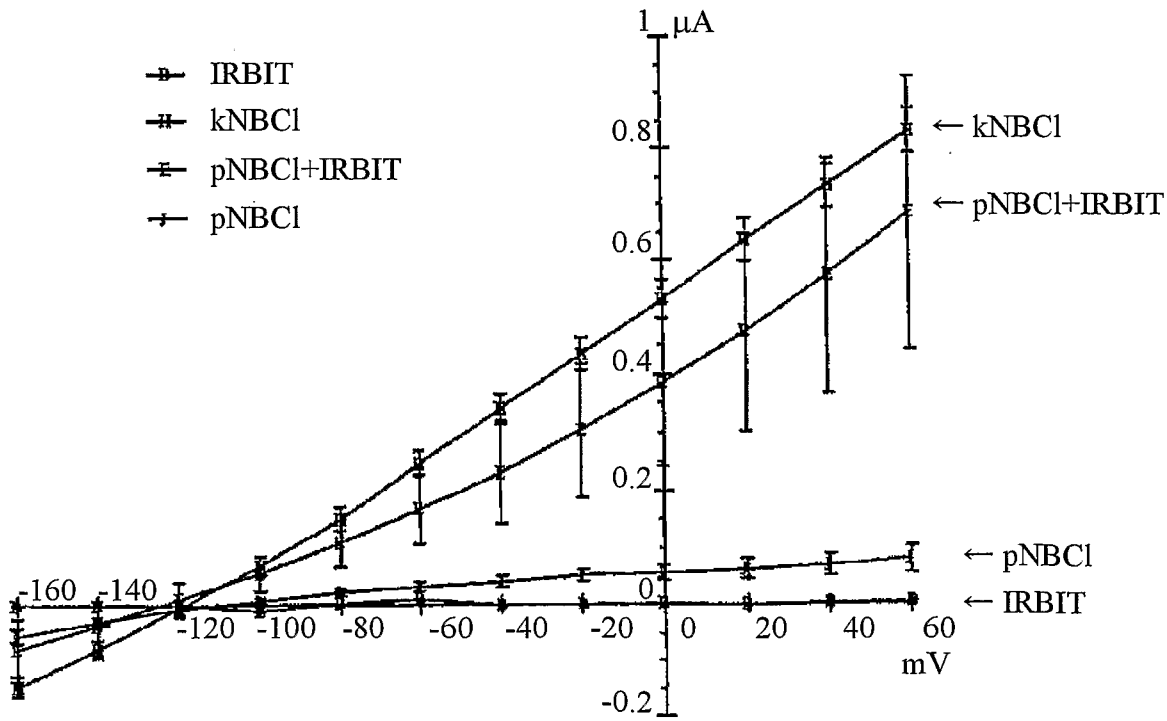
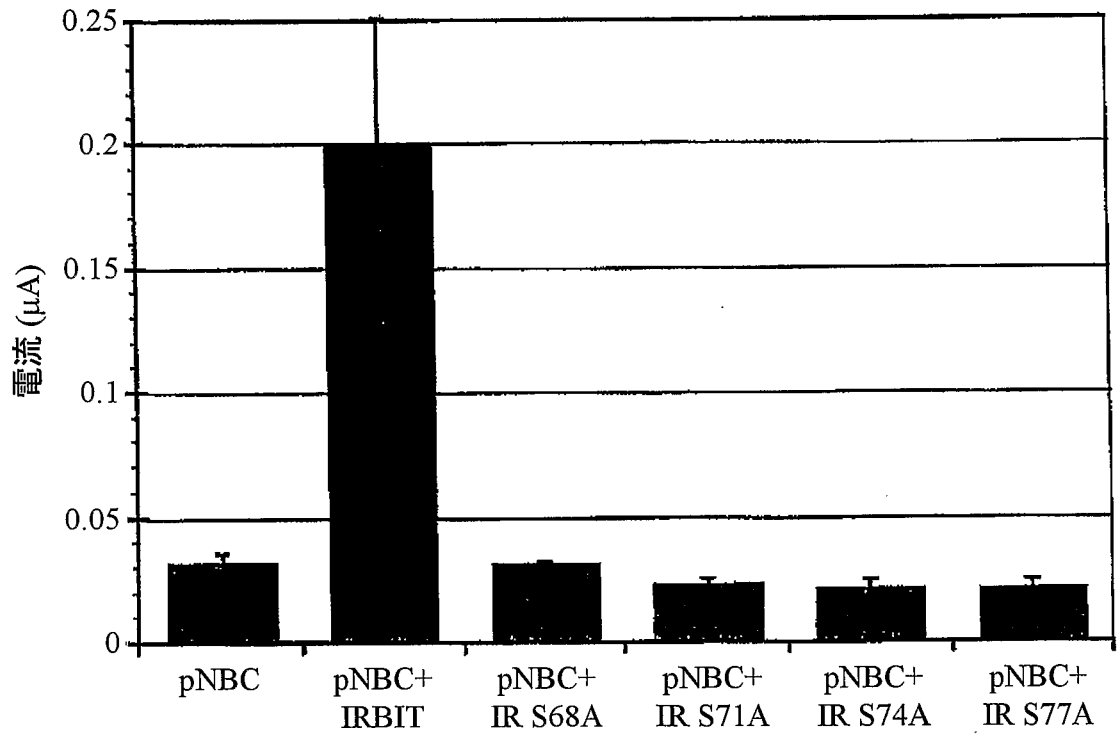

1 μA
IRBIT
kNBCl
pNBCl+IRBIT
pNBCl
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
← kNBCl
← pNBCl+IRBIT
← pNBCl
← IRBIT
-160 -140 -120 -100 -80 -60 -40 -20 0 20 40 60
mV

図１５


0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
電流 (μA)
pNBC
pNBC+ IRBIT
pNBC+ IR S68A
pNBC+ IR S71A
pNBC+ IR S74A
pNBC+ IR S77A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
A61K38/00, A61K31/7088, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, A61P3/12, A61P25/00, A61P27/02, A61P27/06, A61P27/12, A61P43/00, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50

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 1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/CAplus/EMBASE/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDream2), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/030615 A2 (GENENTECH, INC), 15 April, 2004 (15.04.04), Claims; FIGURE 301 & EP 1594447 A2 & JP 2006-516089 A	1-11
X	WO 2004/041170 A2 (GENENTECH, INC), 21 May, 2004 (21.05.04), Claims; FIGURE 139 & EP 1578367 A2 & JP 2006-515747 A & US 2006/263774 A1	1-9,12,13
X	Hideomi YAMADA et al., "IRBIT wa pNBC1 no	17-20
Y	Makuhatsugen o Sokushin suru", The Japanese Journal of Nephrology, 2005, Vol.47, No.3, page 288 "P-300"	1-9,14-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 May, 2007 (09.05.07)	22 May, 2007 (22.05.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056529

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GROSS, E. et al., Structural determinants and significance of regulation of electrogenic Na^+-HCO_3^- cotransporter stoichiometry, American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2002, Vol.283, No.5, pp.F876-F887, Abstract	1-9,14-16
P,X	SHIRAKABE, K. et al., IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na^+/HCO_3^- cotransporter 1 (pNBC1), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, June 2006, Vol.103, No.25, pp.9542-9547. full text	1-20
A	JP 2004-129612 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 30 April, 2004 (30.04.04), & EP 1408049 A2 & US 2005/181450 A1	1-20
A	DEVOGELAERE, B. et al., Binding of IRBIT to the IP3 receptor: Determinants and functional effects, Biochemical and Biophysical Research Communications, February 2006, Vol.343, pp.49-56 [online]. [retrieved on 9 May 2007], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.sciencedirect.com/science/journal/0006291X>	1-20
A	ANDO, H. et al., IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor-binding protein, is released from the IP_3 receptor upon IP_3 binding to the receptor, The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol.278, No.12, pp.10602-10612	1-20
A	WO 2003/055997 A1 (THE CORP. OF THE TRUSTEES OF THE ORDEROF THE SISTERS OF MERCY IN QUEENSLAND), 10 July, 2003 (10.07.03), & US 2005/044582 A1	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056529

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61K38/00(2006.01)i, *A61K31/7088*(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61K48/00*(2006.01)i, *A61P3/06*(2006.01)i, *A61P3/10*(2006.01)i, *A61P3/12*(2006.01)i, *A61P25/00*(2006.01)i, *A61P27/02*(2006.01)i, *A61P27/06*(2006.01)i, *A61P27/12*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C07K14/47*(2006.01)i, *C07K16/18*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12Q1/02*(2006.01)i, *G01N33/15*(2006.01)i, *G01N33/50*(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Igaku･Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056529

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

<Subject of search>

Although the inventions according to claims 1 to 9 involve that an IRBIT, a nucleic acid controlling the expression/translation of the IRBIT or an antibody against the IRBIT has an effect of controlling an intracellular biological function, it is merely mentioned as Examples in the description that the IRBIT binds to CPSF or PIPKII, the IRBIT activates pNBC1, and the IRBIT possibly controls intracellular biological functions such as the synthesis of a protein. Namely, there is presented no clue for the presence of the controlling effect on an intracellular biological function that is exhibited in the case of using not the IRBIT but a nucleic acid controlling the expression/translation of the IRBIT or an antibody against the IRBIT. Therefore, these inventions are neither disclosed in the meaning within PCT Article 5 nor supported by the disclosure of the description in the meaning within PCT Article 6. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, these inventions do not comply with the requirement of clearness specified in PCT Article 6.

Since the inventions according to claims 1 to 9 are not sufficiently disclosed as discussed above, the results of the search for prior art documents using the IRBIT are indicated in making the present international search report.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

<Column III>

It appears that claims 1 to 20 of the present international application have the following invention groups A to C.

A) A composition for controlling the synthesis of a protein which contains an IRBIT, a nucleic acid controlling the expression/translation of the IRBIT or an antibody against the IRBIT, use of the IRBIT in controlling the synthesis of a protein and a method of screening a substance controlling the binding of the IRBIT to CPSF.

B) A composition for controlling the metabolism of an inositol phospholipid which contains an IRBIT, a nucleic acid controlling the expression/translation of the IRBIT or an antibody against the IRBIT, use of the IRBIT in controlling the metabolism of an inositol phospholipid and a method of screening a substance controlling the binding of the IRBIT to PIPKII.

C) A composition for controlling the intracellular pH value which contains an IRBIT, a nucleic acid controlling the expression/translation of the IRBIT or an antibody against the IRBIT, use of the IRBIT in controlling the intracellular pH value and a method of screening a substance controlling the binding of the IRBIT to pNBC1.

The matters common to the invention groups A to C, i.e., an IRBIT-containing composition for controlling an intracellular biological function and the IRBIT per se have been publicly known (see, for example, Hideomi YAMADA et al., The Japanese Journal of Nephrology, 2005, Vol.47, No.3, p.288; JP 2004-129612 A (The Institute of Physical and Chemical Research) 30 April, 2004 (30.04.04); and DEVOGELAERE, B. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, February 2006, Vol.343, pp.49-56 [online]).

(Continued to the next sheet.)

As a result, an IRBIT-containing composition for controlling an intracellular biological function and the IRBIT per se fall within the category of prior art and, therefore, the above-described common matters, i.e., an IRBIT-containing composition for controlling an intracellular biological function and the IRBIT per se are not special technical matters in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Such being the case, the invention groups A to C are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept and, therefore, do not comply with the requirement of unity of invention.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０５６５２９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

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.　A61K38/00, A61K31/7088, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, A61P3/12, A61P25/00, A61P27/02, A61P27/06, A61P27/12, A61P43/00, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50

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	１９７１－２００７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００７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）

BIOSIS/CAplus/EMBASE/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDream2),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, 医学・薬学予稿集全文データベース

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 2004/030615 A2 (GENENTECH, INC) 2004.04.15, claims, FIGURE 301 & EP 1594447 A2 & JP 2006-516089 A	1-11
X	WO 2004/041170 A2 (GENENTECH, INC) 2004.05.21, claims, FIGURE 139 & EP 1578367 A2 & JP 2006-515747 A & US 2006/263774 A1	1-9,12,13

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　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 ０９．０５．２００７	国際調査報告の発送日 ２２．０５．２００７
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　３４３７ 長部　喜幸 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	山田 秀臣 他,IRBITはpNBC1の膜発現を促進する,日本腎臓学会誌, 2005, Vol.47, No.3, p.288	17-20
Y	「P-300」欄	1-9,14-16
Y	GROSS, E. et al., Structural determinants and significance of regulation of electrogenic Na^+-HCO_3^- cotransporter stoichiometry, American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2002, Vol.283, No.5, pp.F876-F887 Abstract	1-9,14-16
P,X	SHIRAKABE, K. et al., IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na^+/HCO_3^- cotransporter 1 (pNBC1), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, June 2006, Vol.103, No.25, pp.9542-9547. 全文	1-20
A	JP 2004-129612 A (理化学研究所) 2004.04.30, & EP 1408049 A2 & US 2005/181450 A1	1-20
A	DEVOGELAERE, B. et al., Binding of IRBIT to the IP_3 receptor: Determinants and functional effects, Biochemical and Biophysical Research Communications, February 2006, Vol.343, pp.49-56 [online]. [retrieved on 9 May 2007], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.sciencedirect.com/science/journal/0006291X>	1-20
A	ANDO, H. et al., IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor-binding protein, is released from the IP_3 receptor upon IP_3 binding to the receptor, The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol.278, No.12, pp.10602-10612	1-20
A	WO 2003/055997 A1 (THE CORPORATION OF THE TRUSTEES OF THE ORDER OF THE SISTERS OF MERCY IN QUEENSLAND) 2003.07.10, & US 2005/044582 A1	1-20

発明の属する分野の分類
A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i,
A61P3/12(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P27/06(2006.01)i,
A61P27/12(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０５６５２９

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

２．☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

＜調査の対象について＞

請求の範囲１－９に係る発明は、IRBIT、IRBITの発現／翻訳を制御する核酸、またはIRBITに対する抗体が細胞内生物学的機能の制御作用を有することを包含するものであるが、明細書には実施例としてIRBITがCPSFやPIPKIIと結合すること、IRBITがpNBC1を活性化させること、及び、IRBITがタンパク質合成等の細胞内生物学的機能を制御し得るという可能性が示されるにとどまり、IRBIT以外の、IRBITの発現／翻訳を制御する核酸、またはIRBITに対する抗体を用いた場合においても、細胞内生物学的機能の制御作用を有することを示す手がかりが記載されていないから、ＰＣＴ第５条の意味での開示を欠き、また、ＰＣＴ第６条の意味での明細書の開示による裏付けを欠いている。さらに、出願時の技術常識を勘案してもＰＣＴ第６条における明確性の要件を欠いている。

そして、請求の範囲１－９に係る発明はこのように発明が十分に開示されたものではないため、国際調査報告の作成にあたっては、IRBITを用いたものについて行った先行技術調査の結果が示してある。

＜第Ⅲ欄について＞

本国際出願の請求の範囲1-20には、以下のＡ～Ｃに掲げる発明に関するものが記載されているものと認められる。

Ａ．IRBIT、IRBITの発現／翻訳を制御する核酸、またはIRBITに対する抗体を含むタンパク質合成の制御のための組成物、タンパク質合成の制御におけるIRBITの使用、IRBITとCPSFの結合の制御物質のスクリーニング方法。

Ｂ．IRBIT、IRBITの発現／翻訳を制御する核酸、またはIRBITに対する抗体を含むイノシトールリン脂質代謝の制御のための組成物、イノシトールリン脂質代謝の制御におけるIRBITの使用、IRBITとPIPKIIの結合の制御物質のスクリーニング方法。

Ｃ．IRBIT、IRBITの発現／翻訳を制御する核酸、またはIRBITに対する抗体を含む細胞内ｐＨの制御のための組成物、細胞内ｐＨの制御におけるIRBITの使用、IRBITとpNBC1の結合の制御物質のスクリーニング方法。

ここで、発明Ａ～Ｃに共通する事項であるIRBITを含む細胞内生物学的機能の制御のための組成物やIRBIT自体は公知である（例えば、山田 秀臣 他, 日本腎臓学会誌, 2005, Vol.47, No.3, p.288、JP 2004-129612 A（理化学研究所）2004.04.30、DEVOGELAERE, B. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, February 2006, Vol.343, pp.49-56 [online]を参照のこと。）。

結果として、IRBITを含む細胞内生物学的機能の制御のための組成物やIRBIT自体は先行技術の域を出ないから、ＰＣＴ規則13.2の第２文の意味において、この共通事項であるIRBITを含む細胞内生物学的機能の制御のための組成物やIRBIT自体は特別な技術的事項ではない。

したがって、発明Ａ～Ｃは単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明とは認められず、発明の単一性を満たさないものとなっている。