

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年6月22日 (22.06.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/064819 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 23/206 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2005/022898

(22) 国際出願日:

2005年12月13日 (13.12.2005)

(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 2004-361158

2004年12月14日 (14.12.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大学
共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構
(HIGH ENERGY ACCELERATOR RESEARCH OR-
GANIZATION) [JP/JP]; 〒3050801 茨城県つくば市大
穂 1-1 Ibaraki (JP). 学校法人順天堂 (JUNTENDO

UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138421 東京都文京区本郷
2-1-1 Tokyo (JP). 国立精神・神経センター総長
が代表する日本国 (JAPAN as represented by PRES-
IDENT OF NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY
AND PSYCHIATRY) [JP/JP]; 〒1878502 東京都小平
市小川東町 4-1-1 Tokyo (JP). 独立行政法人理化
学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市
広沢 2-1 Saitama (JP). 独立行政法人日本原子力研
究開発機構 (JAPAN ATOMIC ENERGY AGENCY)
[JP/JP]; 〒3191184 茨城県那珂郡東海村村松 4 番地
4 9 Ibaraki (JP).

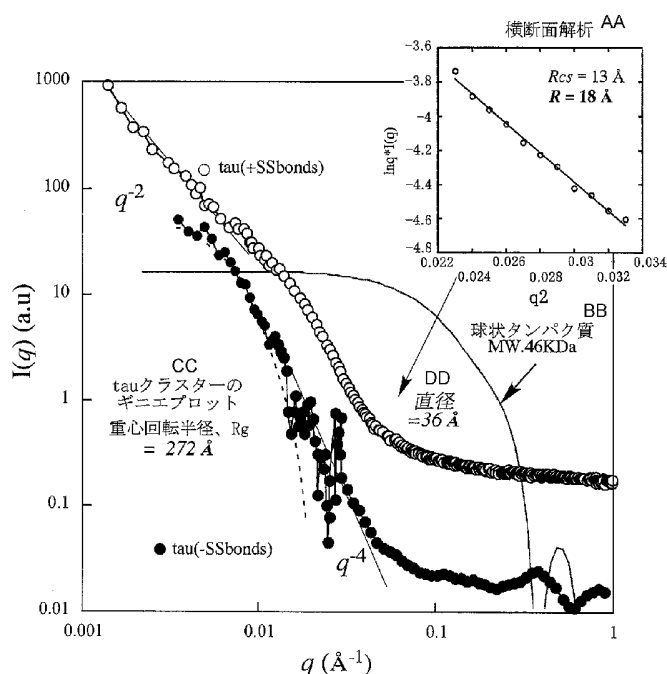
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 内藤 幸雄
(NAITO, Sachio) [JP/JP]; 〒3050801 茨城県つくば市
大穂 1-1 高エネルギー加速器研究機構内 Ibaraki
(JP). 古坂 道弘 (FURUSAKA, Michihiro) [JP/JP]; 〒
3050801 茨城県つくば市大穂 1-1 高エネルギー
加速器研究機構内 Ibaraki (JP). 池田 進 (IKEDA,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING DISEASE CAUSED BY MORPHOLOGICAL CHANGE IN PROTEIN BY USING THE NEUTRON SCATTERING METHOD

(54) 発明の名称: 中性子散乱法を用いたタンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法



(57) Abstract: A method of diagnosing a disease caused by a morphological change in a test protein characterized by comprising irradiating the test protein having been dissolved or dispersed in heavy water with cold neutrons and measuring the morphology of the test protein based on the scattering of the cold neutrons. According to this method, a morphological change in a protein in an aqueous solution can be observed while keeping the protein in the non-invaded and natural state and thus the relationship between the morphological change and a disease can be clarified. As a result, it becomes possible to diagnose a disease caused by the morphological change in the protein and screen a drug.

(57) 要約: 本発明は、重水中に溶解又は分散した被検タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から被検タンパク質の形態を測定することを特徴とする、被検タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法に関する。本発明によれば、タンパク質に対して無侵襲で自然なまま、水溶液中のタンパク質の形態変化を観察でき、その形態変化と疾患との関係を解明することができた。その結果、タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断及び医薬のスクリーニングが可能となった。

AA... SECTIONAL ANALYSIS
BB... SPHERICAL PROTEIN MW.46KDa
CC... GUINIER PLOT OF tau CLUSTER
GRAVITY-CENTER TURNING RADIUS, $R_g = 272 \text{ \AA}$
DD... DIAMETER = $36 \text{ \AA}$



- Susumu) [JP/JP]; 〒3050801 茨城県つくば市大穂 1-1 高エネルギー加速器研究機構内 Ibaraki (JP). 望月秀樹 (MOCHIZUKI, Hideki) [JP/JP]; 〒1138421 東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学医学部内 Tokyo (JP). 安田 徹 (YASUDA, Toru) [JP/JP]; 〒1138421 東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学医学部内 Tokyo (JP). 和田 圭司 (WADA, Keiji) [JP/JP]; 〒1878502 東京都小平市小川東町 4-1-1 国立精神・神経センター内 Tokyo (JP). 青木 俊介 (AOKI, Shunsuke) [JP/JP]; 〒1878502 東京都小平市小川東町 4-1-1 国立精神・神経センター内 Tokyo (JP). 鈴木 淳市 (SUZUKI, Junichi) [JP/JP]; 〒3191195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2 番地 4 独立行政法人日本原子力研究開発機構 東海研究開発センター 原子力科学研究所内 Ibaraki (JP). 藤原 悟 (FUJIWARA, Satoru) [JP/JP]; 〒3191195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2 番地 4 独立行政法人日本原子力研究開発機構 東海研究開発センター 原子力科学研究所内 Ibaraki (JP). 清水 裕彦 (SHIMIZU, Hirohiko) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2-1 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 安達 智宏 (ADACHI, Tomohiro) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2-1 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号共同ビル 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, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, 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

中性子散乱法を用いたタンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法

技術分野

- [0001] 本発明は、生体中に存在するタンパク質の形態変化を、タンパク質に対して無侵襲で自然なまま観察することにより、タンパク質の形態変化に起因する疾患を診断する方法及び医薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

- [0002] 近年、パーキンソン病を初めとして、アルツハイマー病など多くの脳疾患に微小管結合タンパク質タウやシヌクレインの代謝異常や構造異常によるタンパク質の線維化や、細胞内の不要なタンパク質の分解系に関与するプロテオゾームシステムに関与するユビキチンの細胞内リサイクルシステムを司るUCH-L1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) の遺伝子異常に起因するタンパク質凝集体形成と神経原線維細胞変性、細胞死が深く関わっていることが分かってきた。従って、生体中におけるタンパク質の線維化、凝集体形成等の形態変化は、種々の疾患の原因、進展、治癒過程等に深く関与していると考えられている。
- [0003] 従来のタンパク質の構造解析に関しては、結晶化したタンパク質の構造を解析しようとする技術が種々開発されているが、この技術によって生体中のタンパク質の実質的な形態変化(例、自己集合によるオリゴマー形成等)を予測することは大変困難である。そこで、水溶液中でナノレベルのタンパク質構造を解析する技術がいくつか開発されている。このうち、X線小角散乱法によれば、タンパク質の水溶液構造を観察することが可能であるが、特に水中でのX線照射によるタンパク質の損傷は免れ得ず、ラジカル生成・重合反応による分子間共有結合形成が生じる。従って、この方法は、分子間相互作用による複合体構造の解析には不向きである。核磁気共鳴法(NMR)によれば、分子量が3万程度までの単一タンパク質分子であれば、解析が可能であるが、それ以上の分子量を有するタンパク質や複合体を形成すると、¹³Cや¹⁵N等の同位元素を用いて特殊な分子修飾を行わないと解析が困難である。また、原子間

力顕微鏡 (AFM) は、タンパク質を水中でマイカ表面に吸着させ、マイクロプローブでタンパク質表面を走査し、その形状を観察する手法であるが、タンパク質を基盤表面に固定するため、化学修飾が必要となるという問題がある。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] 従って、本発明は、タンパク質に対して無侵襲で自然なまま、水溶液中のタンパク質の形態変化を観察し、その形態変化と疾患との関係を解明し、当該手段を用いた診断方法及び医薬のスクリーニング方法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

- [0005] そこで本発明者は、中性子小角散乱法を用いて水溶液中のタンパク質を観察してきたところ、重水中のタンパク質に冷中性子を照射すれば水溶液中でタンパク質に何ら化学修飾や力学的作用を及ぼさずに、無侵襲で自然なままタンパク質構造を観察でき、かつ正常なタンパク質と異常なタンパク質の水溶液中での形態と、疾患との間に相関性があること、さらにこの結果を用いれば医薬のスクリーニングもできることを見出し、本発明を完成した。

- [0006] すなわち、本発明は、重水中に溶解又は分散した被検タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から被検タンパク質の形態を測定することを特徴とする、被検タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法を提供するものである。

また、本発明は、被検物質で処理された対象タンパク質又は被検物質を投与された動物から分離された対象タンパク質を用いる医薬のスクリーニング方法であって、重水中に溶解又は分散した対象タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から対象タンパク質の形態を測定することを特徴とする、対象タンパク質の形態変化に起因する疾患の治療薬のスクリーニング方法を提供するものである。

発明の効果

- [0007] 本発明方法によれば、生体中に存在する状態と同様である、水溶液中でのタンパク質の構造、形態変化が無侵襲で自然なまま観察できるため、真に生体中で起こっているタンパク質の形態変化と疾患との関係が観察できることになり、種々の疾患の

初期状態、進展状態、治癒過程等が正確に診断でき、かつ医薬がスクリーニングできる。

図面の簡単な説明

- [0008] [図1]中性子小角散乱による重水溶媒中の蛋白質構造の観察方法の概念図である。
- [図2]コア、シェル型のタンパク質構造の散乱ベクトル q と散乱強度 $I(q)$ を求める場合の理論式である。
- [図3]正常型UCH-L1の結晶構造を示す図である。(UCH-L1と同様にhydrolase活性(50%のアミノ酸配列が一致する)を有し、生体に広く分布しているUCH-L3の結晶構造解析データからSWISS-MODELによって解析)
- [図4]球状タンパク質UCH-L1の単量体、二量体からの理論曲線と、実際の正常型UCH-L1の測定結果を示す図である。 $I_o(q)$;測定(●)、 $I_c(q)$;理論曲線、(---)、モノマー;(---)、ダイマー。
- [図5]UCH-L1回転楕円体とした場合の理論曲線である。a. 球状の単量体の短径 a を徐々に変化させた回転円盤体(短径; a 、長径; b 、($=c$))の理論曲線、b. 球状の二量体の短径 a を徐々に変化させた回転円盤体(短径; a 、長径; b 、($=c$))の理論曲線、c. 球状の二量体の短径 a 、($=b$)を徐々に変化させた紡錘体(短径; a 、($=b$)、長径; c)の理論曲線である。
- [図6]正常型UCH-L1及びアミノ酸置換体の中性子散乱曲線及び理論曲線によるフィッティングを示す図である。a. 正常型UCH-L1、 $I_o(q)$;測定(●)、 $I_c(q)$;理論曲線、(---)、モノマー(a , 29 Å, b , ($=c$), 52 Å);(---)、ダイマー、b. I93M置換、 $I_o(q)$;測定(●)、 $I_c(q)$;理論曲線、(---)、モノマー(a , 20 Å, b , ($=c$), 62 Å);(---)、ダイマー、c. S18Y置換、 $I_o(q)$;測定(●)、 $I_c(q)$;理論曲線、(---)、モノマー(a , 43 Å, b , ($=c$), 43 Å);(---)、ダイマー、d. I93M+S18Y置換、 $I_o(q)$;測定(●)、 $I_c(q)$;理論曲線、(---)、モノマー(a , 31 Å, b , ($=c$), 50 Å);(---)、ダイマー。
- [図7]正常型UCH-L1及びアミノ酸置換体の円二色性測定による二次構造変化を示す図である。
- [図8]正常型UCH-L1及びアミノ酸置換による形態変化と機能変化を示す図である

。

[図9]微小管結合タンパク質タウの単分子(自己集合により球状クラスター形成)構造、及び、SS結合形成による線維化を示す図である。線維化タウ(○);SS結合還元・切断によるタウの自己集合体(●)。比較として、黒の実線にタウと同等の分子量を有する球状タンパク質からの理論的散乱曲線を示した。

発明を実施するための最良の形態

- [0009] 本発明の診断方法においては、被検タンパク質を重水中に溶解又は分散して用いる。生体中においてタンパク質は、細胞中又は体液中に溶解して存在している。従って、本発明においては、生体中において、そのタンパク質が存在している自然な状態の形態を観察することができる。ここで被検タンパク質としては、種々の疾患に関与していると考えられるすべてのタンパク質、例えば酵素、膜タンパク質、受容体タンパク質、構造蛋白質等が挙げられる。より具体的な例としては、UCH-L1、微小管結合タンパク質タウ等を挙げる事ができる。
- [0010] これらのタンパク質としては、生体から分離されたタンパク質でもよいし、生体由来の遺伝子を使用して合成されたタンパク質でもよい。遺伝子を使用したタンパク質の合成には、当該遺伝子の構造さえ判明していれば、公知の手法により行うことができる。
- [0011] 重水中のタンパク質濃度は、特に限定されないが、 $10\ \mu\text{M}$ 以上あれば十分である。好ましくは $10\ \mu\text{M}\sim 100\text{mM}$ 、より好ましくは $10\ \mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ である。
- [0012] 冷中性子は、公知の手段により中性子から変換させることができる。すなわち、加速器によって加速された陽子等の粒子線を重元素(例えば、ウラン、タングステン、水銀 etc)からなるターゲットにあて、原子核の分裂的崩壊を起こさせ、パルス中性子を得、これを減速材(液体水素、液体重水素、固体メタン等)で冷却することにより得られる。同様に原子炉からウランの崩壊に伴い発生する中性子も同様な方法で冷中性子に変化できる(新高分子実験学6 高分子構造(2)散乱実験と形態観察、p282 高分子学会編 共立出版株式会社参照)。ここで冷中性子の波長は、およそ $0.5\sim 1.5\text{nm}$ 前後である。
- [0013] 当該冷中性子は、タンパク質の原子核に照射しても、散乱するだけで原子核を破

砕しないためタンパク質へのダメージは殆どない。冷中性子の原子に対する散乱能は、原子の散乱長密度によって決まる。特に、重水素(^2H , deuterium; D)は大きな正の散乱長を有するのに対し、軽水素(^1H)のそれは負である。このことを利用すると、冷中性子は相対的に、タンパク質中の水素原子(^1H)に散乱されやすく、溶媒である重水(D_2O)に吸収されやすい性質を有している。従って、重水中にタンパク質を溶解、分散すると、大きなコントラストが生じ、タンパク質構造が観察できる(中性子小角散乱法)。その解析範囲は、数Åからサブミクロンに及ぶ。この概念図を図1に示す。

[0014] ここで、中性子小角散乱法について説明する。生成した冷中性子はスリット系の中性子導管を通じて、試料に照射させる。試料から生じた散乱光の検出は、二次元検出器が用いられる。測定したい q (運動量変化)範囲に応じて真空チャンバー中を移動してカメラ長を任意に変えることができる。カメラ長に応じてスリット部のコリメーションも調整する必要があるが、この機構により、広い q 範囲で精度良いデータを得ることができる。異なるカメラ長、すなわち q 範囲で測定を行い、それらを重ね合わせて1本の合成曲線にすることもできる。セル部分は、温度制御やサンプルチェンジャーなどが組込めるような工夫をするのが好ましい。高温や低温、高圧などの特殊セルユニットも用いることができる。

[0015] 試料セルとしては、角型又は太鼓型の石英製の容器を用いるのが普通である。中性子線は、ホウ素フリーの石英ガラスをほとんど吸収されることなく透過するので、セル容器壁の厚さは1mm程度の扱いやすいセルを使用できる。100% D_2O で1~10mmとするのが普通である。セル厚が薄いほど散乱は弱く、長時間の積算を要する。セルは超音波洗浄などで十分に清浄にするのが望ましい。

[0016] 散乱光の測定は、散乱測定と別個に透過率(transmittance)の測定を行い、その値を用いてセル及び溶媒などによるバックグラウンド散乱を差引くことにより行うのが好ましい。組成が既知であれば計算で差引くこともできるが、十分に広角側まで測定し、このバックグラウンドを実験的に求め差引くことが好ましい。中性子小角散乱法ではポイントビームを用いるので、通常デスメアーの必要はない。等方性試料の場合は、二次元検出器で得られた二次元データのサーキュラーアベレージをとり、一次元デ

ータに変換する処理をコンピュータで行う。

- [0017] 散乱光のコンピュータ処理により、タンパク質の形態が観察できるので、この形態の変化、例えば形状及び／又は大きさの変化を観察することにより、疾患の診断ができる。診断に用いる解析方法とは、表1、2、3に示すように様々なタンパク質の形状を予測して、散乱ベクトル、 $q = (4\pi / \lambda) \sin \theta$ と散乱強度を計算し、どの形状が最も実験値に相応しいか解析できる。

- [0018] [表1]

タンパク質の形状変化に伴う散乱ベクトル q と散乱強度 $I(q)$ の関係

球 (半径 R)

$$I(q) = \Phi^2(q) = \left[\frac{3(\sin x - x \cos x)}{x^3} \right]^2, \quad x = qR$$

楕円($a, a, v a$)

$$I(q) = \int_0^{x/2} \Phi^2(qa\sqrt{\cos^2\theta + v^2\sin^2\theta}) \cos\theta \, d\theta$$

円柱(半径 R , 高さ $2H$)

$$I(q) = \int_0^{x/2} \frac{\sin^2(qH \cos\theta)}{q^2 H^2 \cos^2\theta} \frac{4J_1^2(qR \sin\theta)}{q^2 R^2 \sin^2\theta} \sin\theta \, d\theta$$

ガウスコイル

$$I(q) = 2 \left(\frac{e^{-x} + x - 1}{x^2} \right), \quad x = q^2 \langle R^2 \rangle$$

- [0019] [表2]

様々な高分子からの散乱理論式と回転半径(S)

細くて長い棒 (針) (長さ L, $x=Lq/2$) ⁽¹⁾

$$\langle S^2 \rangle = \frac{L^2}{12}$$

$$I(q) = \frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin 2}{2} d2 - \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2 = 1 - \frac{1}{9}x^2 + \frac{2}{225}x^4 - \frac{6}{2205}x^6 + \frac{2}{127575}x^8 - \dots$$

ガウスコイル ⁽²⁾

$$\langle S^2 \rangle = nb^2 / 6 \equiv \langle S^2 \rangle_{\text{linear}}$$

$$I(q) = \frac{2}{x^2} (e^{-x} - 1 + x), \quad x = \langle S^2 \rangle^2 : \text{Debye Function}$$

$$I(q) = \frac{1}{1 + q^2 \langle S^2 \rangle / 2}, \quad (\text{Approx, error} < 15\%)$$

f 本のガウス鎖からなる星型高分子 ⁽³⁾

$$\langle S^2 \rangle_{\text{star}} = \frac{3f-2}{f^2} \langle S^2 \rangle_{\text{linear}}$$

$$I(q) = \frac{2}{fF} \left(F - (1 - \exp(-F)) + \frac{f-1}{2} (1 - \exp(-F))^2 \right)$$

$$F = \frac{f}{3f-2} x, \quad x = q^2 \langle S^2 \rangle = q^2 nb^2 / 6$$

ランダム f 分岐高分子 ⁽⁴⁾

$$I(q) = \frac{1}{1 + \frac{x}{3}}, \quad x = q^2 \langle S^2 \rangle = q^2 nb^2 / 6$$

楕円高分子, 枝 f 本 (重合度 $D_p = n_b$), 主鎖重合度 N_0 . ⁽⁵⁾

$$I(q) = \frac{2}{x^2} \left\{ x - (1 - e^{-x\lambda}) + (1 - e^{-x(1-\lambda)/f}) \left[f - \frac{2(1 - e^{-x\lambda})}{x\lambda f} \right] + (1 - e^{-x(1-\lambda)/f})^2 \left[\frac{x\lambda - (1 - e^{-x\lambda})}{x^2\lambda^2 / f(f-1)} \right] \right\}$$

$$\lambda = \frac{N_0}{N} = \frac{N_0}{N_0 + fn_b}, \quad x = q^2 \langle S^2 \rangle = q^2 nb^2 / 6$$

環状高分子, $(v = \sqrt{\lambda}(u-1/2), \lambda = q^2 nb^2 / 6)$, ⁽⁶⁾

$$\langle S^2 \rangle_{\text{Ring}} = \frac{nb^2}{12} = \frac{1}{2} \langle S^2 \rangle_{\text{linear}}$$

$$I(q) = \frac{2}{\sqrt{\lambda}} \exp - \frac{\lambda}{4} \int_0^{\sqrt{2}} \exp(v^2) dv$$

良溶媒中の排除体積効果を伴う非ガウス鎖⁽⁷⁾

$$I(q)^{-1} = \frac{(1+\varepsilon)(1+5\varepsilon/6 + \varepsilon^2/6)^{1/(1+\varepsilon)} x^{1/(1+\varepsilon)}}{2\Gamma\{1/(1+\varepsilon)\}} + \frac{(1+\varepsilon)\Gamma\{2/(1+\varepsilon)\}}{2\Gamma^2\{1/(1+\varepsilon)\}}$$

ε : non - Gaussian parameter

半屈曲性高分子(Kratky-Porod Chain)

$$\langle S^2 \rangle = \frac{bL}{6} \left[1 - \frac{3}{2n} + \frac{3}{2n^2} - \frac{3}{2n^3} (1 - e^{-2n}) \right] \quad (\text{Benoit Doty, 1953})$$

$$\text{End-to-End Distance : } \langle R^2 \rangle = \frac{L}{\lambda} - \frac{1}{2\lambda^2} (1 - e^{-2\lambda L})$$

L : contour length, λ^{-1} : stiffness parameter

Kuhn Segment Length $A_k = \lim(\langle R^2 \rangle / L) = b = 2Lp, \leq \lambda^{-1}$

$$I(q) = \frac{2(e^{-x} + x - 1)}{x^2} + \left[\frac{4}{15} + \frac{7}{15x} - \left(\frac{11}{15} + \frac{7}{15x} \right) e^{-x} \right] \left(\frac{b}{L} \right), \quad x = \frac{Lbq^2}{6}$$

(Sharp and Bloomfield, 1968)

where $L = bn$: conlour length, b : length of the statistical chain element

[0021] (1) 松岡秀樹「コロイド、ミセル、高分子溶液への応用」日本結晶学会誌、41、269 (1999).

(2) J. S. Higgins, H. G. Benoit, "Polymer and Neutron Scattering", Oxford, (1994).

(3) O. Kratky, O. Glatter, ed. "Small-angle X-ray Scattering", Chap. 12, Academic 1982.

(4) T. Neugebauer, Ann. Phys., 42, 509 (1943).

(5) P. Debye, J. Phys. Colloid Chem., 51, 18 (1948).

(6) H. Benoit, J. Polym. Sci., 11, 507 (1953).

(7) K. Kajiwara, W. Burchard, M. Gordon, Br. Polym. J., 2, 110 (1970).

その他の参考文献

E. F. Casassa, G. C. Berry, J. Polym. Sci., A-2, 4, 881 (1966).

E. F. Casassa, J. Polym. Sci., A, 3, 605 (1965).

O. B. Ptysyn, Zhurnal Fizicheskoi Khimii, 31, 1091(1957).

A. Peterlin, J. Chem. Phys. , 23, 2464(1955).

- [0022] また、散乱ベクトル、 q 、が大きい領域($q \sim 1/R_g$ 、 R_g は重心回転半径)ではギニエの法則(参考文献:A. Guinier, G. Fournet, Small Angle Scattering of X-rays, Wiley, New York, 1955.)によれば、散乱ベクトル q と散乱強度 $I(q)$ の関係は、 $I(q) = I(0) \exp(-1/3 R_g^2 q^2)$ と表すことができ、表4に示すような計算により、タンパク質の形状を推定することもできる。 $I(0)$ は q を0外挿して得られる値であり、散乱強度を絶対値換算すると、この値は分子量に依存する値となる(参考文献:Jacrot and Zaccai(Biopolymers, 20(1981), 2413-2426))。

- [0023] [表4]

様々なタンパク質の重心回転半径 R_g と形状パラメーターの関係

粒子の形状	形状パラメーター	関係式
球	半径 R	$R_g^2 = (3/5)R^2$
円柱	半径 r , 長さ L	$R_g^2 = (r^2/2) + (L^2/12)$
回転楕円形	半径長 a , a , $r a$	$R_g^2 = a^2(2 + r^2)/5$
薄い円盤	半径 R	$R_g^2 = R^2/2$
細い棒状	長さ L	$R_g^2 = L^2/12$
直方体	$2 a$, $2 b$, $2 c$	$R_g^2 = (a^2 + b^2 + c^2)/3$

- [0024] また、タンパク質の中心にコアを形成するような複雑なタンパク質構造についても、図2に示すような解析方法(J. Marignan, P. Basserau, and P. Delord, J. Phys. Chem. , 90, 645(1986))によって、形状パラメーターを求めることができる。

- [0025] 一方、散乱ベクトル q が比較的大きな領域では、棒状のタンパク質で、散乱ベクトル q と断面の重心平均半径 R_c との関係が、 $q^2 * R_c^2 < 1$ である時、すなわち、棒の太さに対応する散乱強度 $I(q)_{thin}$ が棒の長さ L に対して、 $L \pi / q$ の関係のある時、 $\ln(I(q)) = K + (-1/2 * R_c^2 * q^2)$ となるため、 $\ln(I(q))$ と q^2 でプロットして得られる直線の傾きより R_c を求めることができる。実際の断面半径 R は、 $R = R_c^{1/2}$ から求めることができる(参考文献;H. Matsuoka et al. , J. Colloid. Interface Sci. , 118, 387(1987))。

- [0026] ここでは、例えば、パーキンソン病の発症に関わるユビキチンリサイクル機能を有す

る、UCH-L1について、正常型UCH-L1タンパク質構造と、パーキンソン病危険増幅因子であるUCH-L1 (I93M置換体)とパーキンソン病危険軽減因子であるUCH-L1 (S18Y置換体)のヒト遺伝子から大腸菌を用いてタンパク質を合成・精製し、重水素中で構造を解析した。その結果、(1)UCH-L1は、水中で二量体として存在する。(2)二量体を形成する単量体の構造は各々異なっており、パーキンソン病危険増幅因子であるUCH-L1 (I93M置換体)は正常型よりも楕円性が高く、一方、パーキンソン病危険軽減因子であるUCH-L1 (S18Y置換体)は、楕円性が低く、ほぼ球状の二量体であることが判明した。タンパク質の球状性は円二色性計測によるタンパク質内部の β -ターン(折り返し構造)の増加(球状性増加)・減少(楕円性増加)によっても裏付けられる。

[0027] ユビキチンリサイクル機能である加水分解活性はI93M<正常型<S18Yの順に高く、タンパク質の球状性(globularity)とは病理学的にも一致することを初めて明らかにした。この手法を用いれば、タンパク質の遺伝子変異による水中での実質的な構造変化が判明するため、病理的な予知と診断が可能となる。

[0028] 正常な微小管結合タンパク質タウの水中での単分子構造と、脳疾患で見られるタウの線維構造(病的状態)をin vitroで直接比較した例はない。中性子小角散乱法で、SS結合で部分的に架橋されたタウ分子は直径が36 Åの線維状の長線維を形成するが、SS結合を完全に切断すると、タウは自発的に半径が350 Åの球状クラスターを形成することが明らかになった。これにより、正常な状態から病的な状態に至るプロセスの解明が容易となり、細胞変性や細胞死を誘発する異常なタンパク質の線維化を抑制する医薬の開発が可能となる。

[0029] また、被検物質で処理された対象タンパク質又は被検物質を投与された動物から分離された対象タンパク質を試料として、前記同様に中性子小角散乱法により形態を測定すれば、当該被検物質が医薬として有用か否かがスクリーニングできる。ここで、対象タンパク質は、前記被検タンパク質と同様に、合成されたものでも生体から分離されたものでもよい。

[0030] 本発明によれば、病因に関わるタンパク質を直接生体より抽出・精製するか、あるいは、脳のように直接タンパク質の抽出が困難な場合、クローニングした遺伝子からタ

ンパク質を合成・精製した試料に対して本発明により直接タンパク質構造(複合体)を観察し、正常型と比較することで、診断が実施できる。

[0031] また、UCH-L1のような二量体形成タンパク質に対しては、遺伝子治療により、I93M変異型パーキンソン病患者にS18Y球状タンパク質を発現させ、酵素機能を回復させる可能性への道を開く、また、異常タンパク質の形状を正常に回復させ(球状化)、機能を回復させる薬剤のスクリーニング方法となる。また、タウのような異常なタンパク質会合・凝集に対する抑制剤のスクリーニングが可能となる。

[0032] 疾患患者から抽出した病的因子の候補となる種々のタンパク質と正常人から抽出された正常なタンパク質を比較し、どのタンパク質の形態が変化しているかを検査し、発症原因を明らかにすることができる。また、脳疾患のように被検タンパク質が直接抽出できない場合には、患者から抽出した遺伝子からタンパク質を合成し、正常なタンパク質と比較することにより診断を行うことができる。更には、正常なタンパク質であっても代謝異常によって線維化など、異常な高分子体が認められる疾患では、タンパク質が直接抽出されたものか、あるいは遺伝子から合成されたかに関わらず、正常なタンパクに種々の処理、例えばリン酸化や酸化ストレスを負荷し、負荷前後の形態を比較すれば、どのような代謝過程の異常により正常なタンパクが高分子化するかがわかり、発症原因を明らかにすることができる。また、さらにはこれらの知見に基づき、現状における治療方針の決定、遺伝子治療への展開、タンパク質の異常な会合や凝集を抑制する新規医薬スクリーニング方法への展開や、強いては疾患予防対策法を図ることが可能となる。

[0033] 本発明において、診断又はスクリーニングされる医薬の対象となる疾患は、タンパク質の形状や大きさの変化に起因する疾患であり、例えば脳内タンパク質であるシヌクレインの遺伝子異常が関連する家族性パーキンソン病、特発性パーキンソン病、ユビキチンリサイクル機能を有する、UCH-L1の遺伝子異常に関連する家族性パーキンソン病が挙げられる。また、Tauopathyと称される神経原線維変化型痴呆で、一般的なアルツハイマー病の他、タウ遺伝子の変異が認められる前頭側頭葉痴呆、老人斑が認められない神経原線維優位痴呆がある。一方、電子顕微鏡で観察すると、周期が80nmで繰り返し構造を有する、タウのPHF(paired helical filament)が

見られる疾患としては、遺伝性疾患や発達異常、炎症性疾患でも認められるが、常染色体劣性遺伝疾患では、Niemann-Pick type C等の代謝疾患、Hallervorden-Spatz症候群等の変性疾患、常染色体優性遺伝疾患では、筋ジストロフィー症、家族性プリオン病が揚げられる。また、亜急性硬化性全脳膜炎等の慢性疾患がある。家族性のPick病では、PHF (paired helical filament)の主な構成要素である異常なタウ (three repeat tau)凝集体が見られる。正常なタウ (four repeat tau)でも、例えば進行性核上性麻痺や皮質基底核変性症では、その凝集体が認められている。更には、ポリグルタミンが蓄積する疾患としては、ハンチントン舞踏病やマシヤド・ジョセフ病が挙げられる。本発明は、これらの脳疾患に制限されるものではなく、種々のタンパク質構造異常に起因する細胞死を伴う、癌やエイズ等のウイルス性疾患、感染症、代謝異常病、先天性疾患など生体の広範囲な領域に渡る様々な組織・細胞でのタンパク質構造異常の診断・治療・新薬スクリーニングにも応用できる。

実施例

[0034] 実施例1

中性子散乱法によるUCH-L1の遺伝子変異タンパク質の構造解析によるパーキンソン病の診断

ヒト正常型 UCH-L1 cDNA及び、これにI93M, S18Y, I93M+S18Yの変異を加えたcDNAを調製した。各々のcDNAを大腸菌用の発現ベクターpPROtet E233にサブクローニングし、大腸菌株DH5aPROへ導入した。得られた形質転換体をCircle Grow mediumでODが約0.5になるまで37℃で振とう培養し(約2時間)、最終濃度0.1mMになるようにイソプロピルーβ-D-チオガラクトシド(IPTG)を加えた後、さらに6時間培養した。菌体を遠心操作(5000×g、20分、室温)により回収し、20mM HEPES、pH7.8に懸濁した。超音波破碎法により菌体を溶解し、Co²⁺-Sepharose (TALON purification kit, Clontech)を用いて、指示に従いUCH-L1を精製した。これを凍結乾燥し、-80℃で保存した(参考文献;K. Nishikawa, et. al., B. B. R. C., 304, 176-183(2003))。

[0035] 濃度が0.86mg/mLとなるように重水を用いた緩衝液(最終的に、50mM HEP

ES pH7.8, 5mMジチオスレイトール(DTT))に溶解し、高エネルギー加速器研究機構に設置された中性子散乱装置(WINK、 $0.03 < q(\text{\AA}^{-1}) < 0.15$)により中性子散乱測定を室温下で行った。ここで、 q は、ブラッグ角を θ 、とした時に $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ と表される運動量変化である。溶媒とUCH-L1溶液の透過率を測定し、バックグラウンドを差し引き、標準化して得られた各々の散乱強度を求めた。UCH-L1溶液からの散乱強度から溶媒の散乱強度を差し引いたものを、タンパク質から散乱する中性子の散乱強度とした。

- [0036] 次に水溶液中でのタンパク質の形態を解析する。タンパク質の水中での構造から予測される理論的な中性子散乱曲線と、実験で得られたUCH-L1の中性子散乱曲線が最も一致するようなタンパク質の形態を求めた。より具体的には、UCH-L1の結晶構造はまだ未知であるが、UCH-L1と同様にhydrolase活性(50%のアミノ酸配列が一致する)を有し、生体に広く分布しているUCH-L3の結晶構造解析データからSWISS-MODELによって解析(参考文献; Schwede, T. et al., *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385(2003).、Guex, N. et al., *Electrophoresis* 18, 2714-2723(1997).、Peitsch, M. C., *Bio/Technology* 13, 658-660(1995).)した結果を用いて、UCH-L1の結晶構造を算定した(図3)。次に結晶構造情報より、タンパク質の回転半径を計算すると(参考文献; Svergun, D. I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2267-2277(1998).、Svergun, D. I. et al., *J. Appl. Cryst.* 28, 768-77(1995).)、重心回転半径 R_g が、16.5 Å(実際の回転半径は、

- [0037] [数1]

$$R = \sqrt{5/3} R_g$$

- [0038] である球状タンパク質であることが想定された。算定された球状タンパク質の半径から、重水中でのUCH-L1の単量体の中性子散乱曲線を次式(1)により、理論的に得ることができる。また、二量体についても二分子の中心間距離から求めることができる。

- [0039] [数2]

$$I(q) = \left(3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)^2 \quad (1)$$

[0040] 図4に、算定した球状タンパク質UCH-L1の単量体、二量体からの理論曲線と、実際の正常型の測定結果を示す。明らかに単量体ではなく二量体に近いが、更に球状でないことが分かった。そこで、タンパク質の体積はアミノ酸数が一定であれば、変形してもその体積はあまり変化しないので、徐々にタンパク質の形状を回転円盤体(短径; a 、長径; b 、($=c$))もしくは紡錘体(短径; a 、($=b$)、長径; c)として変形させ、更にこれらの形態として、単量体及び二量体を予測した。これらのタンパク質を全て5 Åの立方体に分割し、分割された立方体間の散乱長密度差は水素原子(H)と重水素(D)間の差に比べると極めて小さいことを考慮し、タンパク質の全ての部位間の相関を計算することにより、水溶液からの理論的な中性子散乱曲線を次式(2)により求めた。図5aに単量体もしくは二量体の5 Åの立方体間全ての相関を求める場合の概念図を示す。図5bは単量体の回転円盤体(短径; a 、長径; b 、($=c$))で短径、 a 、を次第に変化させた場合の散乱ベクトル q と散乱強度 $I(q)$ との関係を示す。図5cは二量体とした場合の回転円盤体(短径; a 、長径; b 、($=c$))で短径、 a 、を次第に変化させた場合の散乱ベクトル q と散乱強度 $I(q)$ との関係を示す。更に、図5dは二量体でも、紡錘体(短径; a 、($=b$)、長径; c)として、短径、 a 、を次第に変化させた場合の散乱ベクトル q と散乱強度 $I(q)$ との関係を示す。図5bの回転円盤体二量体のみににおいて、 $0.1 < q(\text{\AA}^{-1}) < 0.15$ の範囲で、特徴的な散乱強度の減衰が見られ、図4のUCH-L1の散乱曲線は回転円盤体に最も近いことが分かる。

[0041] [数3]

$$I(q) = \sum_i \sum_j f_i f_j \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}} \quad (2)$$

[0042] 次に、実験値と理論値の差が最小となるように、次式(3)を用いてフィッティングを行った。

[0043] [数4]

$$R = \frac{\sum_q ((mI_e(q) - n - I_c(q))q^2)^2}{\sum_q (I_c(q)q^2)^2} \quad (3)$$

[0044] ここで、 m はスケーリングファクター、 n はバックグラウンドファクター、 $I_e(q)$ は実際に中性子散乱測定で得られた散乱強度、 $I_c(q)$ は理論的に得られた散乱強度である。 R が最も小さくなるようなタンパク質の形態をUCH-L1の水溶液中の構造とした。紡錘体では長径が極めて長い紡錘体でなければ、実際の測定曲線と一致しなかったため、回転円盤体を採用した。図6に示すように、正常型UCH-L1、I93M、S18Y、I93M+S18Y全ては二量体であるが、二量体を形成する単量体は、正常型[短径、29 Å; 長径、52 Å (図6a)]、I93M[短径、20 Å; 長径、62 Å (図6b)]、S18Y[短径、43 Å; 長径、43 Å (図6c)]、I93M+S18Y[短径、31 Å; 長径、50 Å (図6d)]であった。すなわち、アミノ酸置換によって、水中での単量体の球状性は異なることが判明した。アミノ酸置換によるUCH-L1の球状性変化は、タンパク質の二次構造における β -ターン(ペプチド鎖の折り返し)含有率とよく相関することが知られている。図7に円二色性測定結果から、 α -ヘリックス、 β -シート、 β -ターン、ランダムコイル成分が、アミノ酸置換によってどのように変化したかを示した。正常型と比較して、I93M置換により、 β -シートの増加、 β -ターンの減少が見られた。一方、正常型と比較して、S18Y置換により、 β -ターンの増加が見られた。更にI93M置換体と比較しても、S18Y置換により、 β -ターンの増加が見られた。すなわち表5に示すように、中性子散乱実験から得られた、アミノ酸置換によるUCH-L1の球状性変化と、円二色性測定による β -ターンを指標としたUCH-L1の球状性変化はよく一致することが確認された。

[0045] [表5]

UCH-L1 のアミノ酸置換による中性子散乱から求めた
 橢円性の相対的変化と β -turn 含有率の導体的変化の関係

Type	Amino acid substitution	Circular raito	Relative change of ellipsoidal	β -turn content (%)	Relative change of β -turn
Wild	non	1.8 [*]	-	6.6	-
	I93M	3.1 [*]	0.58 ^a	5.0	0.76 ^d
	S18Y	1.0 [*]	1.79 ^a	7.8	1.18 ^d
I93M mutant	S18Y	1.6 [*]	1.93 ^b	5.8	1.56 ^e
S18Y polymorphism	I93M	1.6 [*]	0.52 ^c	5.8	0.64 ^f

* 橢円率は中性子散乱による回転円盤体の b/a 値から計算した。

^a I93M と S18Y の相対的な橢円率の変化はwild-typeの橢円率に対する相対的な変化として計算した。

^b I93M の橢円率に対する相対的な変化として, ^c I93M の橢円率に対する相対的な変化として, 計算した。

^d I93M と S18Y の相対的な β -turn 含有率の変化はwild-typeの含有率に対する相対的な変化として計算した。

^e I93M の β -turn 含有率に対する相対的な変化として, ^f I93M の β -turn 含有率に対する相対的な変化として計算した。

- [0046] これらの結果とUCH-L1の機能、すなわちユビキチンの細胞内回収機能である加水分解活性から、図8に要約するように、
- (1) UCH-L1は水中で二量体を形成している。
 - (2) アミノ酸置換により、二量体を形成するUCH-L1の単量体の球状性は変化し、I93M置換ではより球状から変形した形状となり、一方、S18Y置換ではより球状性が高まる。
 - (3) より変形されたI93M置換体では、加水分解活性が低下し、パーキンソン病危険増幅因子となる。
 - (4) より球状性の高いS18Y置換体では、加水分解活性が増加し、パーキンソン病危険軽減因子となって発症を抑制する。

[0047] 以上が明らかになった。このように、中性子散乱法を用いることにより、従来の結晶構造解析からは予測が困難であった、生体に即した水中でのタンパク質の形態を明らかにすることが可能であるばかりではなく、タンパク質の形態を正常なタンパク質と比較すれば、パーキンソン病の診断ができることが判明した。

[0048] 実施例2

中性子散乱法による微小管結合タンパク質タウの構造解析によるアルツハイマー病の診断

大腸菌用の発現ベクターpRK172にヒトTau 40蛋白質(441アミノ酸)のcDNAをサブクローニングし、大腸菌株BL21 (DE3) pLysSへ導入した。得られた形質転換

体をCircle Grow mediumでODが約0.5になるまで37℃で振とう培養し(約2時間)、最終濃度が0.1mMになるようにIPTGを加えた後、さらに6時間培養した。菌体を遠心操作(5000×g、20分、室温)により回収し、PC buffer(20mM MES-NaOH, pH6.8, 0.5mM Mg Acetate, 1mM EGTA, 2mM PMSF)に懸濁した。超音波破碎法により菌体を溶解し、1/150倍量の2-メルカプトエタノール、最終濃度0.8mMのNaClを加えた後、95℃で15分間処理した。冷却後、遠心(20000×g、30分、4℃)して上清を回収し、PC bufferに対して一晚透析した。PC bufferで平衡化したPC11樹脂と、透析後の蛋白質溶液を混合し、4℃で5時間以上攪拌した。0.1mM NaClを含むPC bufferで樹脂を十分に洗浄した後、0.5mM NaClを含むPC bufferによりTau 40蛋白質画分を溶出した。Tau 40蛋白質画分をMilliQ水に対して一晚透析し、更に50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 10mM DTT, pH7緩衝液に置き換え、凍結乾燥した後、中性子散乱実験に供した。また、タウ精製過程において、空気酸化で一旦タウ分子間にSS結合が形成されると、容易にこれを還元・切断できないため、SS結合による高分子化現象を解消するため、更に、20mM DTTを加えて70℃で加熱し、SS結合を還元・切断したタウについても同様に中性子散乱測定を行った。高分子化したタウは、日本原子力研究所の中性子散乱装置(SANS-J; $0.0013 < q(\text{\AA}^{-1}) < 0.014$)、及び高エネルギー加速器研究機構の中性子散乱装置(SWAN; $0.009 < q(\text{\AA}^{-1}) < 0.99$)で測定した。また、SS結合を還元・切断し、精製された低濃度のタウについては、日本原子力研究所の中性子散乱装置に40枚の物質レンズを組み込むことにより、中性子を集光させて測定した。

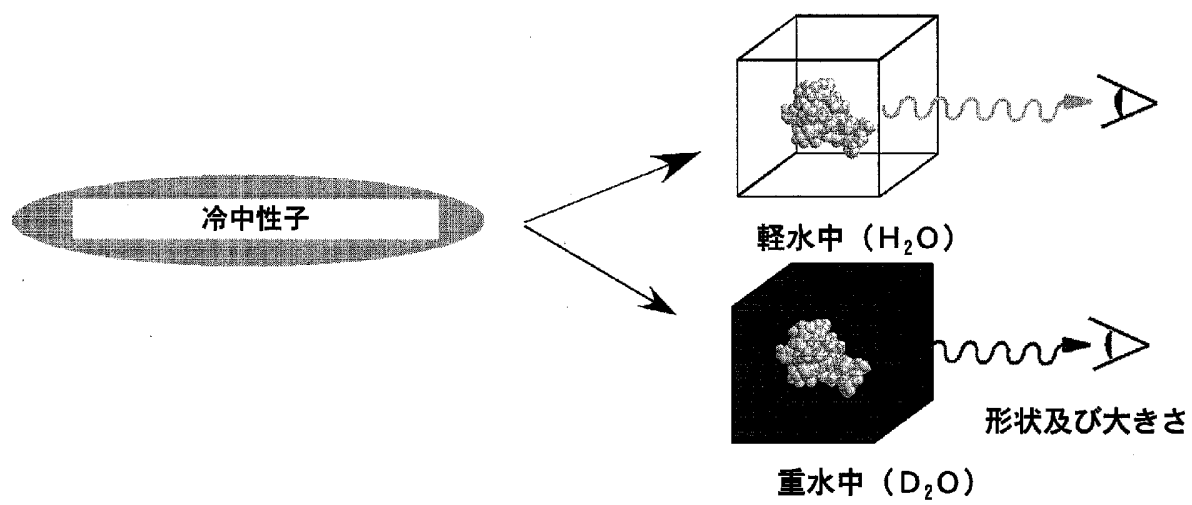
- [0049] 結果を図9に示す。SS結合を還元・切断する前のタウは、 $q < \sim 0.008 \text{\AA}^{-1}$ で見られるように、直線の傾きが、 q^{-2} に比例することから、ランダムコイルを形成して水中に溶解・分散しており、鎖の太さは、 $0.009 < q(\text{\AA}^{-1}) < 0.025$ の範囲で横断面解析(参考文献; H. Matsuoka et al., J. Colloid. Interface Sci., 118, 387(1987))を行った結果(図5中の挿入図)、直径が36Åであることが判明した。一方、SS結合を還元・切断した後は散乱曲線は処理前と全く異なり、 q が小さくなるにつれ、散乱強度は増加しなくなり、また、 q が大きくなるにつれ、散乱強度の減少は q^{-4} に比例

することから粒子は球状となっていることが判明した。Gunier法(参考文献;A. Gunier, et. al. , “Small-angle Scattering of X-rays”, Wiley, New York(1955))により、粒子の回転半径は350 Åであり、数十個のタウ分子が自己集合によって会合し、球状クラスターを形成していることが判明した。正常なタウであっても、種々の脳疾患で凝集体が見つけられている。従って、本解析により、正常なタウ分子は水溶液中で、他のタンパク質と結合するか、あるいは弱い分子間相互作用によって会合体を形成しているが、酸化ストレスが細胞に加わると、分子間にSS結合が導入され、線維化してしまうことが判明した。中性子散乱法を用いる評価系により、脳細胞内で生じる異常なタンパク質の高次構造化現象をin vitroで再現することができ、これを阻害、抑制するような新規薬剤のスクリーニングが可能となる。

請求の範囲

- [1] 重水中に溶解又は分散した被検タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から被検タンパク質の形態を測定することを特徴とする、被検タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法。
- [2] 被検タンパク質の形態変化が、被検タンパク質の形状及び／又は大きさの変化である請求項1記載の診断方法。
- [3] 被検タンパク質が、生体由来の遺伝子を使用して合成されたもの又は生体から分離されたものである請求項1又は請求項2記載の診断方法。
- [4] 被検物質で処理された対象タンパク質又は被検物質を投与された動物から分離された対象タンパク質を用いる医薬のスクリーニング方法であって、重水中に溶解又は分散した対象タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から対象タンパク質の形態を測定することを特徴とする、対象タンパク質の形態変化に起因する疾患の治療薬のスクリーニング方法。
- [5] 対象タンパク質の形態変化が、対象タンパク質の形状及び／又は大きさの変化である請求項4記載のスクリーニング方法。
- [6] 対象タンパク質が、生体由来の遺伝子を使用して合成されたもの又は生体から分離されたものである請求項4又は5記載のスクリーニング方法。

[図1]



[図2]

$$I(q) \sim \int_0^{\pi/2} (k_{12} V_1 \phi(2\pi a q g_1(\theta)) + k_{20} V_2 \phi(2\pi(a+d)q g_2(\theta)))^2 \cos \theta d\theta$$

J. Maignan, P. Basserau, and P. Delord, *J. Phys. Chem.*, **90**, 645 (1986)

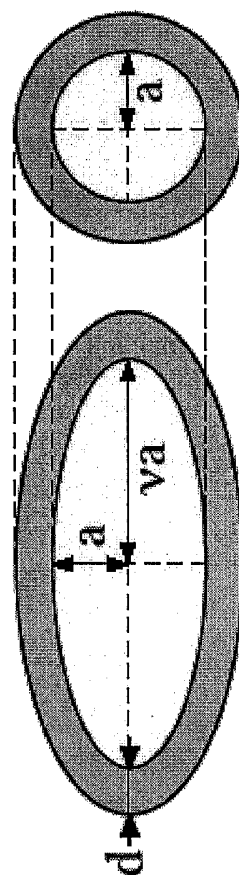
$$\phi(u) = 3(\sin(u) - u \cos(u)) / u^3$$

 k_{12} : コアとシェル間のコントラストファクター

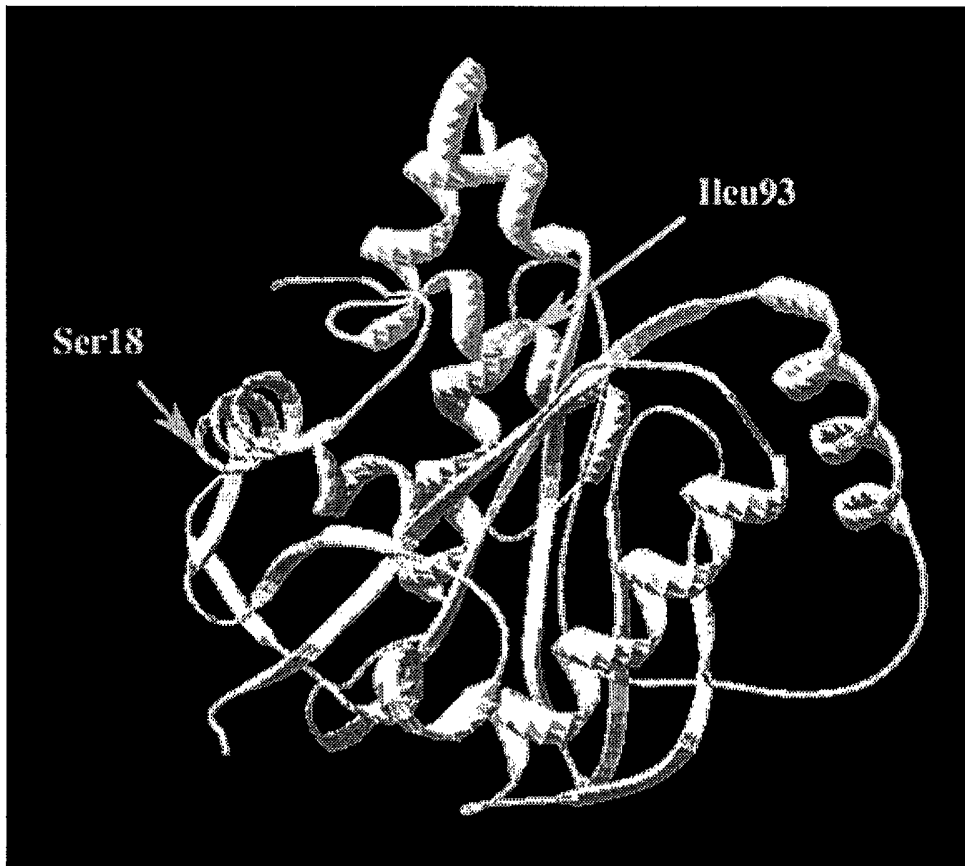
$$g_1(\theta) = (\cos^2 \theta + v^2 \sin^2 \theta)^{1/2}$$

 k_{20} : コアと溶媒間のコントラストファクター V_1, V_2 : コアとシェルの体積

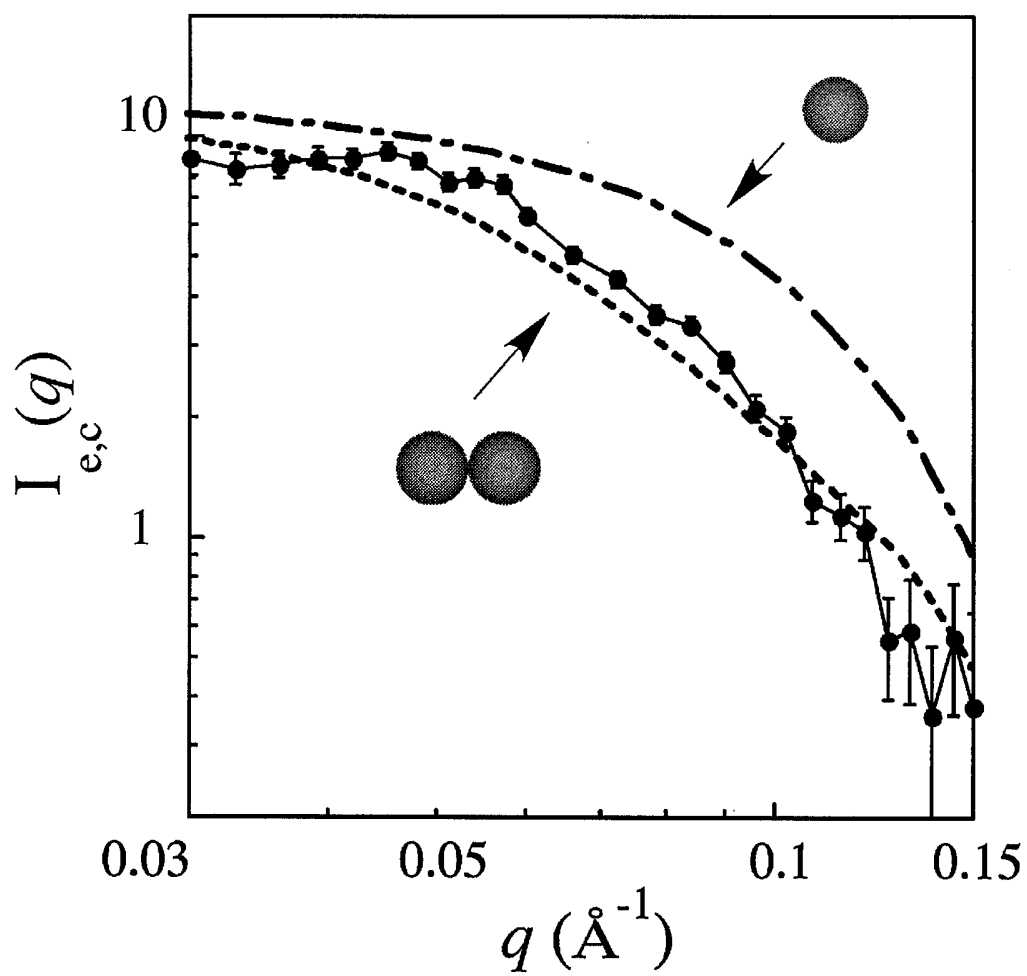
$$g_2(\theta) = (\cos^2 \theta + (\frac{va+d}{a+d})^2 \sin^2 \theta)^{1/2}$$

 a : 軸長 v : 軸比

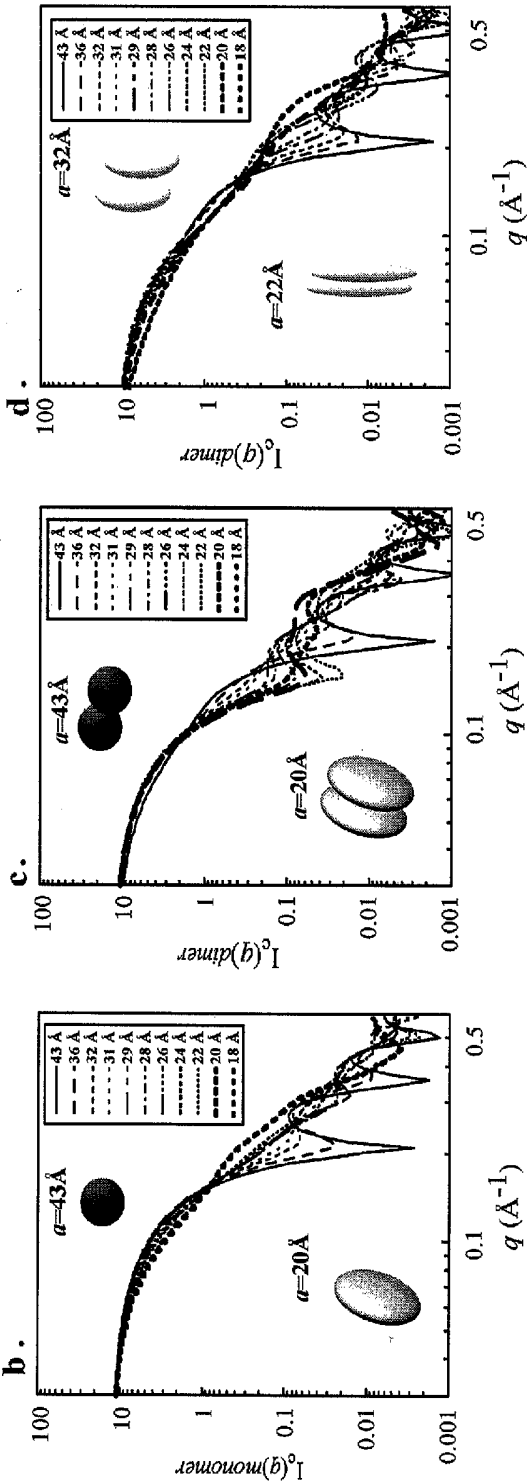
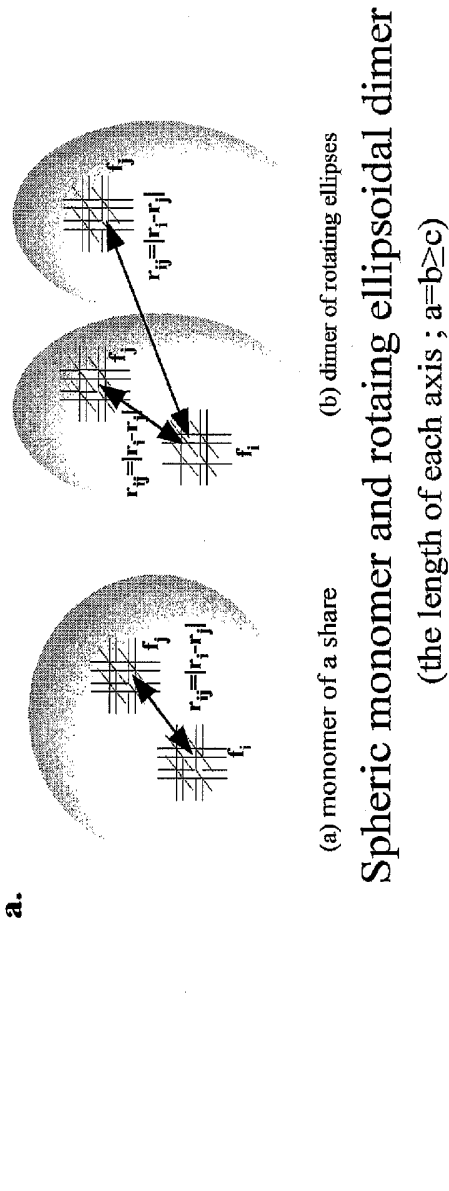
[図3]



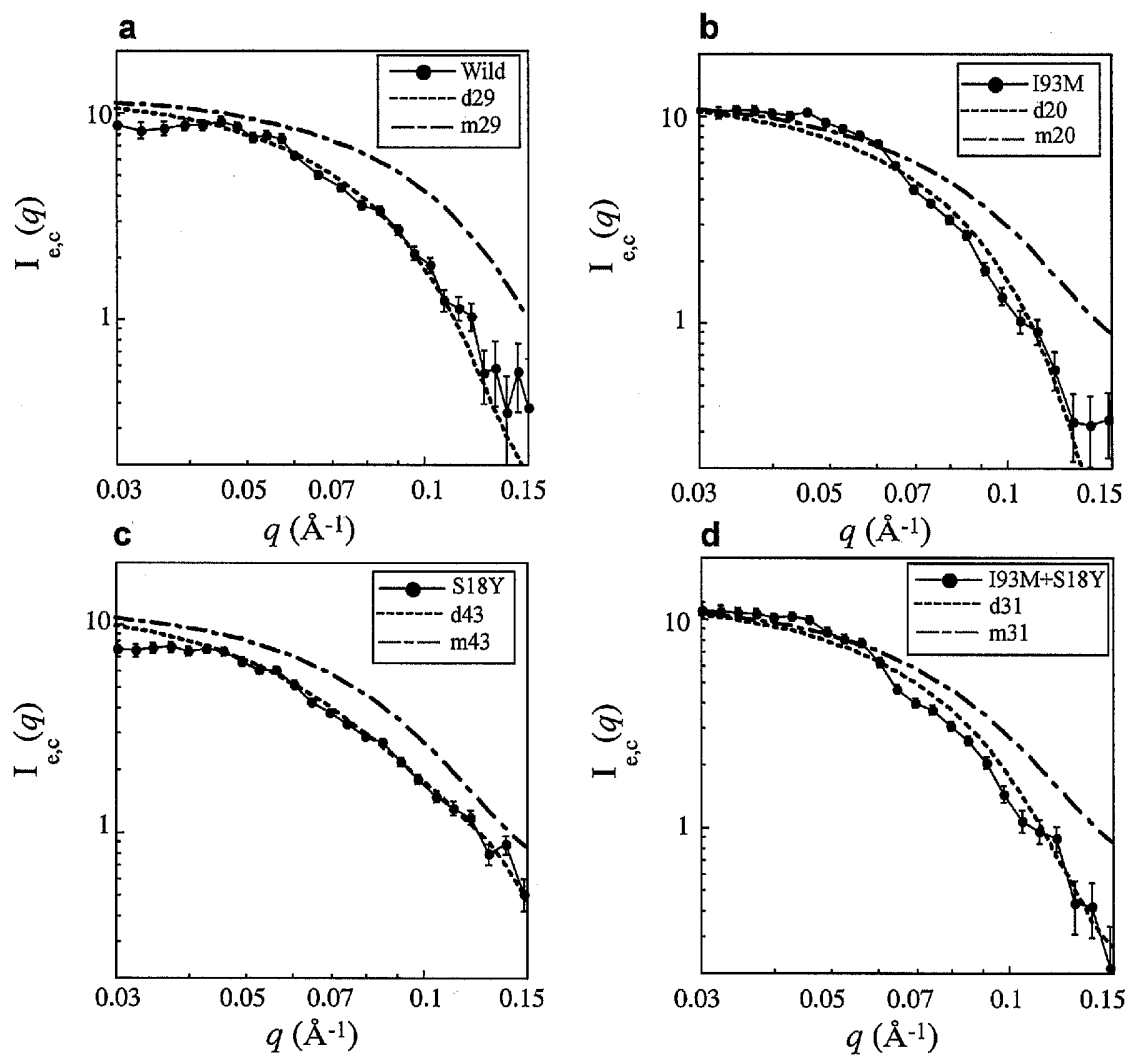
[図4]



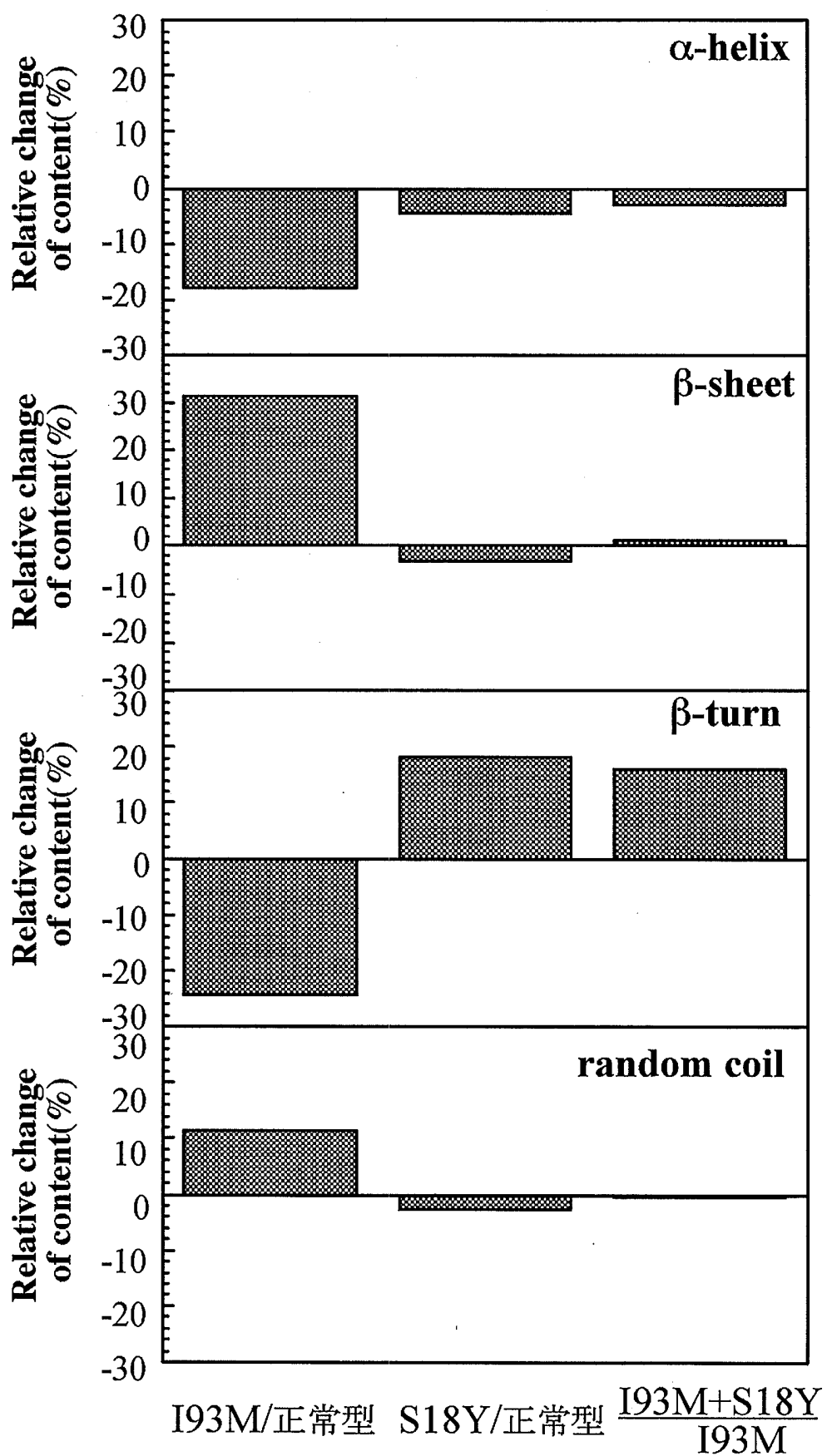
[図5]



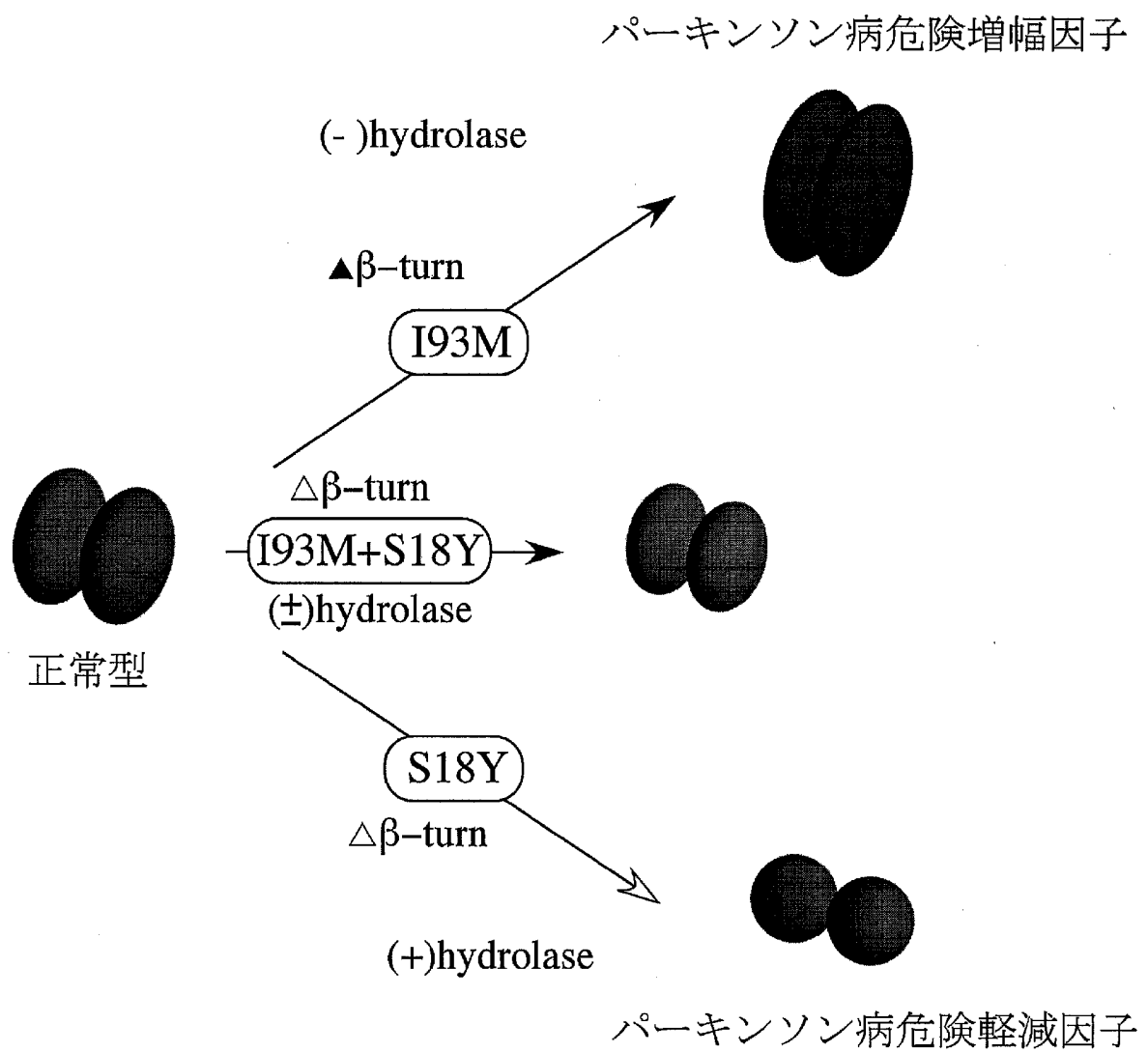
[図6]



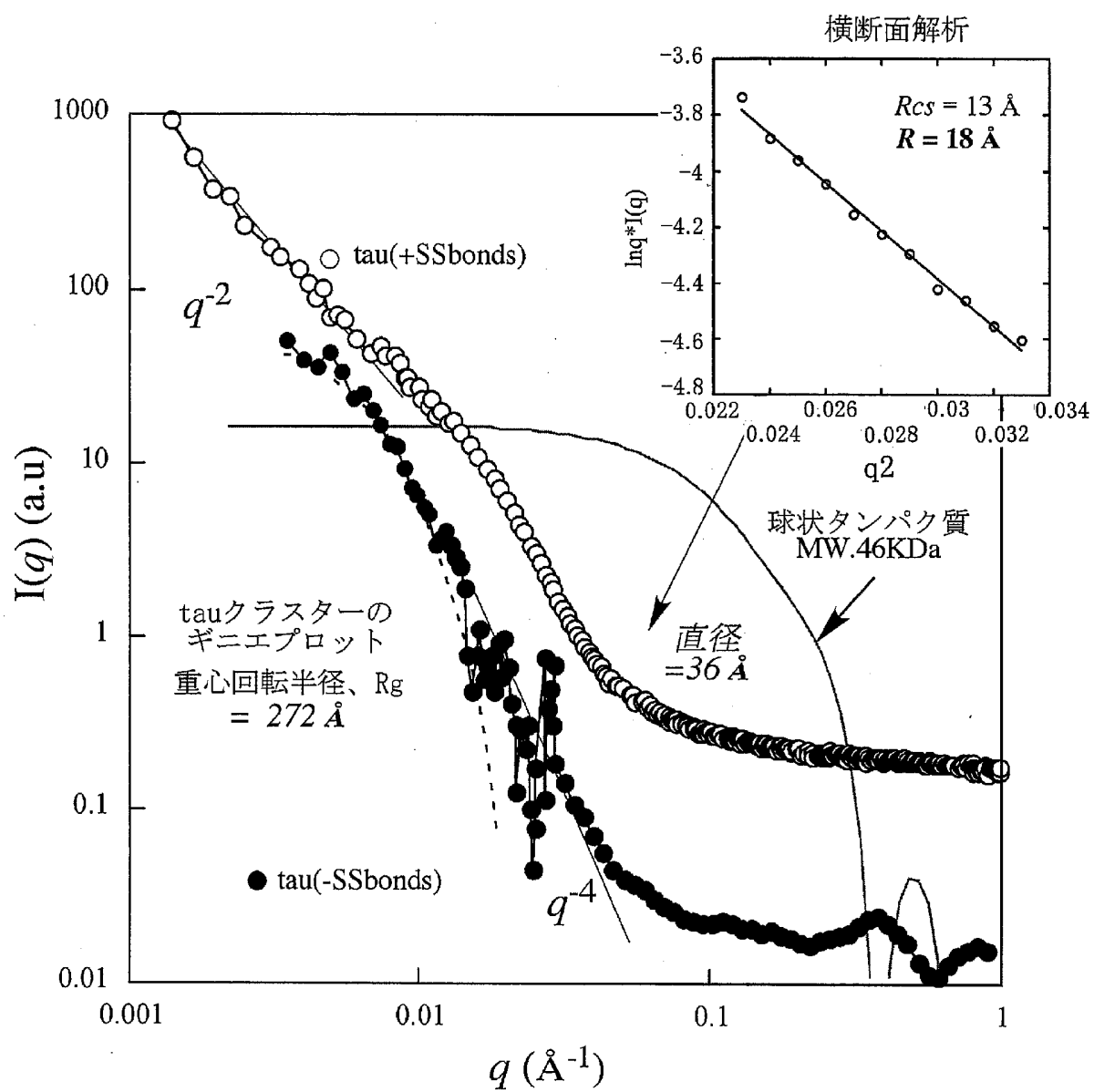
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/022898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N23/206(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/483(2006.01), G01N33/50(2006.01)

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)

G01N23/00(2006.01) -G01N23/227(2006.01), G01N33/48(2006.01) -G01N33/98(2006.01)

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	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Science Direct, JSTPlus(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	P. Calmettes et al., "Structures of phospho glycerate kinase and β -casein denatured in guanidinium chloride", Physica B, Vols.213& 214, 1995, pages 754 to 756	4-6
Y	WO 2003/085086 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE), 16 October, 2003 (16.10.03), Description, page 59, line 12 to page 63, line 23 & AU 2003231995 A1 & CA 2481437 A1 & EP 1572937 A2 & JP 2005-522197 A & US 2003/0215880 A1	4-6

☐ 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
28 December, 2005 (28.12.05)

Date of mailing of the international search report
17 January, 2006 (17.01.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/022898

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.: 1 - 3

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 to 3 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

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:

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.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N23/206 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/483 (2006.01), G01N33/50 (2006.01)			
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. G01N23/00 (2006.01) - G01N23/227 (2006.01), G01N33/48 (2006.01) - G01N33/98 (2006.01)			
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 日本国公開実用新案公報 日本国実用新案登録公報 日本国登録実用新案公報 1922-1996年 1971-2005年 1996-2005年 1994-2005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） Science Direct, JSTPlus(JOIS)			
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	
Y	P. Calmettes, <i>et al.</i> , "Structures of phosphoglycerate kinase and β -casein denatured in guanidinium chloride" Physica B, Vols. 213&214, 1995, pp. 754-756	4-6	
Y	WO 2003/085086 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 2003.10.16 明細書第 59 頁第 12 行-第 63 頁第 23 行 & AU 2003231995 A1 & CA 2481437 A1 & EP 1572937 A2 & JP 2005-522197 A & US 2003/0215880 A1	4-6	
☐ 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 28. 12. 2005		国際調査報告の発送日 17. 01. 2006	
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） 高場 正光 電話番号 03-3581-1101 内線 3292	2W 2910

