(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5286523号
(P5286523)
(45)発行日　平成25年9月11日(2013.9.11)　(24)登録日　平成25年6月14日(2013.6.14)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 6　(全 23 頁)

(21)出願番号　特願2008-506290(P2008-506290)
(86)(22)出願日　平成19年3月19日(2007.3.19)
(86)国際出願番号　PCT/JP2007/055493
(87)国際公開番号　WO2007/108434
(87)国際公開日　平成19年9月27日(2007.9.27)
審査請求日　平成22年2月24日(2010.2.24)
(31)優先権主張番号　特願2006-76789(P2006-76789)
(32)優先日　平成18年3月20日(2006.3.20)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　504139662
国立大学法人名古屋大学
愛知県名古屋市千種区不老町１番
(74)代理人　100114362
弁理士　萩野　幹治
(72)発明者　山田　新一
愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内
(72)発明者　丹羽　淳一
愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内
(72)発明者　祖父江　元
愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
真核細胞用プロモーターに作動可能に連結された、メタノサルシナ・マゼイのプロテアソームαサブユニット及びβサブユニットをコードする核酸配列を含有する発現コンストラクトを標的真核細胞に導入するステップを含む、標的真核細胞内で凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法であって、
前記標的真核細胞が、単離されたヒト細胞、又は非ヒト哺乳動物細胞である、方法。
【請求項２】
前記αサブユニットが、配列番号１に示すアミノ酸配列からなり、
前記βサブユニットが、配列番号３に示すアミノ酸配列からなる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記核酸配列が配列番号２に示すDNA配列及び配列番号４に示すDNA配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記真核細胞用プロモーターが哺乳動物用プロモーターである、請求項１～３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
前記凝集体形成性タンパク質が、変異スーパーオキシド・ジスムターゼ１、異常に伸長したポリグルタミン鎖を持つアンドロゲン受容体、α－シヌクレイン、及びタウからなる

群より選択されるタンパク質である、請求項１～４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
メタノサルシナ・マゼイのプロテアソームαサブユニット及びβサブユニットを標的真核細胞内で強制発現させるステップを含む、標的真核細胞内で凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法であって、
前記標的真核細胞が、単離されたヒト細胞、又は非ヒト哺乳動物細胞である、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は古細菌プロテアソームの新規な用途に関する。具体的には本発明は、古細菌プロテアソームを利用した凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
20Sプロテアソームは大部分の細胞内タンパク質を分解する普遍性の高い“たる型”の蛋白分解酵素複合体であり（非特許文献１）７個のサブユニットタンパク質によって形成されたリングが４つ積み重なって構成されている（非特許文献２）。αサブユニットは外側のリングを（非特許文献３）、またタンパク質分解能をもつβサブユニット（非特許文献４）は内側のリングを構成している（非特許文献５）。
真核細胞のユビキチン－プロテアソームシステムは蓄積し易い異常なタンパク質や上手く折り畳まれなかったタンパク質を分解する（非特許文献６）。これらの細胞内異常凝集体は、プロテアソームの機能低下が病態に関係していると考えられている神経変性疾患であるパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ポリグルタミン病（ハンチントン病や数種の脊髄小脳変性症、球脊髄性筋萎縮症（SBMA））やアルツハイマー病の発病に関わっていると考えられている（非特許文献７～１１）。しかし、異常タンパク質の蓄積の原因ははっきりしていない。この共通問題を解決出来れば素晴らしい治療法の確立に繋がると思われる。
【０００３】
【非特許文献１】Hershko, A. Ciechanover, A. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 425-479
【非特許文献２】Puhler, G., Weinkauf, S., Bachmann, L., Muller, S., Engel, A., Hegerl, R., Baumeister, W. (1992) EMBO J. 11, 1607-1616
【非特許文献３】Zwickl, P., Kleinz, J., Baumeister, W. (1994) Nature Struct. Biol. 1, 765-770
【非特許文献４】Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., Baumeister, W. (1995) Science 268, 579-582
【非特許文献５】Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B., Kopp, F. (1991) FEBS Lett. 290, 186-190
【非特許文献６】Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. (2000) J. Cell Biochem. 77, 40-51
【非特許文献７】Kabashi, E., Agar, J.N., Taylor, D.M., Minotti, S., Durham, H.D. (2004) J. Neurochem. 89, 1325-35
【非特許文献８】Bailey, C.K., Andriola, I.F., Kampinga, H.H. and Merry, D.E. (2002) Hum. Mol. Genet. 11, 515-523
【非特許文献９】Chen, Q., Thorpe, J., Keller, J.N., (2005) J. Biol. Chem. 26, 30009-30017
【非特許文献１０】Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., Ullrich, O. (2003) J. Neurochem. 85, 115-122
【非特許文献１１】Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Science 292, 1552-1555

【非特許文献１２】Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., Seemuller, E. (1998) Cell 92, 367-380
【非特許文献１３】Zwickl, P., Goldberg, A.L., Baumeister, W. (2000) Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis, Landes Bioscience, Georgetown, TX
【非特許文献１４】Zwickl, P., Ng, D., Woo, K.M., Klenk, H.P., Goldberg, A.L. (1999) J. Biol. Chem. 274, 26008-26014
【非特許文献１５】Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., Goldberg, A.L. (2004) Mol. Cell 14, 95-104

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
古細菌の20Sプロテアソームはα、β各サブユニット共にそれぞれ一種類のみであり、真核細胞のプロテアソームの祖先と考えられている（非特許文献１２）。一方、真核細胞のプロテアソームはα、βサブユニット共に全て異なる７種のサブユニットから構成されている（非特許文献１２）。古細菌はタンパク質分解に働くユビキチン認識システムを持っておらず、他の未知のタグが存在すると考えられている（非特許文献１３）。また、古細菌にも真核細胞の19Sの祖先にあたるproteasome-activating nucleotidase（PAN）と呼ばれる20Sプロテアソームを調製する複合体が存在すると考えられている。PANはその19Sの下部に相当する複合体を形成し、20Sによる効率的なタンパク質分解には必要と考えられている（非特許文献１４）。しかし、in vitroにおいてはPAN無しで古細菌のプロテアソームがポリグルタミン凝集体を急速に分解出来ることが示されている（非特許文献１５）。
以上の背景の下、本発明は、変異スーパーオキシド・ジスムターゼ１や異常に伸長したポリグルタミン鎖を持つアンドロゲン受容体など、真核細胞内で凝集体を形成するタンパク質を分解するために有効な手段を提供すること目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明者らは、古細菌のプロテアソームによる、PANに依存しない分解が真核細胞内で再現出来ないかと考え、培養細胞の実験に適した37℃で生育するメタノサルシナ・マゼイ（Methanosarcina mazei：Mm)の20Sプロテアソームを用いて実験を進めた。その結果、この古細菌の20Sプロテアソームを真核細胞内において機能を持った状態で生成させることによって、家族性ALSの原因タンパク質であるスーパーオキシド・ジスムターゼ１（super oxide dysmutase-1：SOD1）やSBMAの原因タンパク質である伸長したポリグルタミン鎖を持ったアンドロゲン受容体（AR）を変異体特異的に分解し、その細胞毒性も軽減させることに成功した。さらに、この古細菌のプロテアソームは他の神経変性疾患に関係するタンパク質であるα-シヌクレイン（α－synuclein）やタウ（tau）も分解することが明らかとなった。このように、古細菌のプロテアソームは、真核細胞内における凝集体形成性タンパク質の分解に有用であることが判明し、細胞内に蓄積する異常タンパク質による毒性が原因となっている疾患に対する新たな治療法の確立への途が拓かれた。
本発明は主として以上の知見ないし成果に基づき、以下に示す凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法などを提供する。
［１］真核細胞用プロモーターに作動可能に連結された、古細菌のプロテアソームをコードする核酸配列を含有する、凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト。
［２］前記核酸配列が古細菌のプロテアソームαサブユニット及び／又はβサブユニットをコードする、［１］に記載の発現コンストラクト。
［３］前記αサブユニットが、配列番号１に示すアミノ酸配列又は該アミノ酸配列と比較してプロテアソームαサブユニットの機能に実質的に影響しない部分でのみ相違するアミノ酸配列からなり、
前記βサブユニットが、配列番号３に示すアミノ酸配列又は該アミノ酸配列と比較して

プロテアソームβサブユニットの機能に実質的に影響しない部分でのみ相違するアミノ酸配列からなる、［２］に記載の発現コンストラクト。

［４］前記核酸配列が配列番号２に示すDNA配列及び／又は配列番号４に示すDNA配列を含む、［１］に記載の発現コンストラクト。

［５］前記古細菌がメタノサルシナ属に属する古細菌である、［１］又は［２］に記載の発現コンストラクト。

［６］前記古細菌がメタノサルシナ・マゼイである、［１］又は［２］に記載の発現コンストラクト。

［７］前記真核細胞用プロモーターが哺乳動物用プロモーターである、［１］～［６］のいずれかに記載の発現コンストラクト。

［８］前記凝集体形成性タンパク質が、変異スーパーオキシド・ジスムターゼ１、異常に伸長したポリグルタミン鎖を持つアンドロゲン受容体、α－シヌクレイン、及びタウからなる群より選択されるタンパク質である、［１］～［７］のいずれかに記載の発現コンストラクト。

［９］［１］～［８］のいずれかに記載の前記発現コンストラクトを標的真核細胞に導入するステップを含む、標的真核細胞内で凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法。

［１０］古細菌のプロテアソームαサブユニット及びβサブユニットを標的真核細胞内で強制発現させるステップを含む、標的真核細胞内で凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法。

［１１］前記古細菌がメタノサルシナ属に属する古細菌である、［１０］に記載の方法。

［１２］前記古細菌がメタノサルシナ・マゼイである、［１０］に記載の方法。

［１３］前記標的真核細胞がヒト細胞である、［９］～［１２］のいずれかに記載の方法。

［１４］前記標的真核細胞が、単離されたヒト細胞である、［９］～［１２］のいずれかに記載の方法。

［１５］前記標的真核細胞が非ヒト哺乳動物細胞である、［９］～［１２］のいずれかに記載の方法。

［１６］凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト作製のための、又は標的真核細胞内で凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制するための、古細菌のプロテアソームの使用。

【図面の簡単な説明】

【０００６】

【図１】Mmプロテアソームの真核細胞内での発現を示す図。（A）本実験で用いた発現ベクターの構成図。Δαサブユニットにおける欠損部位を図示した。Thr1Cysβサブユニット（mβ1）は3塩基を置換して作製した。（B）抗αサブユニット抗体、抗βサブユニット抗体、抗His-tag抗体を用いたウエスタンブロット解析。（C）Ni-NTA pull down解析：抗αサブユニット抗体にて免疫沈降した。（D）Ni-NTA pull downサンプルのキモトリプシン様活性を示す。エラーバーはs.d. (n=3)を示す。（E）グリセオール濃度勾配超遠心：Mmプロテアソームα、βサブユニットは内在性ヒト20Sプロテアソームサブユニットα１、α５とほぼ同じ分画に位置している。

【図２】Mmプロテアソームαβ存在下で変異SOD1の発現量が低下することを示す図。6cm培養皿で培養したNeuro2aに1μgのSOD1-MycHisベクターとMmプロテアソームサブユニットをトランスフェクションし、48時間後に解析した。Mmプロテアソームαβ量の増加に伴い変異SOD1の発現量が徐々に減少する事が分かる。Mmプロテアソームαmβ1ではそのような効果は見られない。WT:野生型SOD1、G93A:$SOD1^{G93A}$、G85R: $SOD1^{G85R}$、G37R:$SOD1^{G37R}$、H46R:$SOD1^{H46R}$。

【図３Ａ】Mmプロテアソームαβが変異SOD1の分解を促進することを示す図。サイクロヘキシミド追跡解析（方法参照）の結果。Mmプロテアソームαβ存在下で様々な変異SOD1の

分解が促進されていることが示されている。グラフは$SOD1^{G93A}$と$SOD1^{G85R}$のデータを連続3回分集計したものである。エラーバーはs.d.を示す。

【図３Ｂ】Pulse chase解析（方法参照）の結果。Mmプロテアソームαβ存在下にて$SOD1^{G93A}$の分解が促進されている事が示されている。円：mock、三角：αβ、四角：αmβ1。エラーバーはs.d.を示す（n=3）。

【図４】Mmプロテアソームαβが変異SOD1による細胞毒性を軽減することを示す図。用量依存的に見たMmプロテアソームαβのSOD1の毒性に対する効果が示される。（A）野生型SOD1、（B）変異$SOD1^{G93A}$、(C）変異$SOD1^{G85R}$によるHEK293細胞毒性を3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)にて解析した。箱の中の横線は平均を、箱の上線、下線はそれぞれ75, 25パーセンタイルを、上下のT棒はそれぞれ90,10パーセンタイルを示す。（n=3×6wells）。数値はトランスフェクションしたDNAの量を示す（例：αβ0.1=α0.05μg＋β0.05μg）。（D）蛍光基質Z-DEVD-R110を用いたカスパーゼ3/7活性の相対比較を示す。Mmプロテアソームαβはカスパーゼ3/7の活性化を抑制している。Positive control は3.2±0.2(スタウロスポリン1μMで24時間incubateした細胞を使用)。

【図５】変異SOD1とMmプロテアソームαβが細胞内において共存することを示す図。HEK293細胞に対して、GFPタグの付いた野生型SOD1あるいは変異$SOD1^{G93A}$とMmプロテアソームαβをトランスフェクションし、48時間後に固定した。抗His抗体を一次抗体、Alexa-546抗マウス抗体を二次抗体に用いた。WT:野生型SOD1、G93A:$SOD1^{G93A}$。

【図６】Mmプロテアソームαβが、伸長したポリグルタミン鎖を持つ変異アンドロゲンレセプター（AR）の分解を促進し、その細胞毒性を軽減することを示す図。（A）6cm培養皿で培養したNeuro2aに1μgのpCR3.1-AR24QベクターまたはpCR3.1-AR97QベクターとMmプロテアソームサブユニットをトランスフェクションし、48時間後に解析した。Mmプロテアソームαβ量の増加に伴い変異AR97Qの発現量が徐々に減少するが、AR24Qには影響しない。Mmプロテアソームαmβ1ではそのような効果は見られない。（B）サイクロヘキシミド追跡解析（方法参照）の結果。Mmプロテアソームαβ存在下で変異AR-97Qの分解が促進されている。（C）AR-97Qによる細胞毒性をMmプロテアソームαβは軽減している。箱の中の横線は平均を、箱の上線、下線はそれぞれ75, 25パーセンタイルを、上下のT棒はそれぞれ90,10パーセンタイルを示す。（n=3×6wells）。

【図７】Mmプロテアソームαβは凝集体を形成し易いタンパク質を分解するが、凝集体を形成し難いタンパク質は分解しないことを示す図。6cm培養皿で培養したNeuro2aにMmプロテアソームサブユニットと、（A）1μgのα-シヌクレインベクター（野生型、A53T、A30P）、（B）tauベクター（6アイソフォーム：tubulin binding domain を3回繰り返すもの（3L, 3M, 3S）、4回繰り返すもの（4L, 4M, 4S）、29個のアミノ酸をN末に2つ含む（3L, 4L）、1つ含む（3M, 4M）、含まない（3S, 4S））、（C）mock, GFPベクター、LacZ-V5ベクターをトランスフェクションして解析した。（A）（B）α-シヌクレインとtauの発現量はMmプロテアソームαβと共に発現させると減少する。（C）内在性GAPDHや外来性のGFP、LacZの発現量はMmプロテアソームαβの発現に影響されない。

【発明を実施するための最良の形態】

【０００７】

（用語）

説明の便宜上、本明細書に使用される用語の一部についてその定義を以下にまとめる。

古細菌（Aarchaea）とは、真核生物、真正細菌と並び生物界を三分する生物群の一つであり、細胞膜の構成成分がエーテル型脂質であること、脂質骨格のグリセロールに対する炭化水素の結合位置がsn-2,3位であること、通常は細胞壁にペプチドグリカン層が見られないこと、抗生物質に対して特有の感受性を示すこと、ジフテリア毒素に感受性があること等で特徴付けられる。古細菌にはEuryarchaeota(ユリアーキオータ門(界))、Crenarchaeota(クレンアーキオータ門(界))、Korarchaeota(コルアーキオータ門(界))、及びNanoarchaeota(ナノアーキオータ門(界))があり、代表的な古細菌としてメタン細菌（Methanothermus fervidus、Methanococcus voltae、Methanobacterum formicicum、Methanococcus

jannaschii、Methanosarucina mazeiなど）、高度好塩菌（Halobacterium salinarumなど）、好熱菌（Thermoplasma acidophilum）、硫黄細菌などが知られている。尚、古細菌の分類、同定方法などについての以下の成書、（１）Archaea, A laboratory manual, edited by F. T. Robb, A. R. Place, K. R. Sowers, H. J. Schreier, S. DasSarma and E. M. Fleischmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1995)、（２）Superbugs, Microorganisms in Extreme Environments edited by K. Horikoshi and W. D. Grant, Springer-Verlag, Tokyo (1991)、（３）Extremophiles, Microbial Life in Extreme Environments edited by K. Horikoshi and W. D. Grant, Wiley-Liss, Inc., New York (1991)等が参考になる。

【０００８】

本明細書において用語「～を含む」又は「～を含んでなる」は、「～からなる」の意味をも含む表現として使用される。したがって例えば、「複数の要素（部材）を含んで構成される物（又は方法）」と記載した場合には、それが意味するものとして「当該複数の要素（部材）から構成される物（又は方法）」も当然に考慮される。

【０００９】

本明細書において用語「疾患」は、疾病、病気、又は病態など、正常でない状態を表す言葉と交換可能に用いられる。

【００１０】

本明細書における用語「核酸」は、それを含むことが意図されていないことが明らかな場合を除いて、DNA（cDNA及びゲノムDNAを含む）、RNA（mRNAを含む）、DNA類似体、及びRNA類似体を含む。本発明の核酸の形態は限定されず、即ち1本鎖及び2本鎖のいずれであってもよい。好ましくは2本鎖DNAである。またコドンの縮重も考慮される。即ちタンパク質をコードする核酸の場合には、その発現産物として当該タンパク質が得られる限り任意の塩基配列を有していてよい。

【００１１】

本明細書において用語「単離された核酸」とは、もともと天然に存在している核酸（例えばヒト生体内の核酸）の場合、典型的には、天然状態において共存するその他の核酸から分離された状態の核酸をいう。但し、天然状態において隣接する核酸配列など一部の他の核酸成分を含んでいてもよい。例えばゲノムDNAの場合の「単離された核酸」の好ましい形態では、天然状態において共存する他のDNA成分（天然状態において隣接するDNA配列を含む）を実質的に含まない。

【００１２】

例えばcDNA分子など遺伝子組み換え技術によって生産される核酸の場合の「単離された核酸」は好ましくは、細胞成分や培養液などを実質的に含まない状態の核酸をいう。同様に、化学合成によって生産される核酸の場合の「単離された核酸」は好ましくは、dNTPなどの前駆体（原材料）や合成過程で使用される化学物質等を実質的に含まない状態の核酸をいう。

【００１３】

核酸がベクターや組成物の一部として存在していても又は外来性分子として細胞内に存在していても、人為的操作の結果として存在している限り「単離された核酸」である。

尚、特に言及しない限り、本明細書において単に「核酸」と記載した場合には、単離された状態の核酸を意味する。

【００１４】

（凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト）

本発明の第１の局面は凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクトに関する。本発明において「凝集体形成性タンパク質」とは、正常な状態では単独で存在しているが何らかの原因で凝集体を形成する性質を獲得し、又は凝集体を形成するように方向付けられたタンパク質であって、その凝集体が細胞毒性を発揮するものをいう。尚、ここでの「単独で存在」とは、凝集体を形成していないという意味であり、通常の状態で他の分子と複合体を形成するタンパク質の場合はこのような複合体を形成した状態であっても「単独

で存在」に該当する。また、「細胞毒性」とは、細胞が正常な状態を維持することに対する負の性質ないし作用をいい、典型的には細胞機能の低下又は細胞死を惹起する性質ないし作用が該当する。

【００１５】

凝集体形成性タンパク質の例として、変異スーパーオキシド・ジスムターゼ１（SOD1）、異常に伸長したポリグルタミン鎖を持つアンドロゲン受容体（AR）、α－シヌクレイン、タウ（tau）、アミロイド形成蛋白質、プリオン蛋白質等を挙げることができる。変異SOD1は家族性筋萎縮性側索硬化症（家族性ALS）の原因タンパク質である。一方、異常に伸長したポリグルタミン鎖を持つARは球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の原因タンパク質である。また、α－シヌクレイン及びタウはそれぞれパーキンソン病及びアルツハイマー病の発症及び進行に関与し、患者の神経細胞内ではその異常な蓄積が認められる。本発明の発現コンストラクトは、典型的には、このような神経疾患に関与するタンパク質の分解を目的として使用されるものであり、当該神経疾患の治療、予防、発症機構の研究などに有用である。

【００１６】

本発明の「発現コンストラクト」は、古細菌のプロテアソームをコードする核酸配列（以下、「プロテアソーム核酸配列」ともいう）を含有する。換言すれば、本発明の発現コンストラクトが含有するプロテアソーム核酸配列は、(1)古細菌のプロテアソームαサブユニットをコードする核酸配列、(2)古細菌のプロテアソームβサブユニットをコードする核酸配列、又は(3)古細菌のプロテアソームαサブユニット及びβサブユニットをコードする核酸配列（この場合、プロテアソームαサブユニットをコードする部分とプロテアソームβサブユニットをコードする部分の間にIRES（internal ribosomal entry site）等、プロテアソームβサブユニットの発現を可能にする介在配列が配置される）である。

【００１７】

本発明の好ましい一態様ではメタノサルシナ属（Methanosarcina）に属する古細菌のプロテアソームが利用される。メタノサルシナ属の古細菌は比較的穏やかな温度条件で生育可能なものが多く、一部はメタンの生産に利用されている。後述の実施例で使用されたメタノサルシナ・マゼイ（Methanosarcina mazei）においては、哺乳動物細胞の生存に最適な約37℃の温度条件下で良好な生育が認められ、本発明で使用するプロテアソームの由来として好ましい。即ち、本発明の更に好ましい一態様では、メタノサルシナ・マゼイのプロテアソームαサブユニット及び／又はβサブユニットをコードする核酸配列が組み込まれた発現コンストラクトが構築される。

尚、古細菌は例えば、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、ATCC (American Type Culture Collection)、DSMZ （German Collection of Microorganisms and Cell Cultures）などより入手可能である。

【００１８】

本発明の発現コンストラクトに組み込まれるプロテアソーム核酸配列の具体例として、（１）配列番号１に示すアミノ酸配列（メタノサルシナ・マゼイのプロテアソームαサブユニットの配列）をコードする配列、（２）配列番号３に示すアミノ酸配列（メタノサルシナ・マゼイのプロテアソームβサブユニットの配列）をコードする配列を挙げることができる。また、上記（１）の核酸配列及び上記（２）の核酸配列を併用してもよく、この場合にはメタノサルシナ・マゼイのプロテアソームαサブユニット及びβサブユニットを標的細胞内で強制発現させる発現コンストラクトが得られることになる。尚、上記（１）の核酸配列の具体例（DNA配列）を配列番号２に、上記（２）の核酸配列の具体例（DNA配列）を配列番号４にそれぞれ示す。

【００１９】

プロテアソーム核酸配列は本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって、単離された状態に調製することができる。例えば、配列番号２の塩基配列を有するプロテアソーム核酸配列（プロテアソームαサブユニットをコードする核酸配列）は、当該塩

基配列又はその相補配列の全体又は一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法を利用してメタノサルシナ・マゼイ（ATCC BAA-159D）のゲノムDNAを鋳型とした核酸増幅反応（例えばPCR）を利用して増幅及び単離することができる。配列番号３の塩基配列を有するプロテアソーム核酸配列（プロテアソームβサブユニットをコードする核酸配列）についても同様の方法で単離した状態に調製可能である。尚、オリゴヌクレオチドプライマーは一般に、市販の自動化DNA合成装置などを用いて容易に合成することができる。

【００２０】

本発明の他の態様では、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるタンパク質（αサブユニット）と比較した場合にその機能は同等であるものの一部においてアミノ酸配列が相違するタンパク質（以下、「相同的αサブユニット」ともいう）をコードする核酸配列及び／又は配列番号３に示すアミノ酸配列からなるタンパク質（αサブユニット）と比較した場合にその機能は同等であるものの一部においてアミノ酸配列が相違するタンパク質（以下、「相同的βサブユニット」ともいう）をコードする核酸配列を用いて発現コンストラクトが構築される。このように本発明では、配列番号１のアミノ酸配列を有するタンパク質と機能面から実質的に同一と見なされる（換言すれば該アミノ酸配列と比較してプロテアソームαサブユニットの機能に実質的に影響しない部分でのみ相違する）タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は配列番号３のアミノ酸配列を有するタンパク質と機能面から実質的に同一と見なされる（換言すれば該アミノ酸配列と比較してプロテアソームβサブユニットの機能に実質的に影響しない部分でのみ相違する）タンパク質をコードする核酸配列を用いて発現コンストラクトを構築してもよい。このような核酸コンストラクトによれば、配列番号１のアミノ酸配列をコードする核酸配列、及び／又は配列番号３のアミノ酸配列をコードする核酸配列が組み込まれた発現コンストラクトと同様に、標的細胞内でプロテアソームαサブユニットとして機能するタンパク質、及び／又はプロテアソームβサブユニットとして機能するタンパク質を強制発現させることができる。

【００２１】

ここで、「一部においてアミノ酸配列が相違する」とは、典型的には、アミノ酸配列を構成する１～数個のアミノ酸の欠失、置換、若しくは１～数個のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異（変化）が生じていることをいう。ここでのアミノ酸配列の相違は、プロテアソームのαサブユニット（配列番号１のアミノ酸に対する改変の場合）又はβサブユニット（配列番号３のアミノ酸に対する改変の場合）の機能が保持される限り許容される。この条件を満たす限りアミノ酸配列が相違する位置は特に限定されず、また複数の位置で相違が生じていてもよい。ここでの複数とは例えば全アミノ酸の約30％未満に相当する数であり、好ましくは約20％未満に相当する数であり、さらに好ましくは約10％未満に相当する数であり、より一層好ましくは約5％未満に相当する数であり、最も好ましくは約1％未満に相当する数である。即ち相同的αサブユニットは配列番号１のアミノ酸配列と例えば約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90％以上、より一層好ましくは約95%以上、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する。同様に、相同的βサブユニットは配列番号３のアミノ酸配列と例えば約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90％以上、より一層好ましくは約95%以上、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する。

【００２２】

好ましくは、保存的アミノ酸置換を非必須アミノ酸残基（αサブユニット又はβサブユニットの機能に関与しないアミノ酸残基）に生じさせることによって相同タンパク質を得る。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパルギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばアスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルア

ラニン、トリプトファン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

【００２３】

一方、古細菌のプロテアソームβサブユニットではスレオニン１領域、グルタミン酸１７領域、リジン３３領域、アスパラギン酸１０５領域及びアスパラギン酸１６６領域の活性への関与が報告されており、相同的βサブユニットをコードする核酸配列を調製するにあたっては、これらの領域の改変を避けることが好ましい。

【００２４】

ここで、二つのアミノ酸配列の同一性（％）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる（例えば、第一の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよい）。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるという。二つの配列の同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関数であり（すなわち、同一性（％）＝同一位置の数／位置の総数 × 100）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数およびサイズも考慮に入れる。

二つの配列の比較及び同一性の決定は数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77において改変されたアルゴリズムがあるが、これに限定されることはない。このようなアルゴリズムは、Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10に記載のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。あるアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を得るには例えば、XBLASTプログラムでscore = 50、wordlength = 3としてBLASTポリペプチド検索を行えばよい。比較のためのギャップアライメントを得るためには、Altschulら (1997) Amino Acids Research 25(17):3389-3402に記載のGapped BLASTが利用可能である。BLASTおよびGapped BLASTを利用する場合は、対応するプログラム（例えばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。詳しくはhttp://www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。配列の比較に利用可能な他の数学的アルゴリズムの例としては、MyersおよびMiller (1988) Comput Appl Biosci. 4:11-17に記載のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、例えばGENESTREAMネットワークサーバー（IGH Montpellier、フランス）またはISRECサーバーで利用可能なALIGNプログラムに組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合は例えば、PAM120残基質量表を使用し、ギャップ長ペナルティ＝12、ギャップペナルティ＝4とすることができる。

二つのアミノ酸配列の同一性を、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いて、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスを使用し、ギャップ加重＝12、10、8、6、又は4、ギャップ長加重＝2、3、又は4として決定することができる。

【００２５】

本発明の発現コンストラクトには真核細胞用プロモーターが組み込まれており、プロテアソーム核酸配列は当該プロモーターに作動可能に連結されている。当該構成の発現コンストラクトでは真核細胞用プロモーターの作用によって、プロテアソーム核酸配列を真核細胞内で強制発現させることが可能となる。ここでの「プロモーターに作動可能に連結された」とは「プロモーターの制御下に配置された」と同義であり、通常、プロモーターの3'末端側に直接又は他の配列を介して、古細菌のプロテアソームをコードする核酸配列が連結されることになる。

【００２６】

真核細胞用プロモーターの中でも、好ましくは哺乳動物細胞用プロモーターが使用される。哺乳動物細胞用プロモーターとしてCMV-IE（サイトメガロウイルス初期遺伝子由来プロモーター）、SV40ori、レトロウイルスLTP、SRα、EF1α、βアクチンプロモーター等を例示できる。アセチルコリンレセプタープロモーター、エノラーゼプロモーター、L7プ

ロモーター、ネスチンプロモーター、アルブミンプロモーター、アルファフェトプロテインプロモーター、ケラチンプロモーター、インスリンプロモーター等、哺乳動物組織特異的プロモーターを使用してもよい。

【００２７】

本発明の核酸コンストラクト内にエンハンサー配列や選択マーカー配列を配置することもできる。エンハンサー配列の使用によってプロテアソーム核酸配列の発現効率の向上が図られる。また、選択マーカー配列を含有する発現コンストラクトを使用すれば、選択マーカーを利用して発現コンストラクトの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。

【００２８】

尚、プロモーター、プロテアソーム核酸配列、エンハンサー配列（必要な場合）、及び選択マーカー配列（必要な場合）の挿入操作等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。

【００２９】

本発明の発現コンストラクトはプロテアソーム核酸配列を標的細胞内へ導入するために使用される。このような目的に使用可能な限り発現コンストラクトの形態は特に限定されないが、好ましくは発現ベクターの形態をとる。ここでの「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能な核酸性分子をいい、ウイルスベクター及び非ウイルスベクターを含む。ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、ウイルスが細胞へと感染する現象を巧みに利用するものであり、高い遺伝子導入効率が得られる。ウイルスベクターとしてアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が開発されている。この中でアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターではベクターに組み込んだ外来遺伝子が宿主染色体へと組み込まれ、安定かつ長期的な発現が期待できる。レトロウイルスベクターの場合はウイルスゲノムの宿主染色体への組み込みには細胞の分裂が必要であることから非分裂細胞への遺伝子導入には適さない。一方、レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターは非分裂細胞においても感染後に外来遺伝子の宿主染色体への組み込みが生ずる。従って、これらのベクターは神経細胞や肝細胞などの非分裂細胞において安定かつ長期的に外来遺伝子を発現させるために有効である。

【００３０】

各ウイルスベクターは既報の方法に従い又は市販される専用のキットを用いて作製することができる。例えば、アデノウイルスベクターの作製はCOS-TPC法や完全長DNA導入法などで行うことができる。COS-TPC法は、目的のcDNA又は発現カセットを組み込んだ組換えコスミドと、親ウイルスDNA-末端タンパク質複合体（DNA-TPC）を293細胞に同時トランスフェクションし、293細胞内でおこる相同組換えを利用して組換えアデノウイルスを作製する方法である（Miyake,S., Makimura,M., Kanegae,Y., Harada,S., Takamori,K., Tokuda,C., and Saito,I. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320.）。一方、完全長DNA導入法は、目的の遺伝子を挿入した組換えコスミドを制限消化処理した後、293細胞にトランスフェクションすることによって組換えアデノウイルスを作製する方法である（寺島美保、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、斎藤泉（2003）実験医学 21（7）931.）。COS-TPC法はAdenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)（タカラバイオ株式会社）、Adenovirus genome DNA-TPC（タカラバイオ株式会社）を利用して行うことができる。また、完全長DNA導入法は、Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)（タカラバイオ株式会社）を利用して行うことができる。

【００３１】

一方、レトロウイルスベクターは以下の手順で作製することができる。まず、ウイルス

ゲノムの両端に存在するLTR（Long Terminal Repeat）の間のパッケージングシグナル配列以外のウイルスゲノム（gag、pol、env遺伝子）を取り除き、そこへ目的の遺伝子を挿入する。このようにして構築したウイルスDNAを、gag、pol、env遺伝子を構成的に発現するパッケージング細胞に導入する。これによって、パッケージングシグナル配列をもつベクターRNAのみがウイルス粒子に組み込まれ、レトロウイルスベクターが産生される。

【００３２】

アデノベクターを応用ないし改良したベクターとして、ファイバータンパク質の改変により特異性を向上させたもの（特異的感染ベクター）や目的遺伝子の発現効率向上が期待できるguttedベクター（ヘルパー依存性型ベクター）などが開発されている。本発明の発現ベクターをこのようなウイルスベクターとして構築してもよい。

【００３３】

非ウイルスベクターとしてリポソーム、正電荷型リポソーム（Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:7413-7417, 1987）、HVJ(Hemagglutinating virus of Japan)-リポソーム（Dzau, V.J., Mann, M., Morishita, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:11421-11425, 1996、Kaneda, Y., Saeki, Y. & Morishita, R., Molecular Med. Today, 5:298-303, 1999）等が開発されている。本発明の発現ベクターをこのような非ウイルス性ベクターとして構築してもよい。

【００３４】

（凝集体の形成を抑制する方法）

本発明の第２の局面は、古細菌のプロテアソームを利用して標的細胞内で凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法（以下、「本発明の抑制法」ともいう）に関する。尚、本発明において用語「抑制」は用語「阻止」と互換的に使用される。

【００３５】

本発明の一態様では上記本発明の発現コンストラクトが使用される。即ち、本発明の発現コンストラクトを標的細胞に導入するステップが実施される。使用する発現コンストラクトが古細菌のプロテアソームαサブユニットのみをコードする核酸配列を含有する場合は、当該発現コンストラクトを標的細胞に導入する際、古細菌のプロテアソームβサブユニットをコードする核酸配列を含有する発現コンストラクトも標的細胞に導入する。これによって標的細胞内では、異なる発現コンストラクトに由来するプロテアソームαサブユニット及びβサブユニットが発現し、古細菌のプロテアソームが構築される。一方、使用する発現コンストラクトが古細菌のプロテアソームαサブユニット及びβサブユニットをコードする核酸配列を含有するものであれば、それを標的細胞内に導入することによって標的細胞内でαサブユニット及びβサブユニットが発現し、古細菌のプロテアソームが構築される。

【００３６】

ここでの「標的細胞」は真核細胞であり、具体的には例えばヒト細胞、サル、マウス、ラット等の非ヒト哺乳類細胞（COS細胞、CHO細胞など）、大腸菌などの細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞等である。好ましい標的細胞は哺乳動物細胞であり、特に好ましい標的細胞は神経系細胞（神経細胞及びグリア細胞）である。

【００３７】

単離された標的細胞、又は生物個体を構成した状態の標的細胞に対して本発明の抑制法が適用される。ここでの「単離された」とは、その本来の環境（例えば生体を構成した状態）から取り出された状態にあることをいう。従って通常は、単離された標的細胞は培養容器内又は保存容器内に存在し、それへのin vitroでの人為的操作が可能である。具体的には、生体から分離され、生体外で培養状態にある細胞（株化された細胞を含む）は、単離された標的細胞としての適格を有する。尚、上記の意味において単離された状態にある限り、組織体を形成した状態であっても単離された細胞である。

単離された標的細胞は生物個体より調製することができる。一方、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、ATCC (American Type Culture Collection)、DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cul

tures）などより入手した細胞を、単離された標的細胞として使用することもできる。

【００３８】

標的細胞への発現コンストラクトの導入は、標的細胞の種類、発現コンストラクトの形態などを考慮して、リン酸カルシウム共沈殿法、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84,7413-7417(1984))、HVJリポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポーレーション(Potter,H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、マイクロインジェクション(Graessmann,M. & Graessmann,A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73,366-370(1976))、遺伝子銃法、超音波遺伝子導入法等によって実施することができる。発現コンストラクトとしてウイルスベクターを使用する場合には感染によって標的細胞への導入が行われる。

【００３９】

本発明の抑制法は、特定の凝集体の形成による標的細胞の機能低下や細胞死を抑制すること（換言すれば機能保全や機能回復）に利用される。従って本発明の抑制法は、特定のタンパク質の凝集体の形成が発症又は病態の進行の原因となる疾患の予防又は治療のため（即ち医療目的）の有効な手段といえる。このように本発明の抑制法は、特定の疾患に対する遺伝子治療（又はその一部）として利用され得る。尚、ここでの「特定のタンパク質の凝集体の形成が発症又は病態の進行の原因となる疾患」の代表的なものとして家族性ALS、SBMA、パーキンソン病及びアルツハイマー病などの神経変性疾患を挙げることができる。

【００４０】

ここで、遺伝子治療法には、遺伝子導入用の発現コンストラクトを直接患者体内へ投与する治療法（in vivo遺伝子治療法）と、治療対象から採取した細胞に対して体外で遺伝子導入した後、細胞を患者に投与する治療法（ex vivo治療法）がある。本発明の抑制法はいずれの治療法に対しても適用可能である。in vivo遺伝子治療法の場合における発現コンストラクトの投与経路は特に限定されず例えば局所接種、静脈内、皮内、皮下、筋肉内及び腹腔内などへの注入によって投与が実施される。これらの投与経路は互いに排他的なものではなく、任意に選択される二つ以上を併用することもできる（例えば、経口投与と同時に又は所定時間経過後に静脈注射等を行う等）。ここでの「治療対象」は特に限定されず、ヒト、及びヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ニワトリ、ウズラ等である）を含む。好適には、本発明の抑制方法を利用した治療法における治療対象はヒトである。

【００４１】

（本発明の発現コンストラクト又は抑制法の他の用途）

本発明の発現コンストラクト又は本発明の抑制法は、特定の真核細胞内において古細菌のプロテアソームを強制発現させた場合の挙動を調べる目的でも使用され得る。また、トランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製する目的で本発明の発現コンストラクトなどを使用することもできる。例えば、本発明の発現コンストラクト又は本発明の抑制法によって古細菌のプロテアソームをコードする核酸が導入された受精卵母細胞又は胚性幹細胞を作製し、これからトランスジェニック非ヒト哺乳動物を発生させることができる。本発明の非トランスジェニック動物は、古細菌のプロテアソームが哺乳動物に与える影響ないし効果を個体レベルで検討することを可能にする点で有用である。トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、受精卵の前核に直接DNAの注入を行うマイクロインジェクション法、レトロウイルスベクターを利用する方法、ES細胞を利用する方法などを用いて作製することができる。以下、トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法の一例として、マイクロインジェクション法を利用した方法を説明する。

マイクロインジェクション法では、まず交尾が確認された雌マウスの卵管より受精卵を採取し、そして培養した後にその前核に発現コンストラクトの注入を行う。注入操作を終了した受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植し、移植後のマウスを所定期間飼育して仔マウス（F0）を得る。仔マウスの染色体に導入遺伝子が適切に組込まれていることを確認する

ために、仔マウスの尾などからDNAを抽出し、導入遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法や導入遺伝子に特異的なプローブを用いたドットハイブリダイゼーション法等を行う。本明細書における「トランスジェニック非ヒト哺乳動物」の種は特に限定されないが、好ましくはマウス、ラットなどの齧歯類である。

【００４２】

本明細書で特に言及しない事項（条件、操作方法など）については常法に従えばよく、例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) 等を参考にすることができる。

【実施例】

【００４３】

１．実験材料及び方法

（１）発現ベクターの作成：Methanosarcina mazei (Mm) プロテアソームサブユニットα、β、Δ(2-13)α、変異β(Thr1Cys)

ATCCにて購入したMm (ATCC BAA-159D) のゲノムを鋳型としてPCR法にてプロテアソームサブユニットα (Gene Bank GeneID:1480962、Gene Bank Accession No.NP_634644 (アミノ酸配列、配列番号１)、Gene Bank Accession No. NC_003901 (塩基配列、配列番号２) を、αF：5’- GCGGGTACCCCACCATGCAGATGGCACCACAGATG (配列番号５) と、αR：5’- CGCCTCGAGTTATTCTTTGTTCTCATTTCCTTTGTG (配列番号６) のプライマーを用いて増幅し、Δ(2-13)α (Δα) はΔαF; 5’- GCGGGTACCCCACCATGACGGTTTTCAGCCCTGACGG (配列番号７) と先述のαRを用いて増幅した。PCR産物はpcDNA3.1(+) (Invitrogen)ベクターのKpnIとXhoIサイトに挿入した。サブユニットβ (Gene Bank GeneID:1479036、Gene Bank Accession No.NP_632718 (アミノ酸配列、配列番号３)、Gene Bank Accession No. NC_003901 (塩基配列、配列番号４) はβF：5’- GCCTCTAGACCACCATGGATAATGACAAATATTTAAAG (配列番号８) とβR：5’- GCGACCGGTGTTTCCTAAAGCTCTTCTG (配列番号９) を用いて増幅し、pcDNA3.1(+)MycHisベクター(Invitrogen)のXbaIとAgeIサイトに挿入し、C末に６×ヒスチジンタグが連結されるようにした。変異βサブユニット：mβ1 (Thr1Cys) はSite-directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用い付属マニュアルに沿って作製した。pcDNA3.1/MycHis-SOD1とpCMV-Tag4-SOD1ベクター(野生型とG93A、G85R、H46R、G37R)(参考文献16)及びpEGFP-N1-SOD1(野生型とG93A)ベクター、pCR3.1-AR24QとpCR3.1-AR97Qベクター、pcDNA3.1(+)/MycHis-α-synuclein(野生型とA53T、A30P)は以前作製したものを使用した(参考文献１６、１７、１８)。６種類のアイソフォームのtauタンパク質については、Dr. Michel Goedertより供与されたpRK172ベクターからPCR法を用いて増幅し、pcDNA 3.1(+) (Invitrogen)ベクターのKpnIとXhoIサイトに挿入したものを使用した。

【００４４】

（２）細胞培養、トランスフェクション、抗体

Neuro2a細胞とHuman embryonic kidney 293 (HEK293)細胞は、10%の牛胎仔血清含有のDulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)を用いて培養した。MTS assayにおけるトランスフェクションにはLipofectamine 2000(Invitrogen)を用い、その他の実験におけるトランスフェクションにはEffectene Transfection Reagent (Qiagen)を用いた。使用した抗体を以下に列挙する。

抗SOD1抗体(SOD100、Stressgen bioreagents)、抗His抗体(Penta-His、Qiagen)、抗α-チューブリン抗体(clone B-5-1-1、Sigma)、抗20Sプロテアソームβサブユニット抗体(Methanosarcina thermophila由来、Calbiochem)、抗20Sプロテアソームαサブユニット抗体(Methanosarcina thermophila由来、Calbiochem)、抗AR抗体 (N-20、Santa Cruz Biotechnology)、抗α-シヌクレイン抗体(LB509、Zymed)、抗tau抗体(Mouse Tau-1、Chemicon International)。

【００４５】

（３）グリセオール濃度勾配超遠心

直径10cmの培養皿で培養した細胞を1mlの0.01M Tris-EDTA, pH 7.5で回収し、２回の解

凍－溶解サイクルで細胞を破壊し、4℃、15分間、15000gで遠心後の上清を10?40％の直線的濃度勾配を持つ36mlのグリセオールの最上部に注入し、Beckman SW28ローターにて80000gで22時間遠心分離した。遠心後1mlずつLiquid layer injector fractionator (LLIF) (Advantech, model number CHD255AA)を用いて最上部から37分画に分離した。各分画より200μlずつをアセトンにて沈殿させ、沈殿物をそれぞれ50μlのサンプルバッファーにて溶解し、SDS-PAGE及びウエスタンブロットに使用した。免疫染色によるバンドに関し、ImageGauge software（フジフィルム）を用いて定量解析を行った。

【００４６】

（４）Ni-NTA pull downアッセイ

10cmの培養皿で培養したHEK293細胞にMmプロテアソームサブユニットα、αβ、ΔαβαmΔβ1をトランスフェクションし、1mlのPBSバッファーで回収した後に2回の凍結－融解サイクルにて細胞を破壊し、3000gで遠心し上清を回収した。上清と200μlのNi-NTAアガロースを混ぜ、4mlの10mMイミダゾール/PBSバッファーで4回洗浄した。その後、2mlの250mMイミダゾール/PBSバッファーにて溶出した。

【００４７】

（５）プロテアソーム活性の測定

Ni-NTA法にて生成したサンプル500μlに10mMのLLVY-AMC (Sigma)を加えて37℃で12時間インキュベートし、マルチプレートリーダー（PowerscanHT, 大日本製薬）にてキモトリプシン様活性を測定した。測定は３回行いone-way ANOVAを用いて解析した。

【００４８】

（６）免疫細胞化学

ガラスカバースリップ上で培養したHEK293細胞にpEGFP-N1-SOD1とMmプロテアソームα、βサブユニットをトランスフェクションした。48時間後細胞を固定し、ブロッキングの後に抗His抗体と4℃にて一晩インキュベートした。洗浄後、二次抗体（Alexa-546-抗マウス抗体、Molecular Probes, Inc.）と反応させ、オリンパスBX51を用いて撮影した。

【００４９】

（７）サイクロヘキシミド追跡解析

6cmの培養皿で培養したNeuro2a細胞に1μgのpcDNA3.1/MycHis-SOD1とmock(0.6μg)あるいはMmプロテアソームαmβ1(各0.3μg)、Mmプロテアソームαβ(各0.3μg)をトランスフェクションした。24時間後に50μg/mlになる様にサイクロヘキシミドを加え、指定時間に細胞をそれぞれ回収しSDS-PAGE及びウエスタンブロットに使用した。

【００５０】

（８）Pulse chase解析

6cmの培養皿で培養したNeuro2a細胞に1μgのpCMV-Tag4-SOD1^{G93A}とmock(0.6μg)あるいはMmプロテアソームαmβ1(各0.3μg)、Mmプロテアソームαβ(各0.3μg)をトランスフェクションした。24時間後に(^{35}S)Cysで60分間ラベルし、指定時間に回収した。抗FLAG抗体（M2, Sigma）にて免疫沈降を行った後、SDS-PAGEを行い、Typhoon 9410（Genaral Electric Company）にて放射能を測定した。

【００５１】

（９）細胞生存能力測定(Cell viability analysis)

コラーゲンコート96ウェルプレートでHEK293細胞を培養し、pcDNA3.1/MycHis-SOD1（野生型やG93A, G85r）とmockあるいはMmプロテアソームαmβ1、Mmプロテアソームαβをそれぞれ12ウェルずつトランスフェクションした。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS)による細胞の生存能力測定はトランスフェクションの48時間後に行った。490nmの吸光度はマルチプレートリーダー（PowerscanHT, 大日本製薬）にて37℃を維持しながら測定した。測定は３回行いone-way ANOVAを用いて解析した。

【００５２】

（１０）カスパーゼ3/7解析

96ウェルプレートでHEK293細胞を培養し、pcDNA3.1/MycHis-SOD1（野生型やG93A, G85r

）とmockあるいはMmプロテアソームαmβ1、Mmプロテアソームαβをトランスフェクションした。24時間後に血清を含まない培養液に交換し、更に24時間後にApo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega)を用いて付属マニュアルに沿って解析した。

【００５３】

２．結果

（１）Mmプロテアソームのクローニングと発現

Mmプロテアソームα（Gene Bank GeneID:1480962）とβ（Gene Bank GeneID:1479036）サブユニットをMmのゲノムからクローニングし、さらに図１Ａに示す通りN末アミノ酸2?13を欠損させたΔ（2-13）αサブユニット（Δα）ベクターを作製した。この2?13アミノ酸は20Sプロテアソームで基質の出入りを調節するgate（門）として働く事が知られている（参考文献19）。一方、変異βサブユニット（Thr1Cys）も作製した。古細菌プロテアソームβサブユニットのThr1はプロテアソームの活性中心である（参考文献20）。また、以後の実験はNeuro2aとHEK293細胞を用いて行われたが、どちらもほぼ同様の結果を得ている。

まず、Mmプロテアソームサブユニットの発現を確認するためにHEK293細胞にmock，α、Δα、β、mβ1サブユニットをトランスフェクションし、ウエスタンブロットにて解析した。図１Ｂは抗αサブユニット抗体及び抗βサブユニット抗体は、Mmプロテアソームα、Δα、βサブユニットをそれぞれ認識していることを示す。また、内在性のプロテアソームサブユニットもごく僅かに認識されていることがわかる。Ni-NTA pull down解析の結果、β又はmβ1サブユニットと共にα、Δαサブニットが共沈されることが示される（図１Ｃ）。また、沈殿サンプルのプロテアソーム活性を測定した結果、Mmプロテアソームαβにてキモトリプシン様活性が有意に高くなっていた（図１Ｄ）。

グリセオール濃度勾配超遠心によって、Mmプロテアソームαβ、Δαβ、αmβ1はヒト（human）プロテアソームα1、α5サブユニットと同じ分画(20-25/37)に分けられており、ヒト20Sプロテアソームと同等の分子量を有すると推測された。また、20-25分画のHis抗体にて検出されるバンド濃度の合計は全てのフラクションにおけるHisバンド濃度の合計の80?90％を占めていた。以上の結果より、Mmプロテアソームサブユニットα、Δα、β、mβ1は真核細胞内において共同で適切に機能的な複合体を形成することが示された。尚、Mmプロテアソームαβは毒性を示したため、以後の実験は主にMmプロテアソームαβとαmβ1を用いて行った。

【００５４】

（２）Mmプロテアソームは変異体特異的にSOD1を分解する

次に我々はMmプロテアソームと変異SOD1タンパク質（$SOD1^{G85R}$、$SOD1^{G37R}$、$SOD1^{G93A}$及び$SOD1^{H46R}$）を共に発現させてその影響を調べた。培養細胞系においては$SOD1^{G85R}$や$SOD1^{G37R}$、$SOD1^{G93A}$は$SOD1^{H46R}$より毒性が強く、また家族性ALS例においても$SOD1^{G85R}$や$SOD1^{G37R}$、$SOD1^{G93A}$は$SOD1^{H46R}$よりも病勢が強い。ウエスタンブロット解析により、変異SOD1発現量はMmプロテアソームαβの発現量が多くなるにつれて減少することが示された（図２）。しかし野生型SOD1はMmプロテアソームαβの発現により影響を受けず、さらに変異SOD1発現はMmプロテアソームαmβ1の発現により影響されなかった。これは変異SOD1発現量の変化にはMmプロテアソーム活性が重要であることを示している。$SOD1^{H46R}$発現量の減少の程度が少ないのは他の変異SOD1種に比べて毒性が小さい為であるかもしれない。

変異SOD1の発現量低下が分解の促進によるものか生成量の低下によるものかを調べる為に我々はNeuro2a細胞を用いて変異SOD1タンパク質の分解速度を検討した（図３Ａ、Ｂ）。タンパク質合成を停止するサイクロヘキシミドを用いた追跡解析において、変異体特異的にSOD1タンパク質の分解が促進されていることが示された（図３Ａ）。また、α、βサブユニットの発現量の変化は無い（図３Ａ）。野生型SOD1の分解はMmプロテアソームαβの発現には影響されていない。パルスチェイス解析では^{35}Sでラベルされた$SOD1^{G93A}$の分解がMmプロテアソームαβと共に発現させた細胞で有意に促進されていることが示された（図３Ｂ）。これらの事実はMmプロテアソームの活性中心が変異SOD1の分解に極めて重要な働きを担っていることを示唆している。

【００５５】
（３）Mmプロテアソームは変異SOD1による細胞毒性を軽減する
次に我々はHEK293細胞においてMmプロテアソームαβ、αmβ1及びmockとSOD1（野生型、$SOD1^{G85R}$、$SOD1^{G93A}$）を共発現させた際の細胞毒性の変化をMTS解析によって調べた（図４）。野生型SOD1とMmプロテアソームαβの発現量を増加させてもその細胞毒性に変化は無かった（図４）。しかし、変異SOD1とMmプロテアソームαβを発現させた細胞は変異SOD1の発現量依存的に細胞毒性が増し、Mmプロテアソームαβの発現量依存的に細胞毒性が軽減された（図４Ｂ、Ｃ）。また、この軽減効果はMmプロテアソームαmβ1では確認できなかった。変異SOD1の細胞毒性はカスパーゼ・ファミリー（caspase family）タンパク質の活性化、特にカスパーゼ３の活性化が関与しているとされている（参考文献21）。カスパーゼ３／７の蛍光基質を用いてMmプロテアソームαβ、αmβ1及びmockとSOD1（野生型、$SOD1^{G85R}$、$SOD1^{G93A}$）を共発現させた際のカスパーゼ３／７の活性を調べたところ、Mmプロテアソームαβはカスパーゼ３／７の活性化を抑制していることが示された（図４Ｄ）。以上の結果よりMmプロテアソームαβは変異SOD1による細胞毒性を軽減させる効果を持つことが示された。

【００５６】
（４）Mmプロテアソームは変異SOD1によって形成される細胞内凝集体と共存する
古細菌プロテアソームの複合体形成の過程においてαリングの形成はβサブユニットの集合に必要であり（参考文献20）、また図１Ｅに示した実験結果から大部分のβサブユニットはプロテアソーム複合体形成に使われることが判明したため、βサブユニットの局在はほぼMmプロテアソームの局在と一致する。そこで我々はHis抗体を用いてMmプロテアソームの局在状態を調べた。GFPタグを付けた野生型SOD1及び変異$SOD1^{G93A}$ベクターをMmプロテアソームαβと共に発現させ、固定後抗His抗体で染色した。その結果、GFP陽性$SOD1^{G93A}$凝集体はHis抗体陽性であり、また野生型SOD1は抗His抗体と細胞質内に均一に存在することが示された（図５）。GFP陰性の抗His抗体陽性凝集体は無く、変異SOD1と共に凝集体を形成していることが示唆された。同様の結果はNeuro2a細胞でも確認された。

【００５７】
（５）Mmプロテアソームは、異常に伸長したポリグルタミン鎖を持つアンドロゲンレセプター（AR）の分解を促進し、その細胞毒性を軽減する
Mmプロテアソームが凝集体を形成し易いタンパク質を分解できるかどうかを調べる為、次に我々はSBMAの原因タンパク質である、異常に伸長した97回の繰り返しポリグルタミン鎖を持つアンドロゲンレセプター（97Q-AR）について検討した。SOD1タンパク質で得られた結果と同様に、97Q-ARの発現量はMmプロテアソームαβの発現量が多くなるにつれて減少したが、Mmプロテアソームαmβ1を発現させても97Q-ARの発現は影響を受けなかった（図６Ａ）。また、野生型AR（24回の繰り返しポリグルタミン鎖を持つAR）はMmプロテアソームαβの発現量が多くなってもその発現量に変化は見られなかった。サイクロヘキシミド追跡解析では97Q-ARの分解はMmプロテアソームαβの存在下で促進されていたが、Mmプロテアソームαmβ1の存在下では97Q-QARの発現量に変化は無かった（図６Ｂ）。MTS解析では24Q-ARと異なり、97Q-ARにより毒性を認めたがその毒性はMmプロテアソームαβを発現させることにより軽減された(図６Ｃ)。これらの結果は、Mmプロテアソームαβは、凝集体を形成し易い異常に伸長したポリグルタミン鎖を持つARの細胞内分解を促進させ、またその細胞毒性を軽減することを示している。

【００５８】
（６）Mmプロテアソームαβは、凝集体を形成し易い他のタンパク質の分解を促進するが、凝集体を形成し難いタンパク質は分解しない
凝集体を形成し易い他のタンパク質の分解が促進されるかどうかを検討するため、α-シヌクレイン（野生型、A53T、A30P）と６種のアイソフォームのtau（C末におけるmicrotuble binding domainの繰り返し数が３か４かによって２種に分けられ、さらにN末における29個のアミノ酸の挿入の数が２、１、又は０かによって３種に分けられ、合計6種となる）を用いて解析した。変異SOD1と97Q-ARの結果と同様にMmプロテアソームαβの存在下

にて野生型、A53T、A30Pと全てのα-シヌクレインの発現量は減少し、また全てのアイソフォームのtauも減少した（図７Ａ、Ｂ）。野生型SOD1とARの発現はMmプロテアソームαβの存在下においても減少しなかったが、α-シヌクレインやtauは野生型でも減少した。

次に我々は凝集体を形成し難いLacZや、GFPを単独で発現させてその発現量の変化を調べたが、Mmプロテアソームαβの存在下でもこれらのタンパク質の発現量に全く変化はなかった（図７Ｃ）。

【００５９】

３．考察

今回我々は真核細胞内において古細菌のMmプロテアソームα、βサブユニットがタンパク質分解能を持った機能的なプロテアソーム複合体を形成し、凝集体を形成し易い、神経変性疾患に関連したタンパク質の分解を促進することを示した。古細菌のプロテアソームは、当初はキモトリプシン様活性を有するものと考えられていたが、後の研究によって実はかなり多様な分解能を持つことが示され、14個（7×2）の活性中心を持っていることがわかっている（参考文献21）。また、古細菌のプロテアソームは、各１種類のα、βサブユニットから構成され（参考文献6）、古細菌のプロテアソームの機能と真核細胞のプロテアソームの機能をin vitroで比較した実験によると、古細菌のプロテアソームはポリグルタミン鎖を分解する能力が真核細胞のプロテアソームに比べて遥かに高いことが示されている（参考文献9）。我々は古細菌のプロテアソームが有するこの潜在的な能力とその扱い易さを利用して、真核細胞のプロテアソーム系で分解できなかったものを分解しようと試みた。以上の実験結果は、真核細胞内において古細菌のプロテアソームが、凝集体を形成し易いタンパク質の分解を促進したことを示した初めての報告である。

【００６０】

Mmプロテアソームαβは変異SOD1と97Q-AR、野生型と変異α-シヌクレイン、６種のアイソフォームのtauの分解を促進した。前二者（変異SOD1と97Q-AR）は培養細胞系で毒性を来たし、さらにそれらのタンパク質を過剰発現させたトランスジェニックマウスではその神経細胞内に凝集体が形成され、神経細胞の脱落を来たし運動機能が低下するため、これまでそれぞれ家族性ALSとSBMAの疾患モデルとして使用されてきた（参考文献22、23）。サイクロヘキシミド、pulse chase解析の結果、Mmプロテアソームαβは、SOD1とARを変異体特異的に分解促進することが示された。

しかし、α-シヌクレインとtauは野生型でもMmプロテアソームαβによって発現量の低下を来した（図７）。ここで、α-シヌクレインとtauについては、SOD1やARの場合と異なり、パーキンソン病、アルツハイマー病においてそれぞれの野生型タンパク質が蓄積していることが重要である。Presynapticタンパク質であるα-シヌクレインの凝集体はsynucleopathyといった弧発性や家族性のパーキンソン病、瀰漫性レビー小体病、多系統萎縮症等で認める（参考文献24）。弧発性パーキンソン病患者において野生型のα-シヌクレインが蓄積し、さらに発現量も増加していることが示されている（参考文献25）。プロテアソームの機能低下はα-シヌクレインの分解を妨げ、結果としてさらにα-シヌクレインの異常凝集が形成されることとなる（参考文献26）。tauタンパク質はアルツハイマー病において神経細胞内にneurufibrillary tangleとして認められる（参考文献27）。プロテアソームの機能低下はアルツハイマー病患者の脳においても報告されている（参考文献28）。α-シヌクレインもtauタンパク質も比較的容易に異常な立体構造をとるため、それが凝集体形成に繋がる（参考文献29、30）。おそらくMmプロテアソームαβはこれらのタンパク質の分解を促進したと考えられる。Mmプロテアソームαβは、凝集体を形成し易い広範なタンパク質の分解を促進すると期待される。反面、Mmプロテアソームαβは、細胞内に豊富にあるGAPDHや、外来性で凝集体を比較的形成し難いGFPやLacZの分解を促進しなかった。

【００６１】

ここで問題になるのは、何故このような変異体特異的、且つ凝集体を形成し易いタンパク質特異的な分解がおこるのか、どういう認識システムが存在するのかという点である。古細菌の20SプロテアソームはPANの働きによって基質の分解を効率的に行う事が出来ると

されている（参考文献8）。PANは真核細胞の19Sの底部の祖先と考えられており（参考文献8）、分子シャペロン様の働きがあり、異常に折り畳まれたタンパク質をほどく作用を持っている（参考文献31）。古細菌での分解認識タグ（真核細胞におけるユビキチンタグの様に）はまだ明らかにされていない。しかし、in vitroにおいて古細菌の20Sプロテアソームは PANの助け無しでポリグルタミン鎖を非常に速く分解出来ている（参考文献9）。ここで我々は真核細胞内においてもPANの助け無しでMmプロテアソームαβが異常凝集体を形成し易いタンパク質の分解を促進出来る事を示した。プロテアソームの内径は異常タンパク質凝集体より遥かに小さく（参考文献32）、どのようにして凝集体がMmプロテアソームαβに侵入する事が出来るのだろうか。１つの仮説はαリング自体がシャペロン様の働きをし、凝集体を認識するだけでなく、その凝集体をほどく事が出来るのではないかという事である。αリングの門(gate)は基質の出入りを調節するものであり、自然の状態において開いた状態であるのか（参考文献33）、閉まった状態であるのか（参考文献2、32）意見が分かれている。我々の実験ではαリングの門(gate)を欠損させたMmプロテアソームΔαβは細胞毒性を来したがMmプロテアソームαβは毒性を来していない。更に有効に基質の分解を行ったと考えられる。これは常にαリングの門(gate)が閉まっている状態では到底説明出来ない。Mmプロテアソームαβは凝集体の近くに来るとαリングが凝集体をほどいて、更にその門が開かれるのではないかと考えられる。

【００６２】

Hsp90や70、27等の分子シャペロンは変異SOD1やARの分解に関与しているという報告がある（参考文献34、17）。しかし、我々は今回の実験においてそれらの分子シャペロンの発現量に変化は無く、SOD1やAR等のユビキチン化量の変化も認めなかった（データ示さず）。このような内在性のタンパク質分解に関わる機構によって今回の結果が得られたものではないと示唆される。

【００６３】

今回の実験によって我々は、Mmプロテアソームαβが、神経変性疾患に関係する凝集体を形成し易いタンパク質質特異的にその分解を促進することをin vivoで示した。この特徴的な作用は、凝集体が関係する疾患に広く応用できると期待される。

【００６４】

参考文献

1. Hershko, A. Ciechanover, A. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 425-479

2. Puhler, G., Weinkauf, S., Bachmann, L., Muller, S., Engel, A., Hegerl, R., Baumeister, W. (1992) EMBO J. 11, 1607-1616

3. Zwickl, P., Kleinz, J., Baumeister, W. (1994) Nature Struct. Biol. 1, 765-770

4. Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., Baumeister, W. (1995) Science 268, 579-582

5. Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B., Kopp, F. (1991) FEBS Lett. 290, 186-190

6. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., Seemüller, E. (1998) Cell 92, 367-380

7. Zwickl, P., Goldberg, A.L., Baumeister, W. (2000) Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis, Landes Bioscience, Georgetown, TX

8. Zwickl, P., Ng, D., Woo, K.M., Klenk, H.P., Goldberg, A.L. (1999) J. Biol. Chem. 274, 26008-26014

9. Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., Goldberg, A.L. (2004) Mol. Cell 14, 95-104

10. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. (2000) J. Cell Biochem. 77, 40-51

11. Kabashi, E., Agar, J.N., Taylor, D.M., Minotti, S., Durham, H.D. (2004) J. Neurochem. 89, 1325-35

12. Bailey, C.K., Andriola, I.F., Kampinga, H.H. and Merry, D.E. (2002) Hum. M

ol. Genet. 11, 515-523
13. Chen, Q., Thorpe, J., Keller, J.N., (2005) J. Biol. Chem. 26, 30009-30017
14. Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., Ullrich, O. (2003) J. Neurochem. 85, 115-122
15. Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Science 292, 1552-1555
16. Niwa, J., Ishigaki, S., Hishikawa, N., Yamamoto, M., Doyu, M., Murata, S., Tanaka, K., Taniguchi, N., Sobue, G. (2002) J. Biol. Chem. 277, 36793-36798
17. Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Tanaka, F., Inukai, A., Doyu, M., Sobue, G. (2005) Nature Med. 11, 1088-1095
18. Ito, T., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Doyu, M., Sobue, G. (2003) J. Biol. Chem. 278, 29106-29114
19. Benaroudj, N., Zwick, P., Seemüller, E., Baumeister, W., Goldberg, A. L. (2003) Mol. Cell 11, 69-78
20. Seemüller, E., Lupas, A., Baumeister, W. (1996) Nature 382, 468-471.
21. Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Hegerl, R., Pfeifer, G., Baumeister, W. (1991) Biomed. Biochim. Acta 50, 465-469
22. Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, F., Sufit, R.L., Siddique, T. (1994) Science 264, 1772-1775
23. Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Do, J., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M., Sobue, G. (2001) Hum. Mol. Genet. 10, 1039-1048
24. Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. (2003) Ann. N. Y. Acad. Sci. 991, 107-110
25. Miller, D.W., Hague, S.M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., cookson, M.R., Singleton, A.B. (2004) Neurology 62, 1835-1838
26. Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (2003) Science 299, 408-411
27. Selkoe, D. J. (1991) Neuron 6, 487-498
28. Keller, J.N., Hanni, K.B., Markesbery, W. R. (2000) J. Neurochem. 75, 436-439
29. Hashimoto, M., Hsu, L.J., Sisk, A., Xia, Y., Takeda, A., Sundsmo, M., Masliah, E. (1998) Brain Res. 799, 301-306
30. Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (2005) J. Biol. Chem. 24, in press
31. Benaroudj, N., Goldberg, A.L. (2000) Nat. Cell. Biol. 2, 833-839
32. Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D. (2000) Nature Struct. Biol. 7, 1062-1067
33. Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995) Science 268, 533-539
34. Patel, Y.J., Payne Smith, M.D., de Belleroche, J., Latchman, D.S. (2005) Brain Res. Mol. Brain Res. 134, 256-274

【産業上の利用可能性】

【００６５】

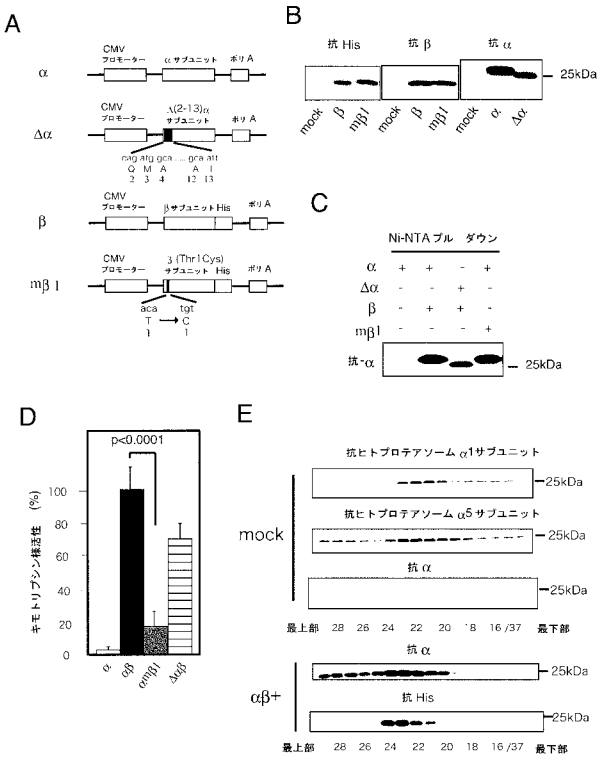
本発明の発現コンストラクトを使用することによって、真核細胞内において凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制できる。従って、本発明の発現コンストラクトは、凝集体形成性タンパク質が発症や進行などに関与する疾病の治療や予防、研究（原因究明や治療法などの確立を目的とした研究など）に利用され得る。

【００６６】

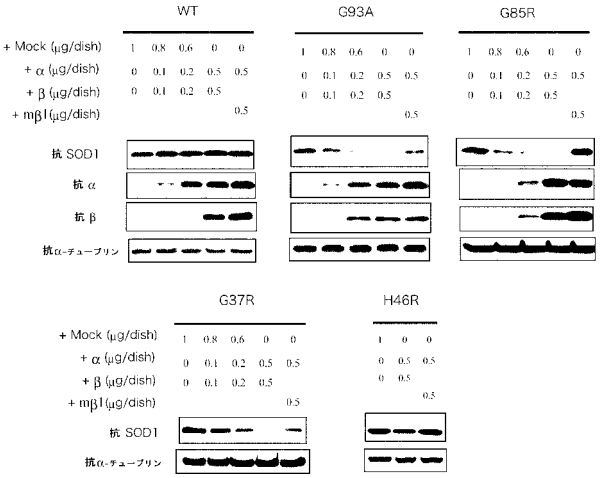
この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

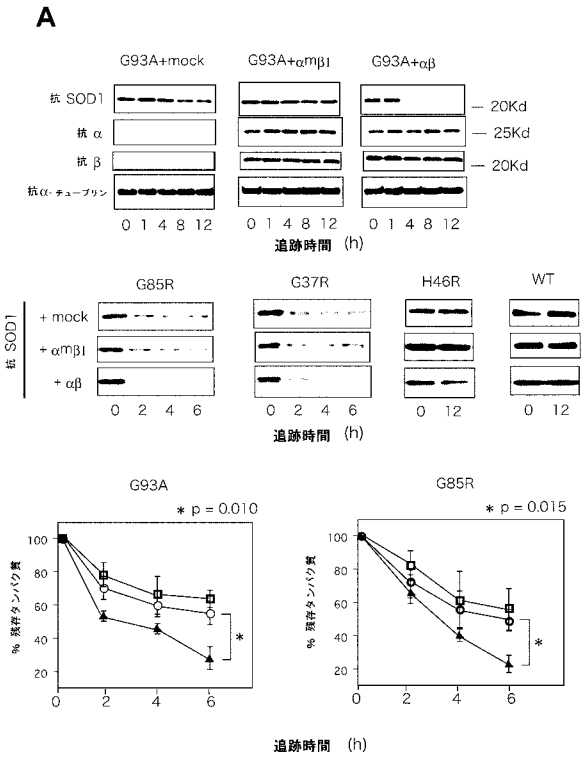
【図１】



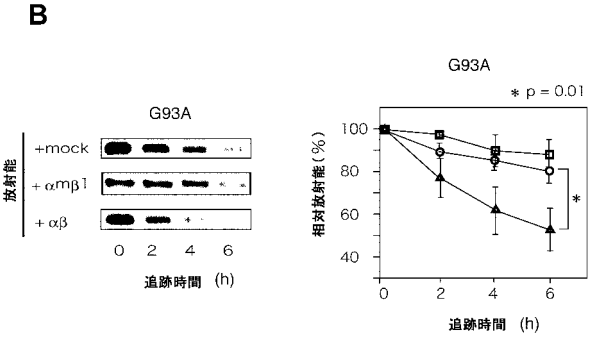
【図２】



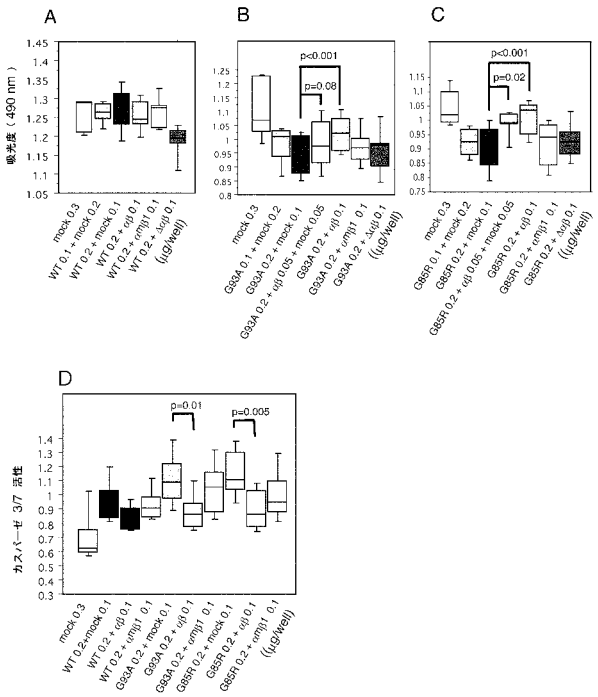
【図３Ａ】


A
G93A+mock
G93A+αmβ1
G93A+αβ
抗 SOD1
抗 α
抗 β
抗α-チューブリン
20Kd
25Kd
20Kd
0 1 4 8 12
追跡時間 (h)
G85R
G37R
H46R
WT
+ mock
+ αmβ1
+ αβ
抗 SOD1
0 2 4 6
0 12
追跡時間 (h)
G93A
G85R
＊ p = 0.010
＊ p = 0.015
% 残存タンパク質
追跡時間 (h)

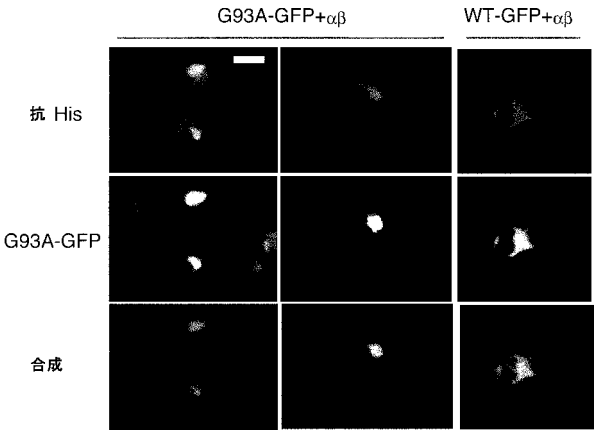
【図３Ｂ】


B
G93A
+mock
+ αmβ1
+ αβ
放射能
0 2 4 6
追跡時間 (h)
G93A
＊ p = 0.01
相対放射能 (%)
追跡時間 (h)

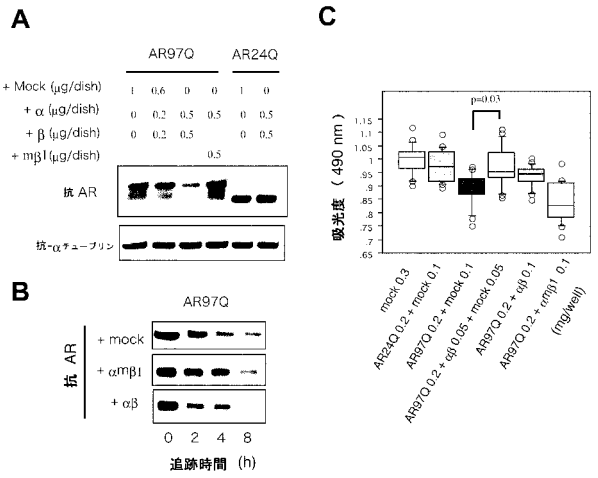
【図４】


A
B
C
D
吸光度 (490 nm)
p<0.001
p=0.08
p<0.001
p=0.02
p=0.01
p=0.005
カスパーゼ 3/7 活性
mock 0.3
WT 0.1 + mock 0.2
WT 0.2 + mock 0.1
WT 0.2 + αβ 0.1
WT 0.2 + αmβ1 0.1
WT 0.2 + Δαβ 0.1
((μg/well))
G93A 0.1 + mock 0.2
G93A 0.2 + mock 0.1
G93A 0.2 + αβ 0.05 + mock 0.05
G93A 0.2 + αβ 0.1
G93A 0.2 + αmβ1 0.1
G93A 0.2 + Δαβ 0.1
G85R 0.1 + mock 0.2
G85R 0.2 + mock 0.1
G85R 0.2 + αβ 0.05 + mock 0.05
G85R 0.2 + αβ 0.1
G85R 0.2 + αmβ1 0.1
G85R 0.2 + Δαβ 0.1

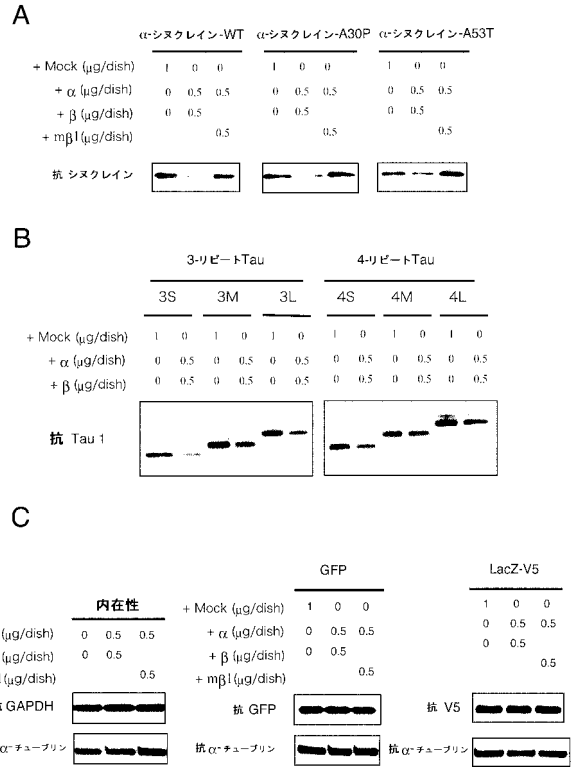
【図５】


G93A-GFP+αβ
WT-GFP+αβ
抗 His
G93A-GFP
合成

【図６】



【図７】



【配列表】

0005286523000001.app

フロントページの続き

審査官　小倉　梢

(56)参考文献　Mol. Cell, ２００４年, Vol. 14, p. 95-104
J. Cell. Biol., ２００６年　2月, Vol. 172, No. 4, p. 497-504
J. Biol. Chem., ２００５年, Vol. 280, No. 12, p. 11635-11640
J. Biol. Chem., ２００３年, Vol. 278, No. 24, p. 22044-22055
Eur. J. Cell Biol., １９９７年, Vol. 73, p. 105-113
J. Biol. Chem., １９９８年, Vol. 273, No. 4, p. 1982-1989
Protein, The National Center for Biotechnology Information, Accession No. Q8PTU1, [online], ２００６年　2月　7日, [平成24年9月11日検索], インターネット<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/23821980?sat=34&satkey=8749284>
Protein, The National Center for Biotechnology Information, Accession No. Q8PZ04, [online], ２００３年１０月　1日, [平成24年9月11日検索], インターネット<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/74550648?sat=35&satkey=406886>

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－９０
ＣＡ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ
ＷＰＩ