

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 19 年 6 月 7 日 (2007.6.7)

【公開番号】特開 2005-323554 (P2005-323554A)

【公開日】平成 17 年 11 月 24 日 (2005.11.24)

【年通号数】公開・登録公報 2005-046

【出願番号】特願 2004-145707 (P2004-145707)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 19/00

A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 4 月 18 日 (2007.4.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】樹状突起スパイン移行配列

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経細胞の樹状突起のスパインでの局在が顕著である S p i k a r (旧名: D r a p 1) 由来のアミノ酸配列を有するペプチドや該ペプチドをコードする DNA や、これらペプチドや DNA を利用するペプチド系薬剤等の所望のペプチドを神経細胞の樹状突起のスパイン等の細胞内小器官ヘデリバリーする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明者らは、発生過程の神経細胞に多量発現するアクチン結合タンパクドレブリン (Drebrin) を世界に先駆けて発見し (例えば、非特許文献 1 及び 2 参照)、このドレブリンがアクチンファイバーの性状を変えることにより神経細胞の形態形成、特に突起形成に関わっていること (例えば、非特許文献 3 ~ 5 参照) や、発生中で移動している神経細胞では、細胞体と突起全体に存在するが、成熟した神経細胞では棘構造中に特異的に存在すること (例えば、非特許文献 6 ~ 8 参照) を既に証明している。ドレブリンには、胚性型 (embryonic type) のドレブリン E と成体型 (adult type) のドレブリン A という 2 つのアイソフォームが存在しており (例えば、非特許文献 9 参照)、成熟した神経細胞のスパインに特異的に見られるドレブリン A は、神経細胞にしか発現しないという特徴を有している (例えば、非特許文献 10 及び 11 参照)。また、本発明者らは、ドレブリン A を初

代培養神経細胞に発現させると自動的に樹状突起スパインに集まり、しかもその長さを長くすることを見い出した。この発見は、ある一つの蛋白合成量を変化させることによってスパインの形態を変化させることができることを発見した世界で最初の報告である（例えば、非特許文献 1 2 参照）。

【 0 0 0 3 】

本発明者らは、また、ドレブリンの結合タンパク質である S p i k a r を酵母ツーハイブリッド (yeast two hybrid) 法によりラットから単離し、S p i k a r が 1 2 0 8 アミノ酸からなり、神経細胞の核、細胞質、スパインに存在すること、核に移行するのに重要な配列が N 末端ドメインに存在すること、及び、細胞質に移行するのに重要な配列が C 末端ドメインに存在することを発表している（例えば、非特許文献 1 3 ~ 1 7 参照）が、それらの詳細についてはわかっていなかった。

【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】J. Neurochem. 44, 1210-1216, 1985

【非特許文献 2】J. Biochem. 117, 231-236, 1995

【非特許文献 3】J. Neurosci. Res. 38: 149-159, 1994

【非特許文献 4】Exp. Cell Res. 215:145-153, 1994

【非特許文献 5】J. Biol. Chem. 269:29928-29933, 1994

【非特許文献 6】J. Neurosci. 15: 7161-7170, 1996

【非特許文献 7】Dev. Brain Res. 29, 233-244, 1986

【非特許文献 8】Brain Res. 413, 374-378, 1987

【非特許文献 9】J. Biochem. 117, 231-236, 1995

【非特許文献 1 0】Dev. Brain Res. 29, 233-244, 1986

【非特許文献 1 1】Brain Res. 413, 374-378, 1987

【非特許文献 1 2】J. Neurosci. 19, 3918-3925, 1999

【非特許文献 1 3】第 7 9 回日本生理学会大会（広島）2 0 0 2 年 3 月 2 8 ~ 3 0 日

【非特許文献 1 4】第 2 5 回日本神経科学大会（東京）2 0 0 2 年 7 月 7 ~ 9 日

【非特許文献 1 5】第 4 5 回日本神経化学大会（札幌）2 0 0 2 年 7 月 1 7 ~ 1 9 日

【非特許文献 1 6】第 2 6 回日本神経科学大会（名古屋）2 0 0 3 年 7 月 2 3 ~ 2 5 日

【非特許文献 1 7】第 4 6 回日本神経化学大会（新潟）2 0 0 3 年 9 月 2 4 ~ 2 6 日

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

脳の神経細胞からは長い「軸索」と「樹状突起」が伸びており、軸索から別の神経細胞の樹状突起への情報伝達の場合がシナプスである。記憶などを司る興奮性シナプスの受け手側の樹状突起にはスパイン（棘）と呼ばれる小さな突起が存在する。本発明の課題は、神経細胞の樹状突起のスパインでの局在が顕著である S p i k a r 由来のアミノ酸配列を有するペプチドや該ペプチドをコードする DNA や、これらペプチドや DNA を利用するペプチド系薬剤等の所望のペプチドを神経細胞の樹状突起のスパイン等の細胞内小器官へデリバリーする方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、S p i k a r の部分配列や変異配列を C O S 7 細胞又は初代培養海馬神経細胞に導入し、配列番号 2 に示される S p i k a r のアミノ酸配列（この塩基配列が配列番号 1）のうち、1 番目から 8 9 番目のアミノ酸配列（a a 1 ~ 8 9；配列番号 4 / この塩基配列が配列番号 3）が核移行配列、4 3 番目から 4 7 番目のアミノ酸配列（a a 4 3 ~ 4 7；配列番号 6 / この塩基配列が配列番号 5）が核移行シグナル、9 4 0 番目から 1 0 4 1 番目のアミノ酸配列（a a 9 4 0 ~ 1 0 4 1；配列番号 8 / この塩基配列が配列番号 7）が核外移行配列、8 2 0 番目から 1 0 4 1 番目のアミノ酸配列（a a 8 2 0 ~ 1 0 4 1；配列番号 1 0 / この塩基配列が配列番号 9）がスパイン移行配列であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

すなわち本発明は、(1) (A) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードする塩基配列；(B) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するペプチドをコードする塩基配列；(C) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するペプチドをコードする塩基配列；(D) 配列番号 9 に示される塩基配列；(E) 配列番号 9 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するペプチドをコードする塩基配列；(F) 配列番号 9 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するペプチドをコードする塩基配列；の何れかの塩基配列からなる DNA や、(2) (A) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列；(B) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるペプチドが神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するアミノ酸配列；(C) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるペプチドが神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するアミノ酸配列；の何れかのアミノ酸配列からなるペプチドに関する。

【 0 0 0 8 】

また本発明は、(3) 上記 (2) 記載のペプチドとマーカートンパク質及び/又はペプチドタグとが結合している融合ペプチドや、(4) 上記 (1) 記載の DNA と所望のペプチドをコードする DNA とをインフレームで連結し、上記 (2) 記載のペプチドと所望のペプチドとの融合ペプチドを発現することができる組換えベクターに関する。

【 0 0 0 9 】

さらに本発明は、(5) 上記 (4) 記載の組換えベクターを細胞内に導入することを特徴とする細胞内小器官へ所望のペプチドをデリバリーする方法や、(6) 上記 (2) 記載のペプチドと所望のペプチドとの結合ペプチドを細胞内に導入することを特徴とする細胞内小器官へ所望のペプチドをデリバリーする方法や、(7) 細胞内小器官が神経細胞の樹状突起のスパインであることを特徴とする上記 (5) 又は (6) 記載の細胞内小器官へ所望のペプチドをデリバリーする方法に関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 0 】

神経細胞の樹状突起のスパインでの局在が顕著である S p i k a r 由来のアミノ酸配列を有する本発明のペプチドや該ペプチドをコードする DNA を利用すると、神経細胞の樹状突起のスパイン等の細胞内小器官へペプチド系薬剤等の所望のペプチドをデリバリーすることができる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 1 】

本発明の DNA としては、(A) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列；(B) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列；(C) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列；(D) 配列番号 9 に示される塩基配列；(E) 配列番号 9 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するペプチドをコードする塩基配列；又は (F) 配列番号 9 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するペプチドをコードする塩基配列

；の何れかの塩基配列からなるDNAであれば特に制限されず、また、本発明のペプチドとしては、(A)配列番号10に示されるアミノ酸配列；(B)配列番号10に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するアミノ酸配列；又は(C)配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するアミノ酸配列；の何れかのアミノ酸配列からなるペプチドであれば特に制限されず、ここで「神経細胞の樹状突起のスパインへの移行活性を有するペプチド」とは、スパインへ移行し、スパインでの局在が顕著であるペプチドを意味する。

【0012】

上記配列番号9に示される塩基配列からなるDNAとしては、配列番号1に示される Spike をコードするDNA配列のうち2530番目から3195番目の塩基配列を、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとしては配列番号2に示される Spike のアミノ酸配列のうち820番目から1041番目のアミノ酸配列を、それぞれ挙げることができる。

【0013】

上記「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味する。また、上記「1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を意味する。

【0014】

例えば、これら1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるDNA(変異DNA)は、化学合成、DNA工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法により作製することもできる。具体的には、配列番号9に示される塩基配列からなるDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、DNA工学的な手法等を用いて、これらDNAに変異を導入することにより、変異DNAを取得することができる。DNA工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. (以後「モレキュラークローニング第2版」と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて行うことができる。この変異DNAを適切な発現系を用いて発現させることにより、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドを得ることができる。

【0015】

上記「配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列」とは、配列番号2に示されるアミノ酸配列との相同性が60%以上であれば特に制限されるものではなく、例えば、60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上であることを意味する。

【0016】

上記「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、DNA又はRNAなどの核酸をプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる塩基配列を意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍程度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナ

トリウム)を用い、65 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラークローニング第2版等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0017】

例えば、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げることができ、例えば60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを好適に例示することができる。

【0018】

本発明のDNAの取得方法や調製方法は特に限定されるものでなく、本明細書中に開示した配列番号9に示される塩基配列情報又は配列番号2に示されるアミノ酸配列情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いて当該DNAが存在することが予測されるcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより目的のDNAを単離したり、あるいは、常法に従って化学合成により調製することができる。

【0019】

具体的には、S p i k a rのcDNAが単離されたラット神経細胞や脳もしくは他の臓器より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、次いで、このライブラリーから、本発明のDNAに特有の適当なプローブを用いて所望クローンを選抜することにより、本発明のDNAを取得することができる。上記cDNAの起源としては、各種の動物細胞または組織を例示することができ、また、これらの細胞又は組織からの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。本発明のDNAをcDNAライブラリーからスクリーニングする方法は、例えば、モレキュラークローニング第2版に記載の方法等、当業者により常用される方法を挙げることができる。

【0020】

また、上記(B)～(F)のいずれかに示される塩基配列からなる本発明の変異DNA又は相同DNAとしては、配列番号9に示される塩基配列又はその一部を有するDNA断片を利用し、他の生物体等より、該DNAのホモログを適当な条件下でスクリーニングすることにより単離することができる。その他、前述の変異DNAの作製方法により調製することもできる。

【0021】

本発明のペプチドの取得・調製方法は特に限定されず、化学合成したペプチドでも、DNA組換え技術により作製した組み換えペプチドの何れでもよい。化学合成によりペプチドを調製する場合には、例えば、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って本発明のペプチドを合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して本発明のペプチドを合成することもできる。DNA組換え技術によりペプチドを調製する場合には、該ペプチドをコードする塩基配列からなるDNAを好適な発現系に導入することにより本発明のペプチドを調製することができる。これらの中でも、比較的容易な操作でかつ大量に調製することが可能なDNA組換え技術による調製が好ましい。

【0022】

例えば、DNA組換え技術によって、本発明のペプチドを調製する場合、かかるペプチドを細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体等の抗体を結合させたカラムや、上記本発明のペプチドに通常のペプチドタグ

を付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、これらのペプチドの精製物を得ることができる。

【0023】

さらに、配列番号10に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチド、又は配列番号10に示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の一例を示す配列番号1に示される塩基配列の情報に基づいて当業者であれば適宜調製又は取得することができる。例えば、配列番号1に示される塩基配列又はその一部を有するDNAをプローブとしてラット以外の動物より、該DNAのホモログを適当な条件下でスクリーニングすることにより単離することができる。このホモログDNAの全長DNAをクローニング後、常法により配列番号9に示されるDNAを取得し、これを発現ベクターに組み込み適当な宿主で発現させることにより、該ホモログDNAによりコードされるペプチドを製造することができる。

【0024】

上記本発明のペプチドとマーカートンパク質及び/又はペプチドタグとが結合している本発明の融合ペプチドとしては特に制限されず、マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、HRP等の酵素、抗体のFc領域、GFP等の蛍光物質などを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、HA、FLAG、Myc等のエピトプタグや、GST、マルトース結合ペプチド、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合ペプチドは、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した本発明のペプチドの精製や、本発明のペプチドの検出や、本発明のペプチドに対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0025】

本発明の組換えベクターとしては、前記本発明のDNAに所望のペプチドをコードするDNAをインフレームで連結し、本発明のペプチドと所望のペプチドとの融合ペプチドを発現することができる組換えベクターであれば特に制限されず、上記本発明のDNAと所望のペプチドをコードするDNAとが連結した連結体DNAとしては、本発明のDNAの下流に所望のペプチドをコードするDNAが連結されたものや、本発明のDNAの上流に所望のペプチドをコードするDNAが連結されたもののどちらでもよい。本発明の組換えベクターは、かかる連結体DNAを動物細胞用の発現ベクターに適切にインテグレートすることにより構築することができる。かかる発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製可能であるものや、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものが好ましく、また、上記連結体DNAを発現できる位置にプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等の制御配列を含有しているものを好適に使用することができる。

【0026】

動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、EGFP-C1(Clontech社製)、pGBT-9(Clontech社製)、pcDNA1(フナコシ社製)、pcDM8(フナコシ社製)、pAGE107(Cytotechnology, 3, 133, 1990)、pCDM8(Nature, 329, 840, 1987)、pcDNA1/AmP(Invitrogen社製)、pREP4(Invitrogen社製)、pAGE103(J.Biochem., 101, 1307, 1987)、pAGE210等を例示することができる。動物細胞用のプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等を挙げることができる。

【0027】

また、本発明の細胞内小器官へ所望のペプチドをデリバリーする方法としては、上記本発明の組換えベクターを細胞内に導入する方法や、前記本発明のペプチドと所望のペプチドとの結合ペプチドを細胞内に導入する方法であれば特に制限されず、上記結合ペプチド

としては、発現産物である融合ペプチドや化学反応により結合した化学結合ペプチドを例示することができる。組み換えベクターの動物細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transfection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができ、また、本発明のペプチドと所望のペプチドとの融合ペプチドの細胞内への導入には、巨大分子と非共有結合体を形成し、タンパク質等の巨大分子の構造を変化させ、タンパク質等の巨大分子を細胞内にデリバリーすることができるChariot(Active Motif社製)等の細胞毒性のない試薬を用いることができる。

【0028】

上記細胞内小器官としては、神経細胞の樹状突起のスパインの他、ミトコンドリア、細胞体、ゴルジ装置、核、ライソソーム等を挙げることができる。本発明のスパイン移行配列は神経細胞突起内を輸送されるために必要な配列である。

【0029】

上記所望のペプチドとしては、ペプチド系抗生物質、サイトカイン、造血因子、ペプチドホルモン、心臓血管系に作用する因子、中枢および末梢神経系に作用する因子、体液電解質および血液有機物質に作用する因子、骨および骨格系に作用する因子、腎臓および尿路系に作用する因子、感覚器官に作用する因子、免疫系に作用する因子、呼吸器系に作用する因子、生殖系に作用する因子、及び酵素の群から選択された医薬活性を有するペプチドを挙げることができる。上記ペプチド系抗生物質としては、バンコマイシン、ポリミキシンA～D、コリスチン等を挙げることができる。上記サイトカインとしては、インターフェロン(アルファ、ベータ、ガンマ)、インターロイキン(IL-2～IL-11)、IL-1、腫瘍壊死因子(TNF)、白血病細胞阻止因子(LIF)等を挙げることができる。上記造血因子の例としては、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、トロンプオエチン等を挙げることができる。上記ペプチドホルモンとしては、インスリン、成長ホルモン等を挙げることができる。上記心臓血管系に作用する因子としては、エンドセリン、バソプレシン、レニン、アンギオテンシン類、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)等を挙げることができる。上記中枢および末梢神経系に作用する因子の例として、エンケファリン、エンドルフィン、カルシトニン等を挙げることができる。上記体液電解質および血液有機物質に作用する因子の例として、副甲状腺ホルモン(PTH)、カルシトニン、アポプロテインE、ヒルディン等を挙げることができる。上記生殖系に作用する因子の例として、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)等を挙げることができる。上記酵素の例としてスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、ティッシュプラスミノゲンアクティベーター(TPA)、カリクレイン等を挙げることができる。

【0030】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0031】

(ドレブリン結合タンパク質 Spikar の cDNA クローニング)

配列番号2に示されるドレブリンのアミノ酸配列のうち1番目から233番目のアミノ酸配列(aa1～233)をコードするDNAを、pAS404(Clontech社製pAS1を改変したもの。Sekiguchi et al, J. Biol. Chem. 276:7246-7257.)に組み入れ、得られたプラスミドを酵母ツーハイブリッドシステムのスクリーニング用のベイト(bait)として使用した。まず、得られたプラスミドを酵母(Y190株)にトランスフォームし、これを用いてラット神経細胞のcDNAライブラリー(Clontech社製)をスクリーニングした。上記酵母を選択培地(a3-aminotriazole (25 mM) plus SD-Trp, Leu, and His plate

）上で培養し、生長してきた酵母コロニーを採取した。その結果、89個の独立したクローンが得られた。これらクローンからプラスミドを採取しシーケンスを行ったところ、そのうち64個が同じタンパク質をコードしていることがわかった。このクローンを用いて、より長いクローンを得るため、ラット神経細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングした。さらに5' / 3' RACEキット (TAKARA社製) に提示されたプロトコールに基づき、指定のプライマーを使用し、5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988) 反応を行い、不足部分の配列を取得して全長配列を得た。この遺伝子がコードするドレブリン結合タンパク質を Spikar と命名した。

【実施例2】

【0032】

(トランスフェクション及び細胞内局在の観察)

Spikar の全長配列 (aa1 ~ 1208) と部分配列 (aa1 ~ 88, aa88 ~ 1208, aa522 ~ 596, aa383 ~ 488, aa820 ~ 1041, aa940 ~ 1041, 940 ~ 1041) 及び Spikar の全長配列の45, 46番目のリシンをトレオニンに置換した変異配列 (mutNSL-aa1 ~ 1208) をコードするDNAをそれぞれ調製し、EGFP-C1ベクター (Clontech社製) のマルチクロニングサイトにサブクロニングした (図1参照)。これら組換えベクターを、リン酸カルシウム法を用いて、COS7細胞又は初代培養海馬神経細胞に導入し、次いで免疫化染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。

【0033】

Spikar のcDNAを上記7個のフラグメントにして、それらの細胞内局在を観察した。その結果、N末端領域に核局在配列が存在することが示された。図2には、特徴的な3つの像が示されている。すなわち、COS7細胞にGFP標識Spikar 及び欠失配列を導入して蛍光顕微鏡で観察したところ、N末端が欠失したaa88 ~ 1208では、aa1 ~ 1208 (全長配列) やN末端配列aa1 ~ 88に比べて核局在性が認められず、Spikar の核への局在にはN末端領域が重要であることがわかる。

【0034】

N末端の核局在配列と予想される配列のアミノ酸を2箇所置換した変異体、すなわちSpikar の全長配列の45, 46番目のリシンをトレオニンに置換した変異体 (mutNSL-aa1 ~ 1208) は、図3に示されるように核局在性が認められず、COS7細胞及び初代培養海馬神経細胞 (14DIV neuron) の核にはいることができないことがわかった。

【0035】

同様に、Spikar のフラグメントの核外移行性について調べた。一般に分子量の小さいタンパク質は拡散によって核膜孔を通過して核内にはいることができる。図4に示されるように、aa522 ~ 596やaa383 ~ 488のようなフラグメントは核内にも局在するが、aa940 ~ 1041は核内よりも核外での局在が顕著であることがCOS7細胞で観察された。また、aa940 ~ 1041を欠失した変異体である940 ~ 1041は核外に移行することができないことも観察された。以上の観察結果は、aa940 ~ 1041に核外移行配列が存在することを示唆している。図5に示すように、同様の結果が、初代培養海馬神経細胞においても観察された。

【0036】

Spikar の部分配列の樹状突起における局在を調べたところ、aa820 ~ 1041はスパインでの局在が顕著であることが観察された (図6)。これに対して、aa383 ~ 488, aa522 ~ 596等の短いフラグメントは樹状突起では広汎に局在することが観察された。以上の観察結果は、Spikar のスパインでの局在にはaa820 ~ 1041が重要な働きをしており、この部位にスパイン局在配列があることが示された。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】実施例に用いたEGFP-C1ベクターの概略構造を示す図である。図1中、p

C M V はサイトメガロウイルスのプロモータを、G F P はグリーン蛍光タンパク質を、M C S はマルチクローニングサイトを、S V 4 0 poly A は S V 4 0 ポリアデニル化シグナルをそれぞれ示す。

【図 2】S p i k a r 及びその部分配列の C O S 7 細胞内局在を蛍光顕微鏡観察した結果を示す図である。

【図 3】S p i k a r の全長配列の 4 5 , 4 6 番目のリシンをトレオニンに置換した変異体 (mutNSL- a a 1 ~ 1 2 0 8) の細胞内局在を蛍光顕微鏡観察した結果を示す図である。

【図 4】S p i k a r の部分配列 (a a 9 4 0 ~ 1 0 4 1 など) の C O S 7 細胞内局在を蛍光顕微鏡観察した結果を示す図である。

【図 5】S p i k a r 及びその欠失変異体 (9 4 0 ~ 1 0 4 1) 配列の細胞内局在を蛍光顕微鏡観察した結果を示す図である。図 5 中、上段左の小さな四角は露光時間を短くして撮影した像を示す。また、緑は G F P 蛍光を、赤はドレブリン染色像を示す。

【図 6】S p i k a r の部分配列 (a a 8 2 0 ~ 1 0 4 1) の樹状突起におけるスパインでの蛍光顕微鏡観察した結果を示す図である。