

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008 年 8 月 21 日 (21.08.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/099451 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/052342
- (22) 国際出願日: 2007 年 2 月 9 日 (09.02.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人実験動物中央研究所 (CENTRAL INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL ANIMALS) [JP/JP]; 〒2160001 神奈川県川崎市宮前区野川 1 4 3 0 番地 Kanagawa (JP). 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平 2 丁目 1 番 1 号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 北本 哲之 (KITA-MOTO, Tetsuyuki) [JP/JP]; 〒9800871 宮城県仙台市青葉区八幡 6-2-1 6-7 0 3 Miyagi (JP). 小林 篤史 (KOBAYASHI, Atsushi) [JP/JP]; 〒9800802 宮城県仙台市青葉区二日町 1 8-2 2-6 0 2 Miyagi (JP). 浅野 昌宏 (ASANO, Masahiro) [JP/JP]; 〒3998303 長野県安曇野市穂高 5 0 6 0-1-1 0 3 Nagano (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 2 0 号 神谷町 M T ビル 1 9 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, 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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, 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
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD OF DESIGNING HIGH-FUNCTIONAL PROTEIN BY COMPREHENSIVE AMINO ACID SUBSTITUTION

(54) 発明の名称: 網羅的アミノ酸置換による高機能蛋白の設計方法

(57) Abstract: It is intended to design a prion protein molecule, which is easily converted into an abnormal prion, by transferring a point mutation into a prion protein. Namely, a method of designing a prion protein having an amino acid substitution, whereby the conversion ability of a prion protein from a normal type into an abnormal type is promoted, which comprises: constructing mutant prion proteins comprising a plural number of prion proteins having been subjected to comprehensive amino acid substitutions in a prion protein, measuring the conversion ability of these mutant prion proteins from a normal type into an abnormal type, and selecting a mutant prion protein having a promoted conversion ability of a prion protein from a normal type into an abnormal type compared with the wild type prion protein.

(57) 要約: プリオン蛋白に点変異を導入して、異常型になりやすいプリオン蛋白の分子設計を行うことを目的とする。プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を促進するアミノ酸置換を有するプリオン蛋白を設計する方法であって、プリオン蛋白のアミノ酸を網羅的に置換した複数の変異プリオン蛋白から構成される変異プリオン蛋白を得て、該変異プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を測定し、正常型から異常型への変換能が野生型プリオン蛋白に比較して促進された変異プリオン蛋白を選択することを含む、プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を促進するアミノ酸置換を有するプリオン蛋白を設計する方法。

WO 2008/099451 A1

明 細 書

網羅的アミノ酸置換による高機能蛋白の設計方法

技術分野

- [0001] 本発明は、プリオン蛋白や酵素等の蛋白のアミノ酸の網羅的置換により、高機能蛋白を得る方法に関する。特にプリオン蛋白のアミノ酸を網羅的に置換し、異常化能が促進又は抑制されたプリオン蛋白を設計する方法に関する。

背景技術

- [0002] プリオンは羊のスクレピー(Scrapie)、ウシ海綿状脳症(BSE)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)(S. B. Prusiner, Science, 216, 136-144 (1982)、S. B. Prusiner, Science, 252, 1515-1522 (1991)、S. B. Prusiner, Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 13363-13383 (1998))、バリエント型ヤコブ病(vCJD)(G. Chazot et al., Lancet, 347, 1181-1181 (1996)、R. G. Will et al., Lancet, 347, 921-925 (1996))のような神経変性疾患を引き起こす。これらの疾患はプリオン病と呼ばれている。これらの病気の原因は、プリオンタンパク質の異常、すなわち、正常型プリオン蛋白(PrP^{C})から異常型(感染型)プリオン蛋白(PrP^{Sc})への構造変換にあると考えられている(S. B. Prusiner, Science, 216, 136-144 (1982)、S. B. Prusiner, Science, 252, 1515-1522 (1991)、K. Kuwata, et al., Biochemistry 41, 12277-12283 (2002))。
- [0003] 正常型プリオン蛋白(PrP^{C})は正常のヒトにも存在し、感染性は示さない。ヒトのプリオン蛋白は、253個のアミノ酸から構成されているが、成熟した PrP^{C} はコドン23～230までのアミノ酸より構成されている。N末端の22個はシグナルペプチドとして除去され、C末端のコドン231～253は、GPI(Glycosyl Phosphatidyl Inositol)アンカーシグナルとして働き翻訳後切断され、コドン230にGPIが結合した糖脂質蛋白質である。
- [0004] PrP^{C} が異常化することによって、ヒトからヒトへ感染する蛋白質ができる。この構成成分は PrP^{Sc} (異常型プリオン蛋白)と呼ばれる。
- [0005] PrP^{Sc} は、界面活性剤存在下でも不溶性の蛋白質となり、プロテアーゼに部分的に抵抗性となり、コドン82～230というタイプ1型の異常プリオン蛋白となるか、コドン97～230というタイプ2型の異常プリオン蛋白となる。プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白はP

rP27-30と呼ばれていた。これらのN末端の削れた異常型プリオン蛋白にも感染性は存在すると考えられている。

[0006] 異常型プリオン蛋白が人体に入ると、体内で正常型プリオンと結合し、正常型プリオンは異常型プリオン蛋白に次々に変換される。

[0007] 異常型プリオン蛋白の検出は、BSEやCJDの診断に必要である。従来、異常型プリオン蛋白の検出方法として、ヒト型プリオン蛋白遺伝子を導入したマウス、ウシ型プリオン蛋白遺伝子を導入したマウス等のプリオン蛋白の感染性を測定するin vivoアッセイ系が利用されている。しかしながら、そのバイオアッセイ系はヒト型では約150日、ウシ型では約300日の潜伏期間が必要であり、診断に長期間かかっていた。また、in vitroアッセイ系として、試験管内でプリオン蛋白の異常化を観察する系も存在した。従来の異常型プリオン蛋白の検出においては、異常型プリオン蛋白をELISA法やウェスタンブロット法で検出していたが、検出感度は十分ではなかった。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、プリオン蛋白に点変異を導入して、異常型になりやすい又は異常型になりにくいプリオン蛋白の分子設計を行うことを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、正常型プリオン蛋白の異常型プリオン蛋白への変換を促進又は抑制できれば、上記のin vivoのアッセイ系において、潜伏期間を短縮することができ、またin vitroアッセイ系において、試験管内での正常型プリオン蛋白から異常型プリオン蛋白への変換を促進することができると考えた。この結果、ELISA等による検出においても、異常化の促進により増幅された異常型プリオン蛋白を検出に用いることができ、検出感度が上げられると考え、正常型プリオン蛋白の異常型プリオン蛋白への変換を促進又は抑制する方法について鋭意検討を行った。

[0010] プリオン蛋白においてアミノ酸置換を導入した検討は報告されているが、家族性プリオン病を対象としていたに過ぎない(Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 May 28;93(11):5610-4)。

[0011] 本発明者らは、プリオン蛋白のアミノ酸を置換し、置換により得られた変異プリオン

蛋白の異常型蛋白質への変換しやすさ又は変換しにくさ、すなわちプリオン蛋白の異常化促進又は抑制能を測定した。この際98番目のアミノ酸(コドン98)～177番目のアミノ酸(コドン177)を野生型のアミノ酸以外の19種類のアミノ酸に置換し、それぞれについて異常化促進又は抑制能を測定していくという方法を用い、プリオン蛋白のアミノ酸置換の導入を網羅的に行った。この際、プリオン蛋白の異常化促進又は抑制を検出するために、エピトープ・タグ3F4とT41を導入した。その結果、置換により異常化を促進又は抑制するコドンのアミノ酸置換を特定し、本発明を完成させるに至った。

- [0012] 最終的に、アミノ酸置換を網羅的に検索することによって、初めてプリオン蛋白の異常化が10倍以上効率よく起こるアミノ酸置換及びプリオン蛋白の異常化が起こりにくくなるアミノ酸置換を同定することに成功した。
- [0013] 本発明者らは、このようにプリオン蛋白についてアミノ酸置換を網羅的に行うことにより、異常化促進又は抑制能が著しく優れた変異プリオン蛋白の設計に成功した。本発明者らは、さらにこの網羅的なアミノ酸置換を行いそれぞれについて特定の蛋白質活性を測定する手法により、酵素等の他の蛋白質についてもアミノ酸の網羅的置換により、優れた特性を有する変異蛋白質を設計できることを見出した。
- [0014] すなわち、本発明は以下の通りである。
- [0015] [1] 蛋白質の特定の活性を変化させるアミノ酸置換を有する変異蛋白質を設計する方法であって、蛋白質のアミノ酸を網羅的に置換した複数の変異蛋白質から構成される変異蛋白質ライブラリーを製造し、該変異蛋白質ライブラリーの各々の前記特性の活性の変化を測定し、所望の活性を有する蛋白質を選択することを含む、蛋白質の特定の活性を変化させるアミノ酸置換を有する変異蛋白質を設計する方法。
- [0016] [2] 蛋白質が酵素である[1]の蛋白質の特定の活性を変化させるアミノ酸置換を有する変異蛋白質を設計する方法。
- [0017] [3] プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を促進又は抑制するアミノ酸置換を有するプリオン蛋白を設計する方法であって、プリオン蛋白のアミノ酸を網羅的に置換した複数の変異プリオン蛋白から構成される変異プリオン蛋白を得て、該変異プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を測定し、正常型から異常型への変換

能が野生型プリオン蛋白に比較して促進又は抑制された変異プリオン蛋白を選択することを含む、プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を促進又は抑制するアミノ酸置換を有するプリオン蛋白を設計する方法。

- [0018] [4] プリオン蛋白がほ乳類のプリオン蛋白である[3]の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [0019] [5] プリオン蛋白がヒト、ウシ、ヒツジ又はマウスプリオン蛋白である[4]の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [0020] [6] プリオン蛋白のアミノ酸の網羅的な置換が、マウスプリオン蛋白を構成するコドンのコドン98～コドン177までのアミノ酸に対応するアミノ酸の野生型プリオン蛋白が有するアミノ酸以外の19種類のアミノ酸への置換である、[3]～[5]のいずれか1項の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [0021] [7] エピトープ・タグを導入したプリオン蛋白を用いる[3]～[6]のいずれかの正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [0022] [8] 正常型から異常型への変換の促進をウェスタンブロット法で測定する[3]～[7]のいずれかの正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [0023] [9] 正常型から異常型への変換の促進又は抑制をPMCA (protein misfolding cyclic amplification)法で測定する[3]～[8]のいずれかの正常型から異常型への変換能が促進された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [0024] [10] [3]～[9]のいずれかの方法により設計されたマウスプリオン蛋白を構成するコドンのコドン100～121に対応するアミノ酸の少なくとも1つが置換された正常型から異常型への変換能が促進された変異プリオン蛋白。
- [0025] [11] [3]～[9]のいずれかの方法により設計されたマウスプリオン蛋白を構成するコドン114及び／又はコドン177のアミノ酸が置換された正常型から異常型への変換能が抑制された変異プリオン蛋白。
- [0026] [12] マウス変異プリオン蛋白K100R(コドン100のKをRに置換したことを意味する。以下、同じ)、P104T、P104V、K109L、K109M、A115D、A115N、A115Q、A115S、A1

16V、A117N、A117V、G118Y、V121G又はV121Iである[10]の変異プリオン蛋白。

[0027] [13] ヒト、ウシ又はヒツジの変異プリオン蛋白であって、マウスプリオン蛋白のK100R (コドン100のKをRに置換したことを意味する。以下、同じ)、P104T、P104V、K109L、K109M、A115D、A115N、A115Q、A115S、A116V、A117N、A117V、G118Y、V121G 又はV121Iに対応するアミノ酸置換を有する変異プリオン蛋白。

[0028] [14] [3]～[13]のいずれかの方法で設計された正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を用いて生体試料中の異常型プリオン蛋白を検出する方法であって、生体試料中の異常型プリオン蛋白により正常型変異プリオン蛋白が異常型に変換される方法。

[0029] [15] 変異プリオン蛋白をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いたin vivoでのバイオアッセイにより異常型プリオン蛋白を検出する[14]の生体試料中の異常型プリオン蛋白を検出する方法。

[0030] [16] PMCA (protein misfolding cyclic amplification)法で異常型プリオン蛋白を検出する[14]の生体試料中の異常型プリオン蛋白を検出する方法。

発明の効果

[0031] 異常型プリオン蛋白 (PrP^{Sc})の検出はウシのBSEやヒトのCJDの診断に必要不可欠である。本発明の方法により設計した変異プリオン蛋白を用いれば、ヒトプリオン蛋白遺伝子を導入したトランスジェニックマウス等を用いたバイオアッセイ系において、プリオン蛋白が異常化するまでの潜伏期間を短縮することができる。また、試験管内でプリオン蛋白の異常化を測定するin vitroのアッセイ系においても、in vitroでの異常化、すなわち、正常型プリオン蛋白から異常型プリオン蛋白への変換を効率的に起こすことができる。さらに、ELISA法やウエスタンブロット法を用いた異常型プリオン蛋白の検出においても、異常化を促進することにより、増幅された異常化蛋白を測定することができるので、検出感度を向上させることができる。

[0032] 一方、異常化が抑制されたプリオン蛋白は、異常化抑制プリオン蛋白として新しいプリオン病の治療法や予防法に利用することができる。D177Nを導入したトランスジェニックマウスには、極少量の177Nのプリオン蛋白と通常の変現を示す、177Dの野生型のプリオン蛋白が存在していた。177Dの野生型のプリオン蛋白のみであれ

ば、150日でプリオン病を発病するのに対して、ごく少量177Nという異常化を抑制する分子が存在することで、2倍以上の潜伏期間を呈した。これは、プリオン蛋白の異常化を抑制する分子が、少量でも脳全体のプリオン蛋白の異常化を抑制し発病を抑えたことを証明している。つまり、in vitroでプリオン蛋白の異常化を抑制する分子は、プリオン病の予防や治療に繋がることをin vivoで証明したことになる。

図面の簡単な説明

- [0033] [図1]本発明の方法を用いて異常化を促進する変異プリオン蛋白を設計する方法を示す図である。
- [図2]本発明の方法を用いて異常化を抑制する変異プリオン蛋白を設計する方法を示す図である。
- [図3]プリオン蛋白の一次構造を示す図である。
- [図4]部位特異的突然変異の導入方法を示す図である。
- [図5]PMCA(protein misfolding cyclic amplification)法の方法を示す図である。
- [図6]本発明の方法を用いて、プロテアーゼK処理を行い異常化を促進する変異プリオン蛋白を設計する方法を示す図である。
- [図7]本発明の方法を用いて、プロテアーゼK処理を行い異常化を抑制する変異プリオン蛋白を設計する方法を示す図である。
- [図8]マウスプリオンのコドン98のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。図8左は、プロテアーゼK処理した場合(PK+)とプロテアーゼK処理しない場合(PK-)の結果を示し、図8右は異常化効率を示す。
- [図9]マウスプリオンのコドン99のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。
- [図10]マウスプリオンのコドン99のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。
- [図11]マウスプリオンのコドン100のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。
- [図12]マウスプリオンのコドン100のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図13]マウスプリオンのコドン101のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図14]マウスプリオンのコドン101のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図15]マウスプリオンのコドン102のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図16]マウスプリオンのコドン103のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図17]マウスプリオンのコドン104のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図18]マウスプリオンのコドン105のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図19]マウスプリオンのコドン106のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図20]マウスプリオンのコドン107のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図21]マウスプリオンのコドン108のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図22]マウスプリオンのコドン109のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図23]マウスプリオンのコドン110のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図24]マウスプリオンのコドン111のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図25]マウスプリオンのコドン112のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図26]マウスプリオンのコドン112のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図27]マウスプリオンのコドン113のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図28]マウスプリオンのコドン113のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図29]マウスプリオンのコドン114のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図30]マウスプリオンのコドン114のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図31]マウスプリオンのコドン115のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図32]マウスプリオンのコドン115のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図33]マウスプリオンのコドン116のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図34]マウスプリオンのコドン116のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図35]マウスプリオンのコドン117のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図36]マウスプリオンのコドン117のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図37]マウスプリオンのコドン118のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図38]マウスプリオンのコドン118のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図39]マウスプリオンのコドン119のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図40]マウスプリオンのコドン119のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図41]マウスプリオンのコドン120のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図42]マウスプリオンのコドン120のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図43]マウスプリオンのコドン121のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図44]マウスプリオンのコドン121のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図45]マウスプリオンのコドン122のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図46]マウスプリオンのコドン123のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図47]マウスプリオンのコドン124のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図48]マウスプリオンのコドン125のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図49]マウスプリオンのコドン126のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図50]マウスプリオンのコドン126のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図51]マウスプリオンのコドン127のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図52]マウスプリオンのコドン127のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図53]マウスプリオンのコドン128のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図54]マウスプリオンのコドン128のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図55]マウスプリオンのコドン129のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図56]マウスプリオンのコドン129のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図57]マウスプリオンのコドン130のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図58]マウスプリオンのコドン130のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図59]マウスプリオンのコドン131のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図60]マウスプリオンのコドン132のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図61]マウスプリオンのコドン133のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図62]マウスプリオンのコドン134のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図63]マウスプリオンのコドン134のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図64]マウスプリオンのコドン135のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図65]マウスプリオンのコドン136のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図66]マウスプリオンのコドン137のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図67]マウスプリオンのコドン137のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図68]マウスプリオンのコドン138のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図69]マウスプリオンのコドン139のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図70]マウスプリオンのコドン140のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図71]マウスプリオンのコドン141のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図72]マウスプリオンのコドン142のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図73]マウスプリオンのコドン143のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図74]マウスプリオンのコドン144のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図75]マウスプリオンのコドン145のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図76]マウスプリオンのコドン146のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図77]マウスプリオンのコドン147のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図78]マウスプリオンのコドン148のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図79]マウスプリオンのコドン149のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図80]マウスプリオンのコドン150のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図81]マウスプリオンのコドン151のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図82]マウスプリオンのコドン152のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図83]マウスプリオンのコドン153のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図84]マウスプリオンのコドン154のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図85]マウスプリオンのコドン155のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図86]マウスプリオンのコドン155のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図87]マウスプリオンのコドン156のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図88]マウスプリオンのコドン156のアミノ酸をエピトープタグとしてT41を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図89]マウスプリオンのコドン157のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図90]マウスプリオンのコドン158のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図91]マウスプリオンのコドン159のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図92]マウスプリオンのコドン160のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図93]マウスプリオンのコドン161のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図94]マウスプリオンのコドン162のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図95]マウスプリオンのコドン163のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図96]マウスプリオンのコドン164のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図97]マウスプリオンのコドン165のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図98]マウスプリオンのコドン166のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図99]マウスプリオンのコドン167のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図100]マウスプリオンのコドン168のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図101]マウスプリオンのコドン169のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図102]マウスプリオンのコドン170のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図103]マウスプリオンのコドン171のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図104]マウスプリオンのコドン172のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図105]マウスプリオンのコドン173のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図106]マウスプリオンのコドン174のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図107]マウスプリオンのコドン175のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図108]マウスプリオンのコドン176のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図109]マウスプリオンのコドン177のアミノ酸をエピトープタグとして3F4を用いて置換した場合の異常化を示す図である。

[図110]ヒトプリオンのコドン116のアミノ酸を置換した場合の異常化を示す写真である。

[図111]ヒトプリオンのコドン116のアミノ酸を置換した場合の異常化を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

- [0034] 本発明で対象とするプリオン蛋白は、ヒト、ウシ、ヒツジ、マウス、ラット、ウマ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ハムスター等のほ乳類及びその他あらゆる動物のプリオン蛋白である。ヒト、ウシ、ヒツジ及びマウスのプリオン蛋白のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1、3、5及び7に示し、ヒト、ウシ、ヒツジ及びマウスのプリオン蛋白をコードする遺伝子の塩基配列をそれぞれ、配列番号2、4、6及び8に示す。ヒト、ウシ、ヒツジ及びマウスのプリオン蛋白の配列のデータベースにおけるアクセッション番号は、それぞれNM_183079、D10612、D38179及びNM_011170である。
- [0035] 本発明においては、野生型プリオン蛋白のコドンを他のアミノ酸に置換し変異プリオン蛋白を作製し、該変異プリオン蛋白の異常化促進又は異常化抑制効果を測定する。本発明の方法の概念を図1及び図2に示す。ここで、プリオン蛋白の異常化促進効果とは、正常型プリオンから異常型プリオンへ変換させる能力が向上することをいい、異常化抑制効果とは、逆に正常型プリオンから異常型プリオンへ変換させる能力が低下することをいう。本発明においては、異常化を促進する変異(図1)及び異常化を抑制する変異(図2)の両方を対象とし、異常化促進効果が向上した変異プリオン蛋白及び異常化抑制効果が向上した変異プリオン蛋白を設計し、製造する。
- [0036] コドンを置換するプリオン蛋白の部位は、限定されないが、プリオン蛋白の異常化に関与する部位が好ましく、コドン98～コドン177である(図3)。アミノ酸の網羅的置換とは、蛋白質を構成するアミノ酸のうちの多数のアミノ酸のそれぞれを置換し、多数の変異蛋白質を得ることをいう。プリオン蛋白以外の蛋白質においては、すべてのアミノ酸について置換を行ってもよいし、蛋白質の活性部位が予め判明しているときはその活性部位に位置する複数のコドンについて置換を行えばよい。例えば、蛋白質を構成する全アミノ酸、又は蛋白質の特定の活性部位を構成するアミノ酸の50%以上のアミノ酸、好ましくは80%以上のアミノ酸、さらに好ましくはすべてのアミノ酸について置換を行えばよい。
- [0037] コドンの置換は、各コドンにおいて20種類のアミノ酸のうち、野生型アミノ酸以外の1

9種類のアミノ酸への置換を行えばよい。20種類のアミノ酸は、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、チロシンがある。

[0038] コドンのアミノ酸の置換は、公知の部位特異的突然変異等により導入することができる。部位特異的突然変異の導入方法の概念図を図4に示す。

[0039] 本発明において、プリオン蛋白の測定の際、内在性のプリオン蛋白と区別するために、レコンビナント・プリオン蛋白にエピトープ・タグを導入しておくのが好ましい。あらかじめエピトープ・タグに対する抗体を準備しておき、該抗体を用いてエピトープ・タグを導入したプリオン蛋白を測定すればよい。ただし、エピトープ・タグを導入する部位がコドンのアミノ酸を置換する部位とオーバーラップする場合、エピトープ・タグを導入する部位のアミノ酸置換による変異プリオン蛋白の機能変化を正確に測定することができない。また、エピトープ・タグの導入によりプリオン蛋白の機能が変化する場合も否定できない。このため、導入部位の異なる複数のエピトープ・タグを用い、それぞれのエピトープ・タグを導入したプリオン蛋白について検討を行うのが好ましい。エピトープ・タグは、プリオン蛋白の構造等を変化させないものを導入する必要がある。このため、ある動物種のプリオン蛋白について網羅的アミノ酸置換を行い、変異プリオン蛋白の検討を行う場合、他種動物のプリオン蛋白のアミノ酸配列が異なる部分配列であってエピトープとして抗体に認識される配列をエピトープ・タグとして用いられればよい。例えば、マウスのプリオン蛋白を用いて検討を行う場合、エピトープ・タグは、マウスPrPを認識しない抗体が認識するエピトープの配列を用いればよく、例えばマウスのプリオン蛋白とヒトのプリオン蛋白のアミノ酸配列が相違し、抗体に認識される部位について、相違するアミノ酸をヒトのプリオン蛋白に置換した配列をエピトープ・タグとして用いられればよい。このようなエピトープ・タグとして、例えば3F4タグ(. Et al. J Vir ol. 1987 Dec; 61(12):3688-93)やTNT41/71タグ(. et al., Neurosci Lett. 2000 Jul 21 ; 288(3): 179-82)が挙げられる。用いるエピトープ・タグは検討するプリオンの由来動物種により適宜設計することができる。

[0040] タグを導入し、コドンのアミノ酸変異を導入したプリオン蛋白をコードする遺伝子は、

プリオン蛋白を発現し得る細胞に導入し、異常化の促進又は抑制の効果の変化を測定することができる。プリオン蛋白を発現し得る細胞としては、例えばスクレピー (Scrapie) の感染因子であるRML株を感染させたNeuro2a (N2a) 細胞が挙げられる。また、タグを導入し、コドンのアミノ酸変異を導入したプリオン蛋白をコードする遺伝子を導入したノックインマウス等のノックイン動物を作出し、プリオン蛋白の感染実験を行ってもよい。さらに、PMCA (protein misfolding cyclic amplification) 法により、プリオン蛋白の増幅実験を行うこともできる。PMCA法においては、ホモジェネートした、異常型プリオン蛋白に感染したハムスターのPrP^{Sc}を含む脳乳剤を基質となるPrP^Cと混合し、インキュベーションと超音波洗浄を繰り返すことにより、PrP^CがPrP^{Sc}に変換し、PrP^{Sc}を増幅させる方法である。従来は、基質となるPrP^Cとして、正常脳ホモジネートを用いており、単離精製したPrP^Cを用いても増幅効率が悪かったが、本発明の方法で得られた異常化が促進されたプリオン蛋白を用いることにより、正常脳ホモジネートを用いなくても、異常型プリオン蛋白の増幅が可能になる。正常PMCA法の方法の概念図を図5に示す。さらに、本発明の方法により、ヒトのvCJDプリオンやウシのBSEプリオンの増幅が可能であり、ヒトやウシの血液中からのプリオン増幅ができ、診断に利用することができる。

[0041] 正常型プリオン蛋白と異常型プリオン蛋白の判別は、プロテアーゼK処理により正常型プリオン蛋白は分解されるが、異常型プリオン蛋白は分解されないことを利用して行うことができる。すなわち、プリオン蛋白をコードする遺伝子を導入した細胞の細胞破碎液をプロテアーゼKで処理することなく、エピトープ・タグに対する抗体を用いて測定すれば正常型プリオン蛋白及び異常型プリオン蛋白の両方を測定することができ、プロテアーゼK処理したのちに、測定すれば異常型プリオン蛋白のみを測定することができる。エピトープ・タグに対する抗体を用いた測定はELISA法やウエスタンブロット法等で行うことができる。図6及び7にプロテアーゼK処理を行い測定する方法の概念図を示す。

[0042] 例えば、マウスプリオン蛋白においては、コドン99～104、108～111、115～117、120～121、127～129、134、155～158のコドンにおいてアミノ酸を変異させることにより、異常化が促進される。どのコドンのアミノ酸をどのアミノ酸に置換すれば異常化がど

の程度促進又は抑制されるかは、図8～図109に示される。図8～図109において、WTは野生型のプリオン蛋白の結果を示す、1文字アルファベットはそれぞれのコドンの野生型アミノ酸を置換したアミノ酸を示す。グラフのバーがWTより高いアミノ酸は、そのアミノ酸への置換により異常化効率が促進されたことを示し、グラフのバーがWTより低いアミノ酸は、そのアミノ酸への置換により異常化効率が抑制されたことを示す。本発明は、WTと比べて異常化効率が促進された、あるいは抑制されたすべての変異プリオン蛋白を包含する。例えば、マウスプリオン蛋白において、正常型から異常型への変換能が促進された変異プリオン蛋白として、K100R(コドン100のKをRに置換したことを意味する。以下、同じ)、P104T、P104V、K109L、K109M、A115D、A115N、A115Q、A115S、A116V、A117N、A117V、G118Y、V121G、V121I等で示される変異プリオン蛋白が挙げられる。また、正常型から異常型への変換能が抑制された変異プリオン蛋白とし、コドン114のAを他のアミノ酸に置換した変異プリオン蛋白、コドン117のDを他のアミノ酸に置換した変異プリオン蛋白、例えばD177Nが挙げられる。

[0043] マウス以外のヒト、ウシ、ヒツジ等のプリオン蛋白においては、ヒト、ウシ、ヒツジ等のプリオン蛋白のアミノ酸配列とマウスのプリオン蛋白のアミノ酸配列を比較した場合において、マウスの上記のコドンに対応するコドンを変異させればよい。ここで、2種類のプリオン蛋白のアミノ酸配列に対応するコドンとは、2種類のプリオン蛋白のアミノ酸配列を相同性に基づきアラインメントさせたときに同位置にある相当するコドンをいう。例えば、マウスのプリオン蛋白のコドン115に対応するヒトのプリオン蛋白のコドンはコドン116である。マウスのプリオン蛋白の特定のコドンに対応するヒト、ウシ、ヒツジ等の他動物種のコドンがどれかはアラインメントさせることにより容易に決定することができる。また、本発明においてマウス変異プリオン蛋白A115Sに対応する、多種動物種の変異プリオン蛋白という場合、マウスのコドン115に対応するAがSに置換された変異プリオン蛋白をいう。例えば、マウス変異プリオン蛋白A115Sに対応するヒトの変異プリオン蛋白は、A116Sである。アラインメントは公知のアラインメントの方法により行なうことができ、日立ソフト社製のDNASISやフリーソフトのCLUSTALWやBLAST等の遺伝子配列解析ソフトを用いて行なえばよい。

[0044] さらに、本発明は、プリオン蛋白の異常化を促進するアミノ酸置換を複数有する変

異プリオン蛋白及びプリオン蛋白の異常化を抑制するアミノ酸置換を複数有する変異プリオン蛋白をも包含する。

[0045] 本発明の方法により設計した変異プリオン蛋白は野生型のプリオン蛋白に比べ、異常化が促進又は抑制され、正常型から異常型への変換の効率が2倍以上、好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上増加又は減少している。

[0046] また、上記のようにプリオン蛋白の異常化を検出するために、エピトープ3F4とT41を導入した。すなわち、1次構造の違うプリオン蛋白を用いて同じプリオン株で異常化を比較した。この結果、3F4とT41分子で独特の異常化促進アミノ酸置換があることが判明した。このことは、同じプリオン株でも動物種(プリオン蛋白が異なる)によって異常化を起こす特有のアミノ酸置換があることを示している。このように、動物種で異なる可能性があるのならば、当然プリオンの感染株でも異常化を起こすアミノ酸置換は異なることが予測される。例えば、同じヒトのプリオンでもsporadic(弧発性)CJDとvCJD(BSE由来)のプリオンでは異常化は異なることが予測される。

[0047] 本発明の設計方法により得られた異常化促進又は抑制効果が変化したプリオン蛋白は、異常型プリオン蛋白の検出に用いることができ、異常型プリオン蛋白の検出により、ウシBSEやヒトCJDの検出・診断が可能になる。ウシの異常型プリオン蛋白の検出には、本発明の方法で設計し製造されたウシプリオン蛋白の変異体を用い、ヒトの異常型プリオン蛋白の検出には、本発明の方法で設計し製造されたヒトプリオン蛋白の変異体を用いればよい。

[0048] 異常型プリオン蛋白の検出は、例えば、本発明の方法により設計した変異プリオン蛋白をノックインしたマウスを作出し、該マウスに異常型プリオン蛋白の存在が疑われる血液、脳乳剤等の生体試料である検体を投与し、マウスにおけるプリオン病の発症を検出すればよい。この際、本発明の方法により設計した変異型のプリオン蛋白が、検体中の異常型プリオン蛋白により異常型へと変換される。すなわち、検体中に存在する異常型プリオン蛋白が引き金となり、変異型プリオン蛋白が異常型に変換されていく。一方、検体中に異常型プリオン蛋白が存在しない場合は、変異型プリオン蛋白は異常型へ変換しない。最終的に検体中で増幅された異常型プリオン蛋白を測定することにより、検体中に異常型プリオンが存在しているか否かを決定することができ

る。本発明の方法により設計し製造した異常化が促進されている変異プリオン蛋白を用いた場合、従来の異常型プリオン蛋白のバイオアッセイに比較して、短い潜伏期間で異常型プリオン蛋白の検出を行うことができる。

[0049] さらに、試験管内でのプリオン蛋白の異常化を測定するin vitroのアッセイ系においても、本発明の方法により設計した異常化が促進された変異プリオン蛋白を用いることにより、in vitroでの正常型プリオン蛋白から異常型プリオン蛋白への変換が促進され、高感度で異常型プリオン蛋白を測定することができる。例えば、PMCA (protein misfolding cyclic amplification)法を利用して異常型プリオン蛋白を測定することができる。

[0050] 一方、異常化が抑制されたプリオン蛋白は、異常化抑制プリオン蛋白として新しいプリオン病の治療法や予防法に利用することができる。

[0051] 本発明の変異蛋白の設計方法は、プリオン蛋白のみならず、酵素等の他の蛋白にも利用することができる。蛋白の特定の機能を改変する場合、蛋白の該特定の機能を測定する方法が確立されていれば、前記蛋白のアミノ酸を網羅的に置換し、複数の変異蛋白を得て、それぞれの変異蛋白について、特定の機能を測定すればよい。この場合、複数の変異蛋白を変異蛋白ライブラリーと呼ぶことがある。この際、網羅的なアミノ酸置換を行うアミノ酸は、蛋白のアミノ酸すべてでもよいが、活性部位が判明している場合は、活性部のアミノ酸について置換を行えばよい。

[0052] 本発明の方法により、酵素等で酵素の活性部位に網羅的にアミノ酸置換を導入し、新しい酵素活性を得ることができ、例えば、トリプシンは37℃で至適な酵素活性を示すが、10℃での活性をアミノ酸置換を導入した上で、測定し10℃での活性が向上した変異トリプシンを選択することにより、10℃での洗濯に利用可能なトリプシンの分子設計が可能となる。

実施例

[0053] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0054] 実施例1 マウスプリオン蛋白の変異プリオン蛋白

スクレイピー (Scrapie) の感染因子であるRML株を感染させたNeuro2a (N2a) 細胞を

使用した(ScN2a細胞と呼ぶ)(Butler DA et al., J Virol. 1988 May; 62(5):1558-64)。ScN2a細胞は、Prusiner博士(米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部)より供与された。N2a細胞はマウス由来のNeuroblastoma細胞であり、マウスのプリオン蛋白を発現している。

[0055] マウスのプリオン蛋白において、コドン98～コドン177までのアミノ酸をそれぞれ19種類のその他のアミノ酸に置換させたプリオン蛋白をScN2a細胞に導入した。導入するにあたって用いたベクターとしてプラスミドpSPOXを用いた(Scott MR et al., Protein Sci. 1992 Aug;1(8):986-97)。この際、部位変異的突然変異導入法により変異を導入した。プラスミドpBluescriptに導入したプリオン蛋白をコードする遺伝子の各コドンプライマーを用いて19種類のアミノ酸をコードするように置換し、置換した遺伝子をpSPOXに導入した。図4にコドン130のアミノ酸をアラニン(Ala)に置換する場合の例を示す。

[0056] 導入するDNA40 μ gをHepes緩衝食塩水(20mM Hepes,pH7.4,150mM NaCl)400 μ lに溶解させた後、DOTAP(Roche Diagnostics)160 μ gと混合した。室温で10分間静置した後、培養液を5ml加えて細胞を培養しているディッシュの培養液と交換した。培養液の組成はDMEM (GIBCO), 10% Fetal Bovine Serum(GIBCO), 100U/mlPenicillin(GIBCO), 100 μ g/ml Streptomycin(GIBCO)であった。37℃で2日間培養した後、細胞溶解バッファー(10mMTris-HCl pH7.5, 100mMNaCl, 1mMEDTA, 0.5%TritonX-100, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム)により細胞を回収した。

[0057] 遺伝子導入したレコンビナント・プリオン蛋白を同定するために、エピトープ・タグをプリオン蛋白に入れた。エピトープ・タグは、2種類用意した。3F4タグ、SKPKTNMKHM;配列番号9(. Et al. J Virol. 1987 Dec; 61(12):3688-93)は世界的に用いられているタグであり、マウスのプリオン蛋白のコドン102～コドン111の配列(SKPKTNLKHV;配列番号10)コドン108のLeuをMetに、さらにコドン111のValをMetに置換したタグである。3F4タグはヒト及びハムスターのプリオン蛋白が有する配列であり、例えばヒトの場合、コドン103～コドン112が相当する。もう1つのエピトープ・タグは、TNT41/71タグである。このTNT41/71タグ、VVEQMCITQYE;配列番号11(. et al., Neurosci Lett. 2000 Jul 21; 288(3): 179-82)は、東北大学で作成したタグでありマウスのプリオン蛋

白のコードン208～コードン218の配列(VVEQMCVTQYQ;配列番号12)のコードン214のValをIleに、さらにコードン218のGlnをGluに置換したタグである。TNT41/71タグはヒトのプリオン蛋白が有する配列であり、例えばヒトの場合、コードン209～コードン219が相当する。

- [0058] ScN2aにおけるプリオン蛋白の正常型(PrP^C)から異常型(PrP^{Sc})への変換の測定は以下の方法により行った。
- [0059] 最初にレコンビナント・プリオン蛋白のPrP^CとPrP^{Sc}の総量を測定した。レコンビナント・プリオン蛋白のPrP^CとPrP^{Sc}の総量を測定するために、培養したN2a細胞の細胞破碎液をエピトープタグに対する抗体、抗3F4抗体又は抗TNT41/71抗体を用いて、直接ウェスタンブロット法で測定した。抗3F4抗体はSENETEK社より入手し、抗T41抗体はヒトのレコンビナントプリオン蛋白をマウスに免疫して作製したモノクローナル抗体を用いた。同一のコードンを19種類のアミノ酸に置換したものと野生型のアミノ酸の合計20種類を同時に測定した。測定はVersaDocイメージアナライザー(バイオラッド社)を用いて行い、定量した。
- [0060] 次いで、レコンビナント・プリオン蛋白の異常型(PrP^{Sc})の量を測定した。レコンビナント・プリオン蛋白の異常型(PrP^{Sc})の量を測定するために、ScN2a細胞の細胞破碎液をProteinase K(20mg/ml)で処理した後、100,000gの遠心を行い不溶性の分画を得て、異常型プリオン蛋白を精製した。異常型プリオン蛋白の精製は詳細には以下の方法で行なった。
- [0061] ScN2a細胞破碎液にSarkosyl(2%, Fluka), Proteinase K (20 μ g/ml, Wako)を加え37℃で30分間インキュベートした。Pefa bloc SC(Roche Diagnostics)を加えて反応を止め、超遠心機(Hitachi Koki)に100,000×g, 20℃, 60分の条件で超遠心した。上清を除去した後、サンプルバッファー(60mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol, 5% Glycerol, 0.005% Bromophenol Blue)を加えて超音波ホモジナイザー(Branson)により再懸濁した。次いで、100℃, 8分間ボイルして、エピトープタグに対する抗体、抗3F4抗体又は抗TNT41/71抗体を用いて、ウェスタンブロット法で定量した。定量には、VersaDocイメージアナライザーを用いた。定量は野生型プリオン蛋白とともに19種類のアミノ酸のいずれかに置換した変異型プリオン蛋白を同時に測定した。

- [0062] 測定後、野生型プリオン蛋白の総PrP量又はPrP^{Sc}量を1とし、それぞれについて比較した値を各アミノ酸置換の値とした。また、各アミノ酸置換で総PrPの発現量が異なるために、その総PrP量で補正したPrP^{Sc}量も求めた。
- [0063] 3F4タグに関しては、コドン98～101とコドン112～177までを検索した。検索できなかったコドン102～111は、3F4抗体が認識するエピトープの部位である。
- [0064] TNT41/71タグに関しては、3F4で不可能であったコドン102～111をすべて検索するとともに、3F4タグで異常化促進効果の認められたコドンを中心にその再現性を見るためにTNT41/71タグでも異常化を検討した。
- [0065] 結果を図8～図109に示す。図8～図109において、横軸は置換したアミノ酸の種類を示す。最も左は野生型(WT)を表し、右に向かってアラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)を示しており、各コドンにおいて野生型と同じアミノ酸は除いてある。各図の左のグラフ(左のグラフ)の縦軸は、PrP^{Sc}の相対量を示し、白抜きのバーがプロテアーゼK処理しない場合(PK-)、黒抜きのバーがプロテアーゼK処理した場合(PK+)の結果を示す。黒抜きのバーの値が大きいアミノ酸ほど、置換によりプリオン蛋白の異常化が促進されたことを示す。一方、黒抜きのバーの値が小さいアミノ酸ほど、置換によりプリオン蛋白の異常化が抑制されたことを示す。各図の右のグラフ(右のグラフ)は、それぞれのアミノ酸に置換した場合の、異常化効率を示す。異常化効率は、左のグラフにおいて、PK+の場合の値をPK-の場合の値で序した数値であり、異常化効率が何倍向上したかを示す。
- [0066] エピトープ・タグの違いに関わらず、コドン115～コドン117のアミノ酸を置換した場合に、変異プリオン蛋白の異常化が促進された。コドン115は、野生型のアラニン(A)をアスパラギン酸(D)、アスパラギン(N)又はセリン(S)に置換した場合に、異常化が促進された。それぞれの変異体をA115D、A115N及びA115Sと称する。また、コドン117は、野生型のアラニン(A)をイソロイシン(I)又はバリン(V)に置換した場合に、異常化が促進された。該変異体をA117Sと称する。その他、多くのアミノ酸置換により、プリオン

蛋白の異常化が促進又は抑制されたことが図8～109によりわかる。

- [0067] また、一方のエピトープ・タグを導入したプリオンのみにおいて、異常化を促進する置換も認められた。このような置換のコドンは、99～104、108～111、120～121、127～129、134、155～158であった。
- [0068] 上記のように、プリオン蛋白の異常化を検出するために、エピトープ3F4とT41を導入した。すなわち、1次構造の違うプリオン蛋白を用いて同じプリオン株で異常化を比較した。この結果、3F4とT41分子で独特の異常化促進アミノ酸置換があることが判明した。このことは、同じプリオン株でも動物種(プリオン蛋白が異なる)によって異常化を起こす特有のアミノ酸置換があることを示している。このように、動物種で異なる可能性があるなら、当然プリオンの感染株でも異常化を起こすアミノ酸置換は異なることが示唆される。例えば、同じヒトのプリオンでもsporadic(弧発性)CJDとvCJD(BSE由来)のプリオンでは異常化は異なることが予測される。
- [0069] さらに、A115N変異体(コドン115のアラニン(A)をアスパラギン(N)に置換したもの)について、PMCAアッセイを行った。PMCAアッセイは、Nature, 411, 810 (2001)やScience 7 July 2006:Vol. 313. no. 5783, pp. 92-94の記載に従って以下のように行った。
- [0070] 変異プリオン蛋白を発現させたScN2a細胞にプロテアーゼ阻害剤Complete (Roche Diagnostics)を含むPBSを加えセルスクレイパーで回収した。回収した細胞を超音波ホモジナイザー(Branson)により破碎した。鑄型として用いるスクレイパー持続感染細胞(ScN2a細胞)も同様にCompleteを含むPBSで回収し、細胞を破碎した。ScN2a細胞破碎液40 μ lとScN2a細胞破碎液120 μ lを混合し5×PMCAバッファーを40 μ l加えた。最終的なPMCA反応液の組成は、PBS, 4mM EDTA, 1% NP-40, 1×Completeであった。交差超音波自動反応装置(ELEKON)により超音波処理(5秒発振× 回, 1時間サイクル)と37℃インキュベーションのサイクルを48サイクル繰り返した。反応終了後、反応液30 μ lにProteinase K(20 μ g/ml, Wako)を加えて37℃で30分間インキュベートした。5×サンプルバッファーを1×になるように加えて100℃で8分間ボイルし、ウェスタンブロットに使用した。
- [0071] このアミノ酸置換による異常化効率、PMCA法を用いた異常化の検出においても

再現性が得られた。

[0072] また、コドン114及び177においては、すべてのアミノ酸置換により、野生型のA(コドン114)及びD(コドン177)に比べ、異常化が起こりにくくなった。例えば、D177Nで示される変異プリオン蛋白質において、異常化が起こりにくくなった。D177N変異プリオン蛋白をコードする遺伝子をマウスに導入し、トランスジェニックマウスを作製したところ、プリオン蛋白の感染が抑制された。

[0073] 実施例2 ヒトプリオン蛋白の変異プリオン蛋白

プリオン蛋白としてヒトのCJD患者脳(H-3)MM1を使用し、コドン116を置換した。PMCAの結果を図110及び111に示す。

[0074] マウスの系では、ヒトプリオン蛋白のコドン116に対応するコドン115をD、N及びSに置換した場合、野生型に比べて5倍以上の異常化効率を示していた。ヒトの系では、コドン116をN又はSに置換した場合に異常化効率が高くなったことに関しても、その効率の程度は低く、また116をDに置換した場合の効率は低く、マウスとヒトという動物の種類の違いによって同じコドンに相当する部位のアミノ酸置換でも異常化効率が異なることを明らかにした。

配列表フリーテキスト

[0075] 図9～12 合成

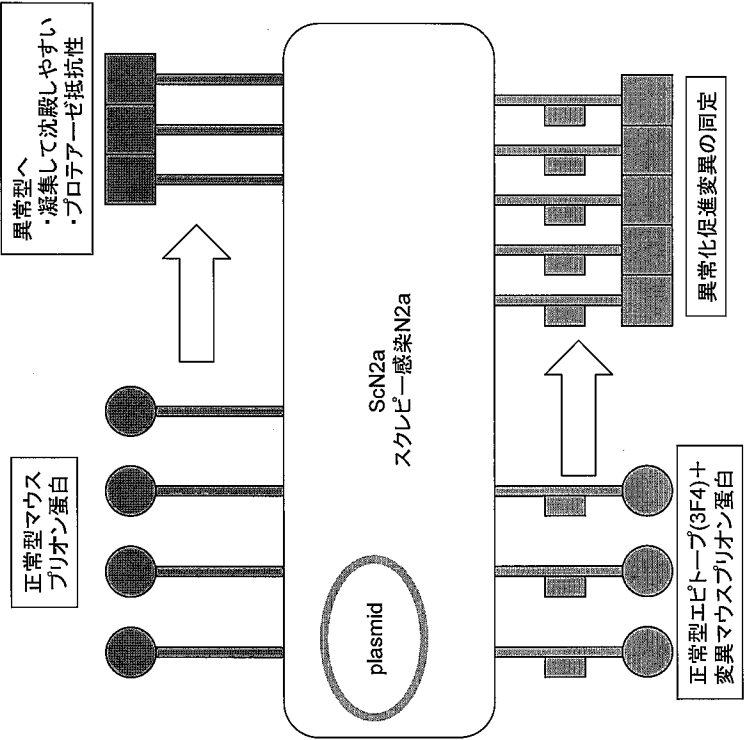
請求の範囲

- [1] 蛋白質の特定の活性を変化させるアミノ酸置換を有する変異蛋白質を設計する方法であって、蛋白質のアミノ酸を網羅的に置換した複数の変異蛋白質から構成される変異蛋白質ライブラリーを製造し、該変異蛋白質ライブラリーの各々の前記特性の活性の変化を測定し、所望の活性を有する蛋白質を選択することを含む、蛋白質の特定の活性を変化させるアミノ酸置換を有する変異蛋白質を設計する方法。
- [2] 蛋白質が酵素である請求項1記載の蛋白質の特定の活性を変化させるアミノ酸置換を有する変異蛋白質を設計する方法。
- [3] プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を促進又は抑制するアミノ酸置換を有するプリオン蛋白を設計する方法であって、プリオン蛋白のアミノ酸を網羅的に置換した複数の変異プリオン蛋白から構成される変異プリオン蛋白を得て、該変異プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を測定し、正常型から異常型への変換能が野生型プリオン蛋白に比較して促進又は抑制された変異プリオン蛋白を選択することを含む、プリオン蛋白の正常型から異常型への変換能を促進又は抑制するアミノ酸置換を有するプリオン蛋白を設計する方法。
- [4] プリオン蛋白がほ乳類のプリオン蛋白である請求項3記載の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [5] プリオン蛋白がヒト、ウシ、ヒツジ又はマウスプリオン蛋白である請求項4記載の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [6] プリオン蛋白のアミノ酸の網羅的な置換が、マウスプリオン蛋白を構成するコドン98～コドン177までのアミノ酸に対応するアミノ酸の野生型プリオン蛋白が有するアミノ酸以外の19種類のアミノ酸への置換である、請求項3～5のいずれか1項に記載の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [7] エピトープ・タグを導入したプリオン蛋白を用いる請求項3～6のいずれか1項に記載の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [8] 正常型から異常型への変換の促進又は抑制をウエスタンブロット法で測定する請求

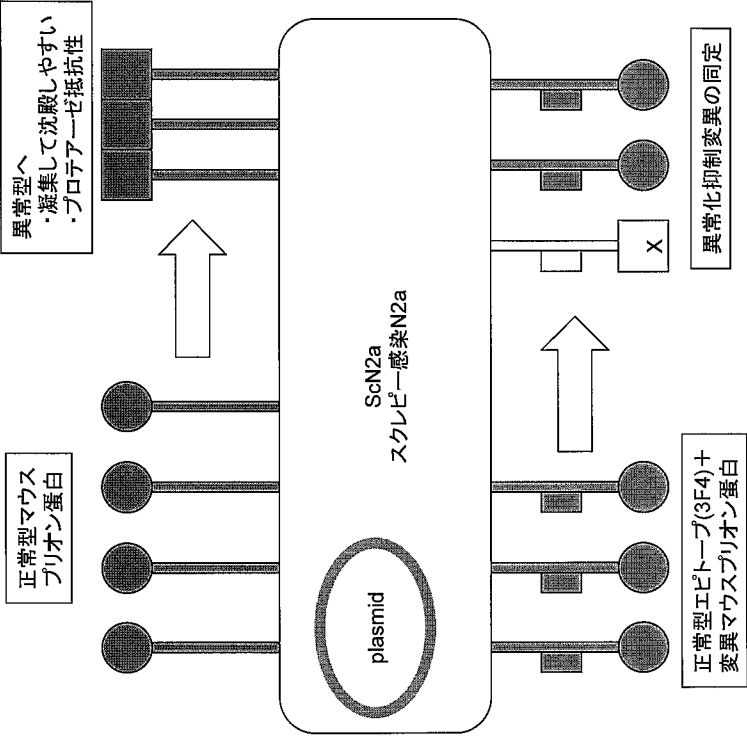
項3～7のいずれか1項に記載の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。

- [9] 正常型から異常型への変換の促進又は抑制をPMCA (protein misfolding cyclic amplification)法で測定する請求項3～8のいずれか1項に記載の正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を設計する方法。
- [10] 請求項3～9のいずれか1項に記載の方法により設計された、マウスプリオン蛋白を構成するコドンのコドン100～121に対応するアミノ酸の少なくとも1つが置換された正常型から異常型への変換能が促進された変異プリオン蛋白。
- [11] 請求項3～9のいずれか1項に記載の方法により設計された、マウスプリオン蛋白を構成するコドン114及び／又はコドン177に対応するアミノ酸が置換された正常型から異常型への変換能が抑制された変異プリオン蛋白。
- [12] マウス変異プリオン蛋白K100R (コドン100のK (リジン) をR (アルギニン) に置換したことを意味する。以下、同じ)、P104T、P104V、K109L、K109M、A115D、A115N、A115Q、A115S、A116V、A117N、A117V、G118Y、V121G又はV121Iである請求項10記載の変異プリオン蛋白。
- [13] ヒト、ウシ又はヒツジの変異プリオン蛋白であって、マウスプリオン蛋白のK100R (コドン100のKをRに置換したことを意味する。以下、同じ)、P104T、P104V、K109L、K109M、A115D、A115N、A115Q、A115S、A116V、A117N、A117V、G118Y、V121G又はV121Iに対応するアミノ酸置換を有する変異プリオン蛋白。
- [14] 請求項3～13のいずれか1項に記載の方法で設計された正常型から異常型への変換能が促進又は抑制された変異プリオン蛋白を用いて生体試料中の異常型プリオン蛋白を検出する方法であって、生体試料中の異常型プリオン蛋白により正常型変異プリオン蛋白が異常型に変換される方法。
- [15] 変異プリオン蛋白をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いたin vivoでのバイオアッセイにより異常型プリオン蛋白を検出する請求項14記載の生体試料中の異常型プリオン蛋白を検出する方法。
- [16] PMCA (protein misfolding cyclic amplification)法で異常型プリオン蛋白を検出する請求項14記載の生体試料中の異常型プリオン蛋白を検出する方法。

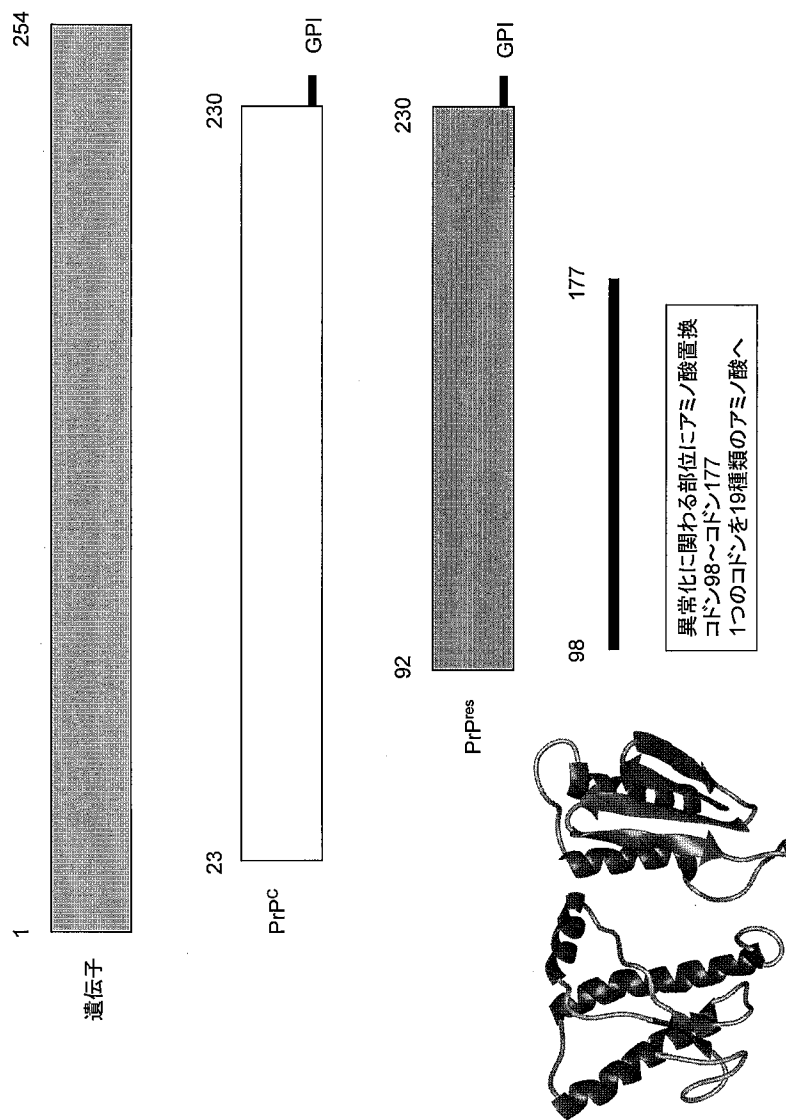
[図1]



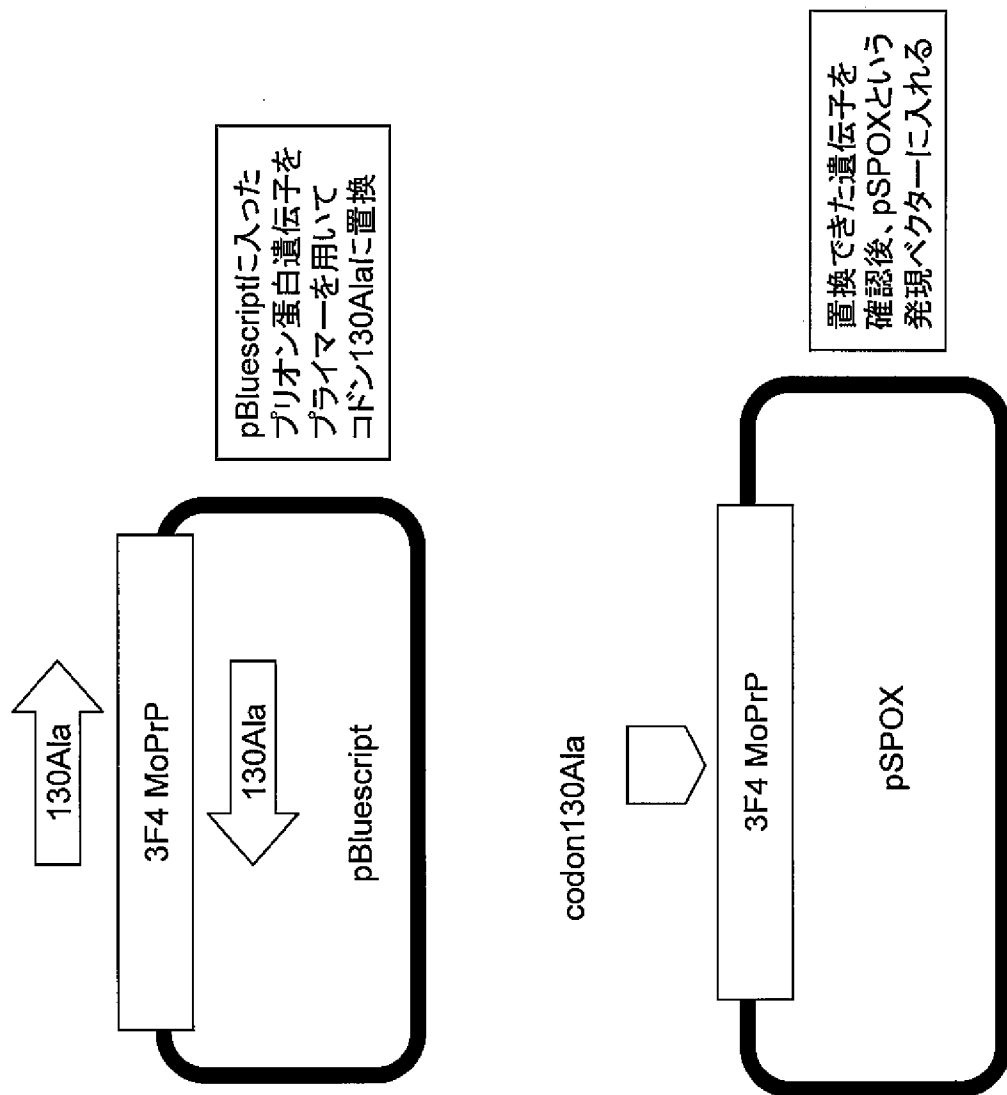
[図2]



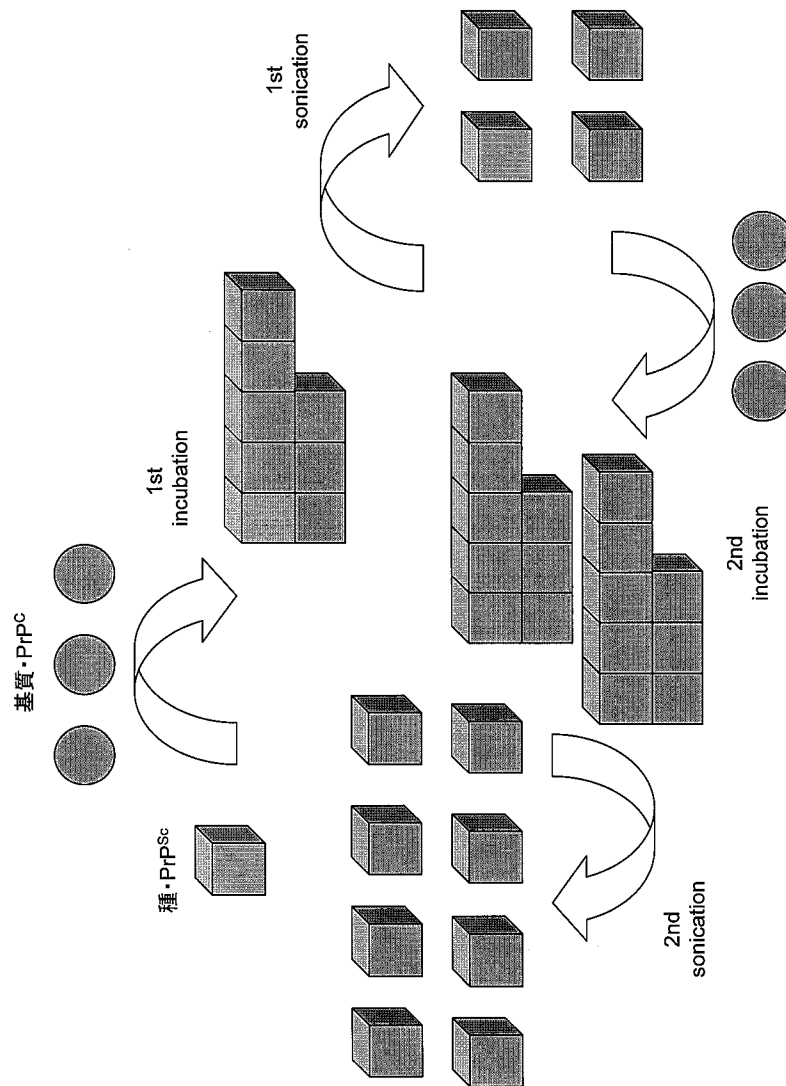
[図3]



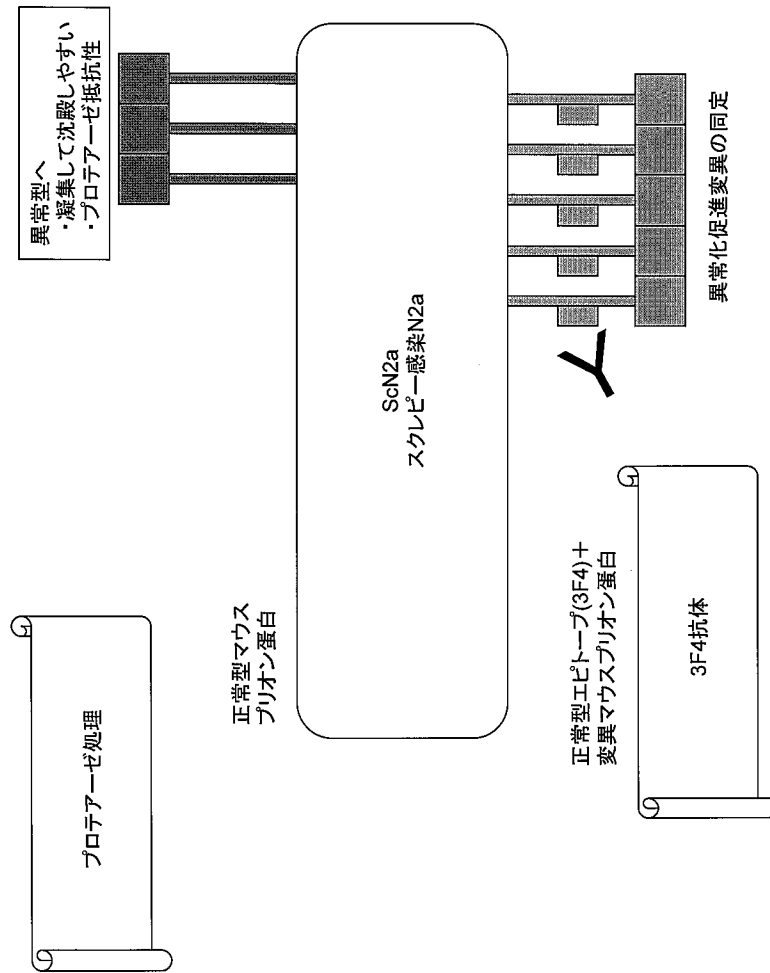
[図4]



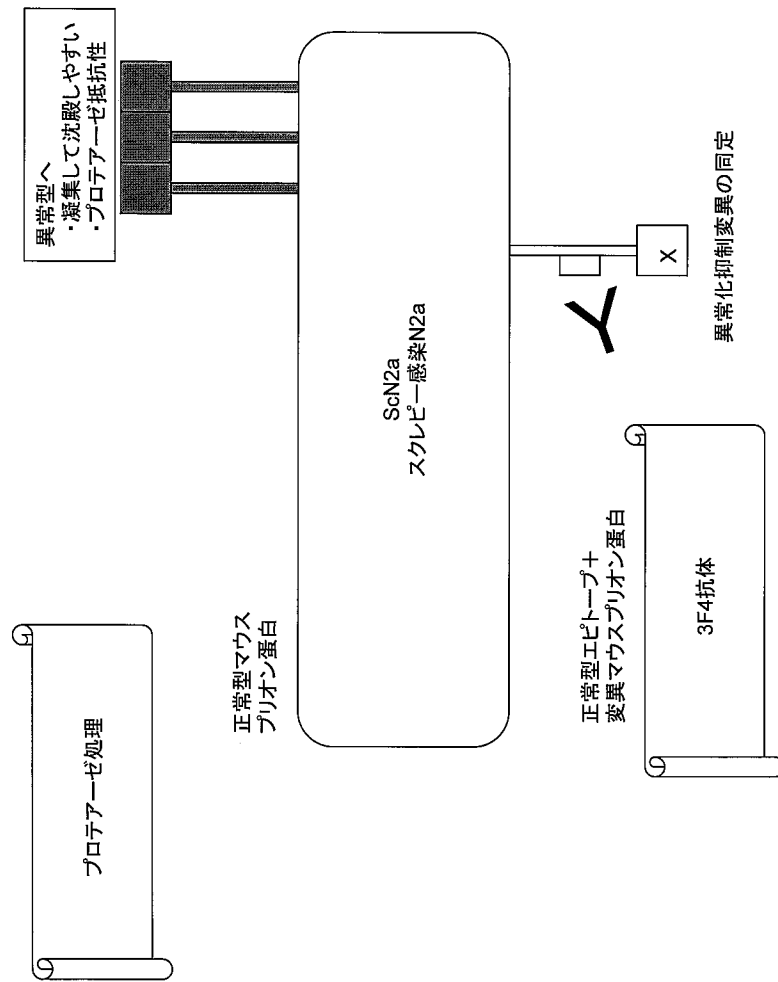
[図5]



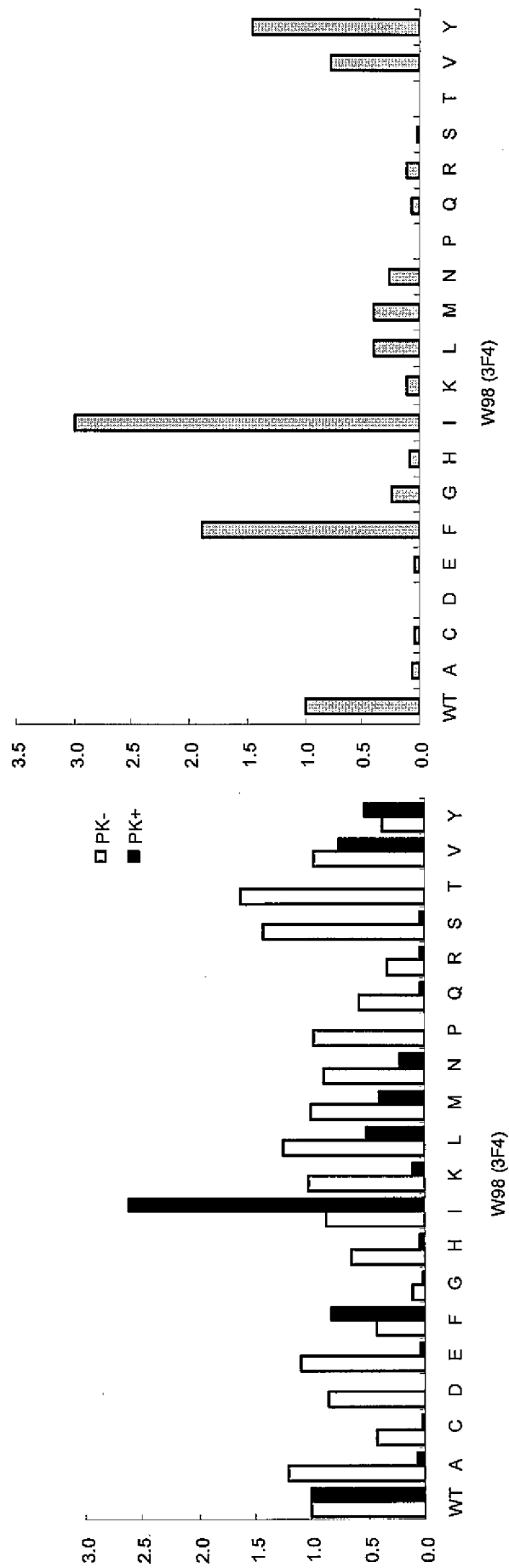
[図6]



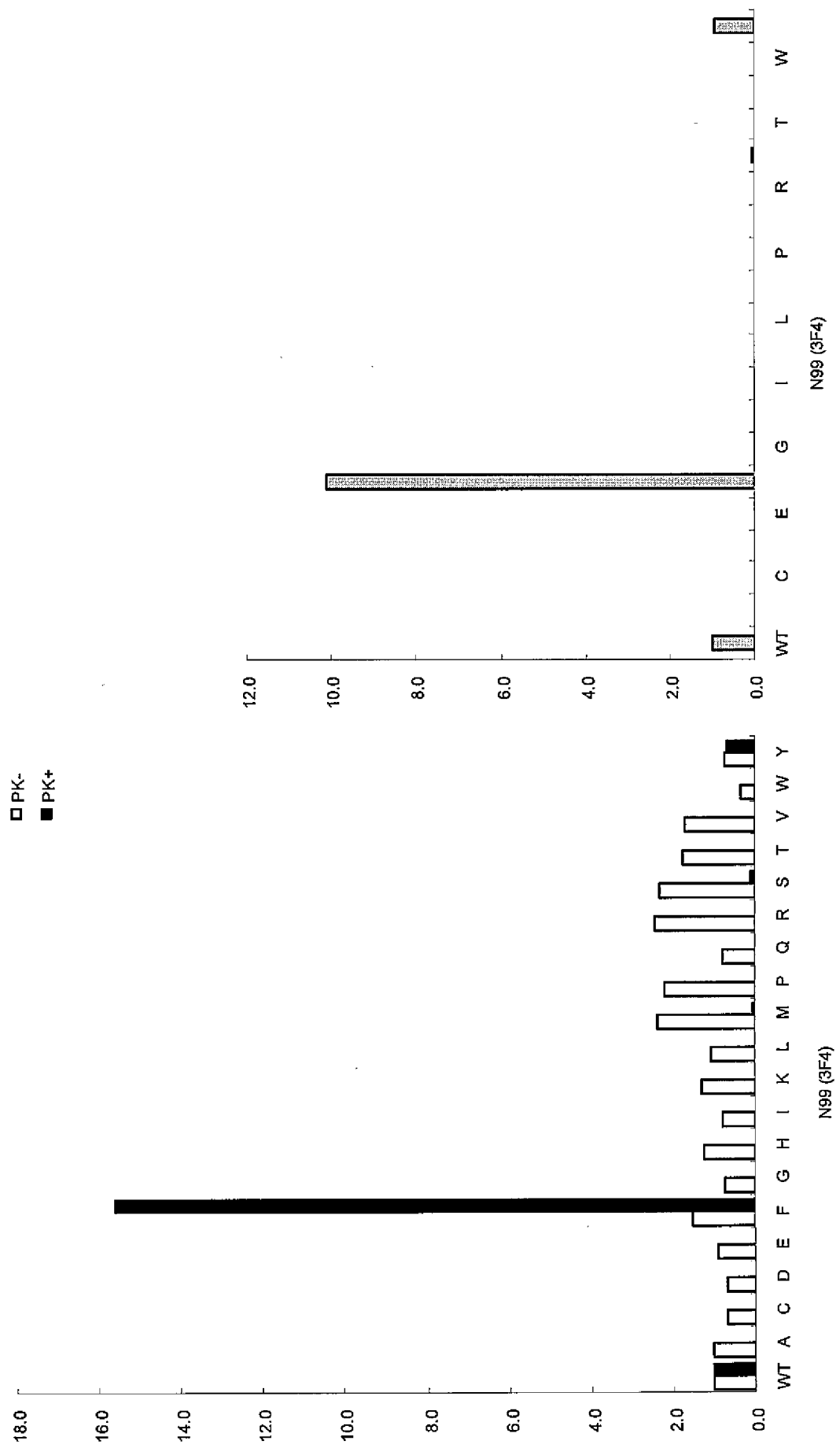
[図7]



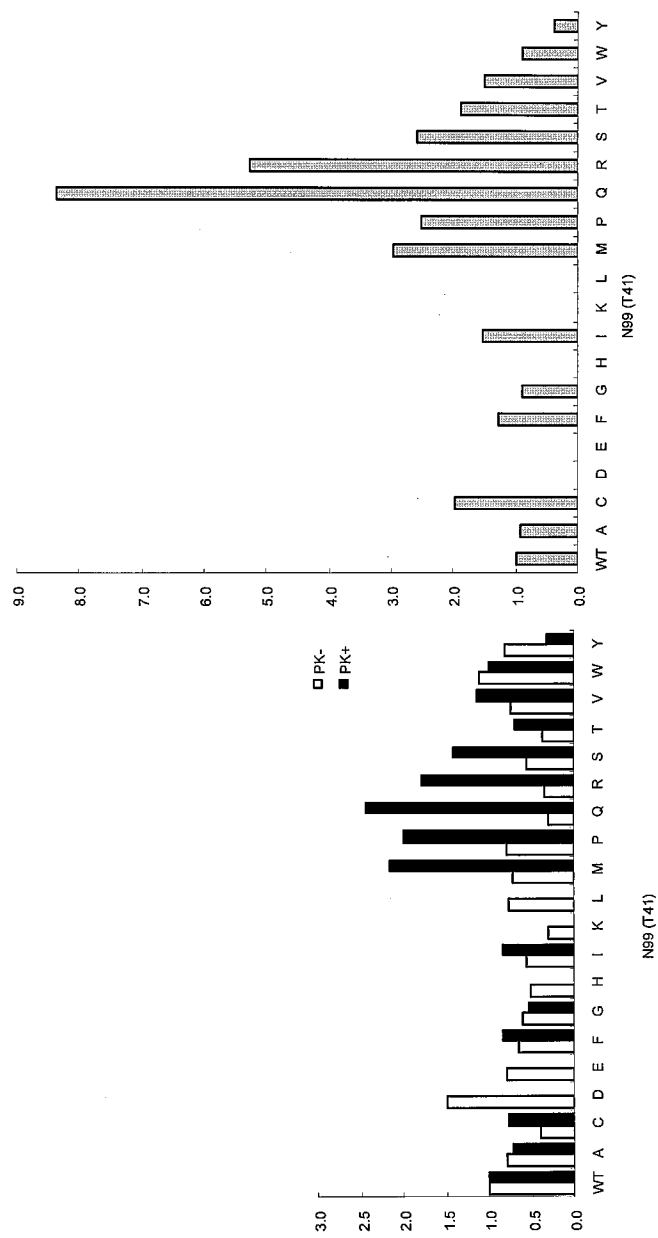
[図8]



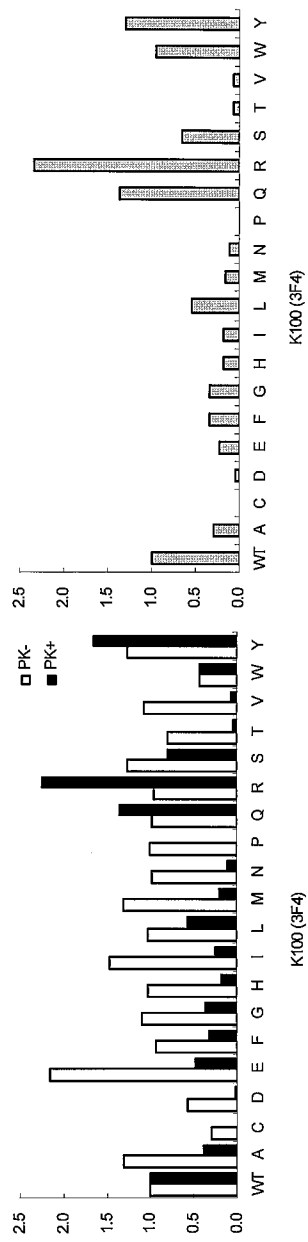
[図9]



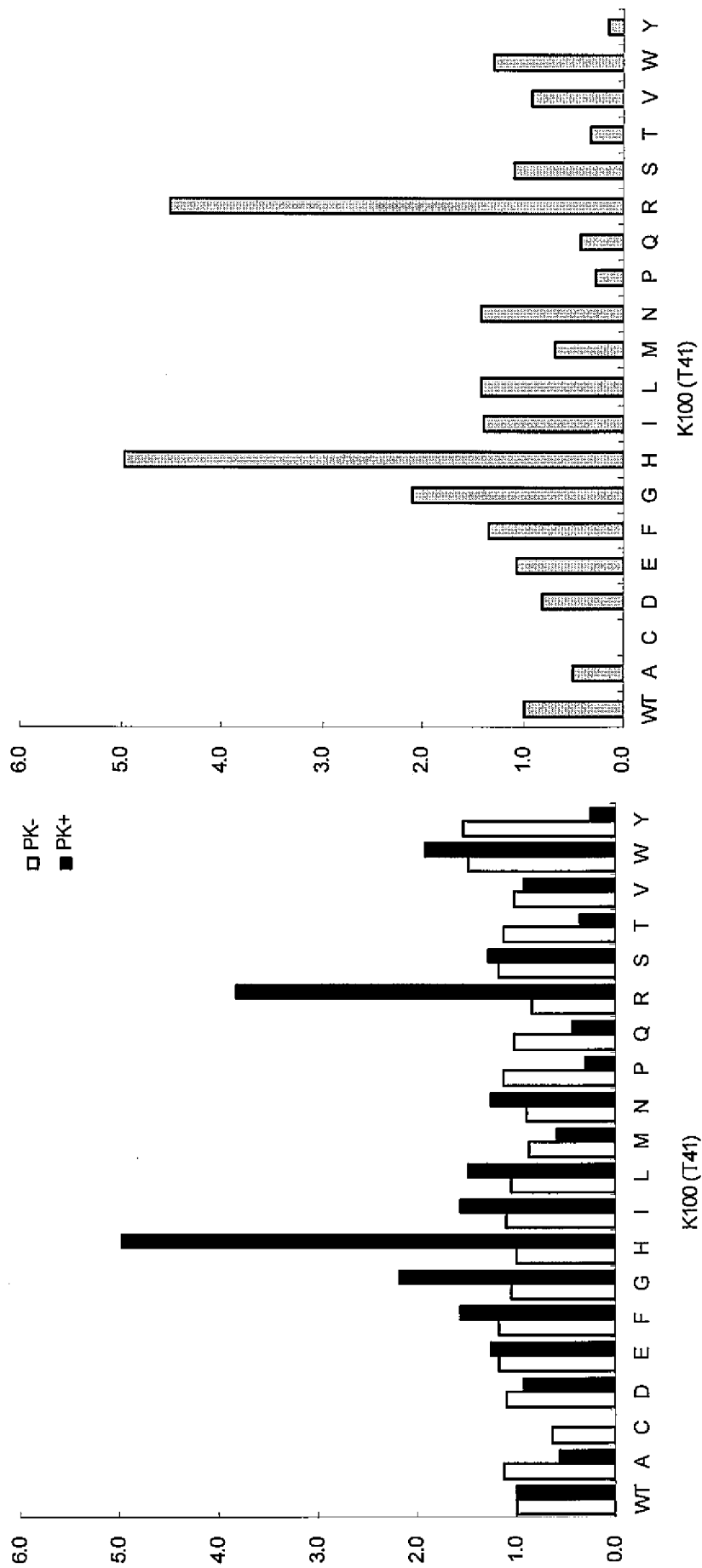
[図10]



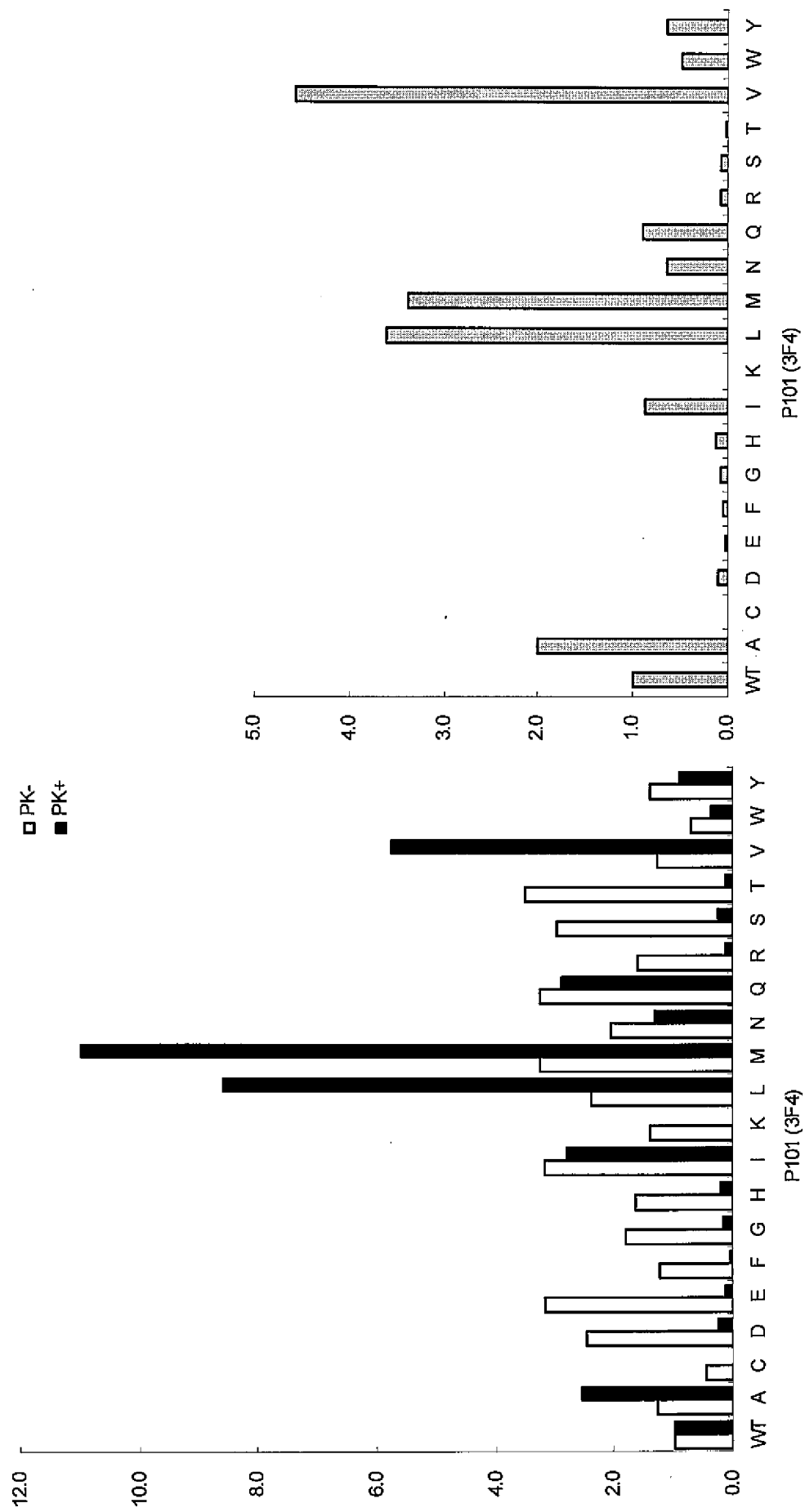
[図11]



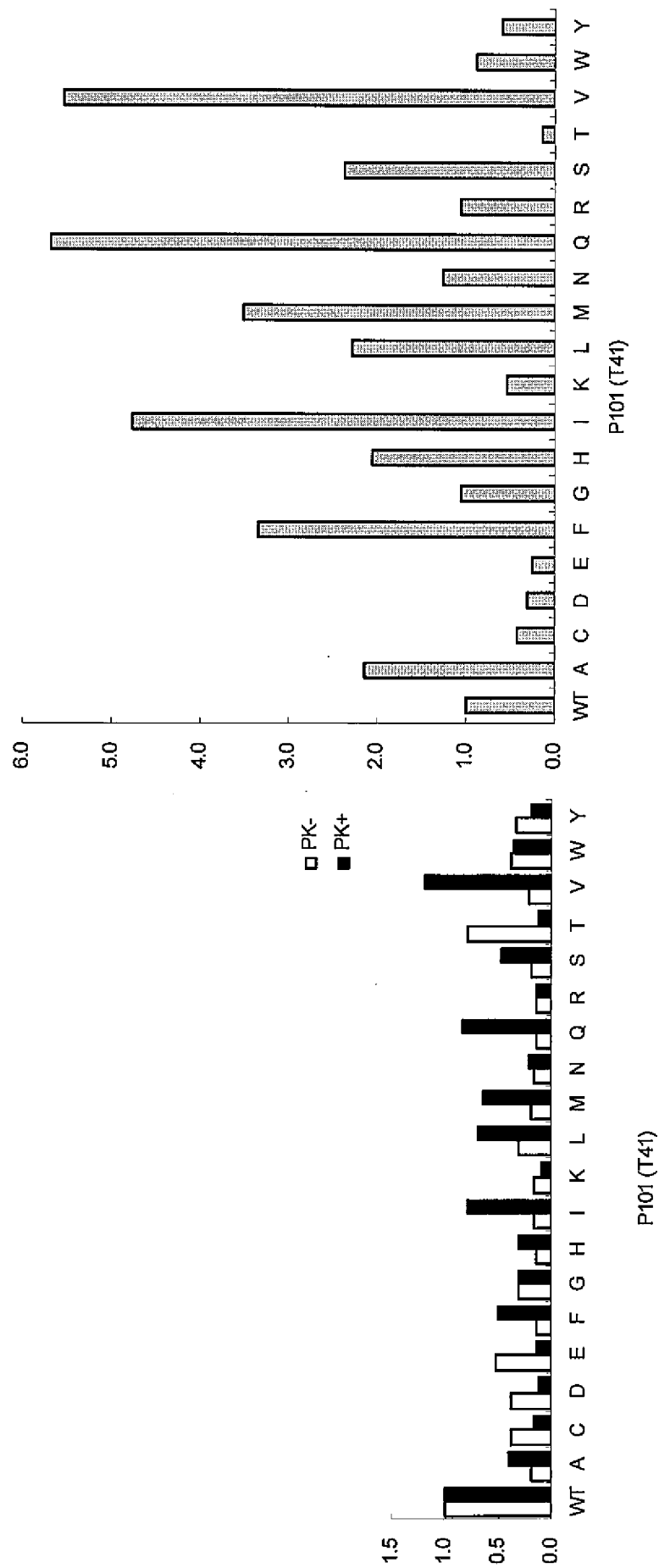
[図12]



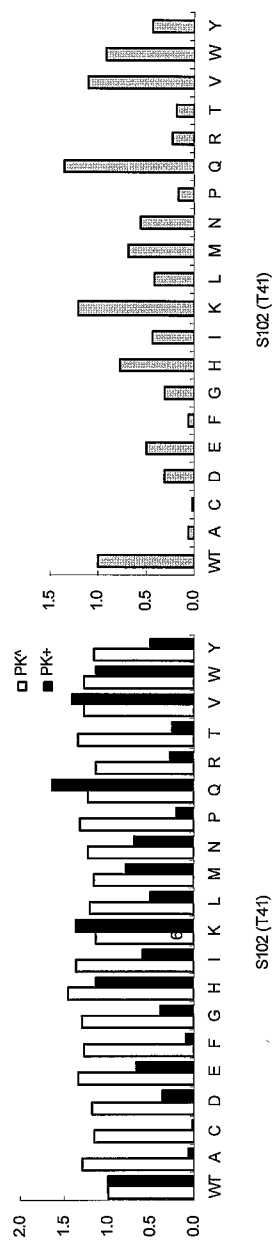
[図13]



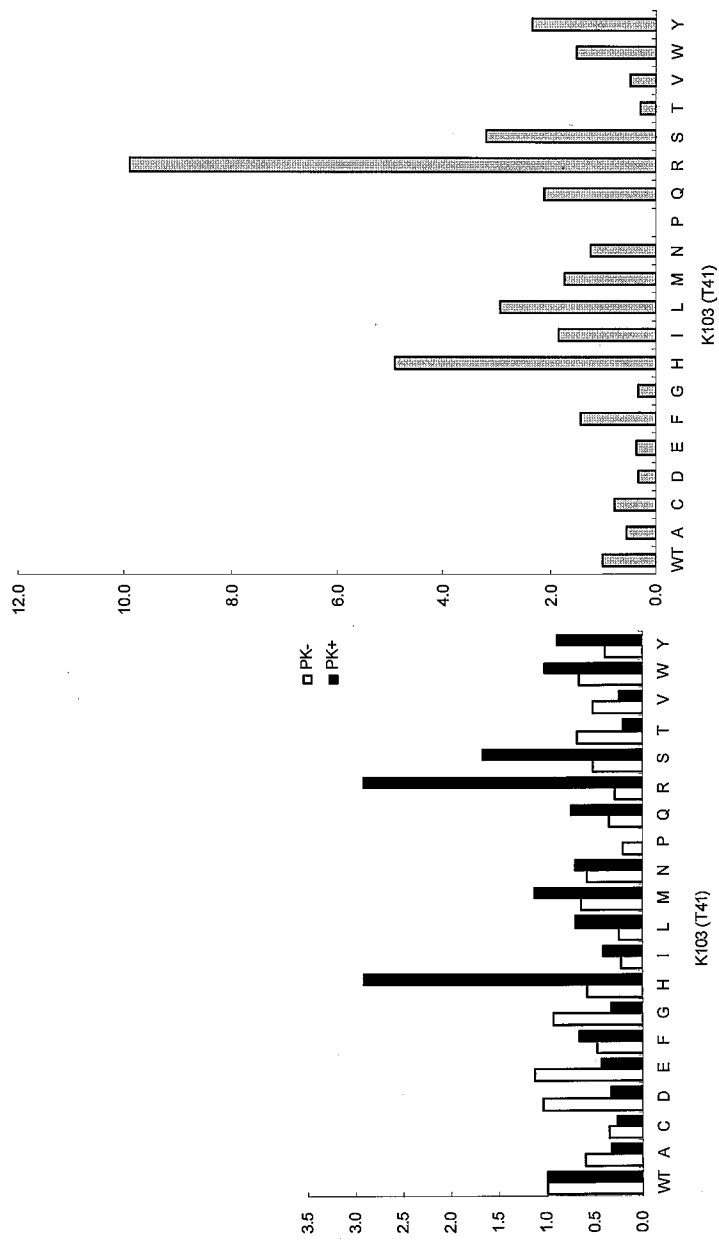
[図14]



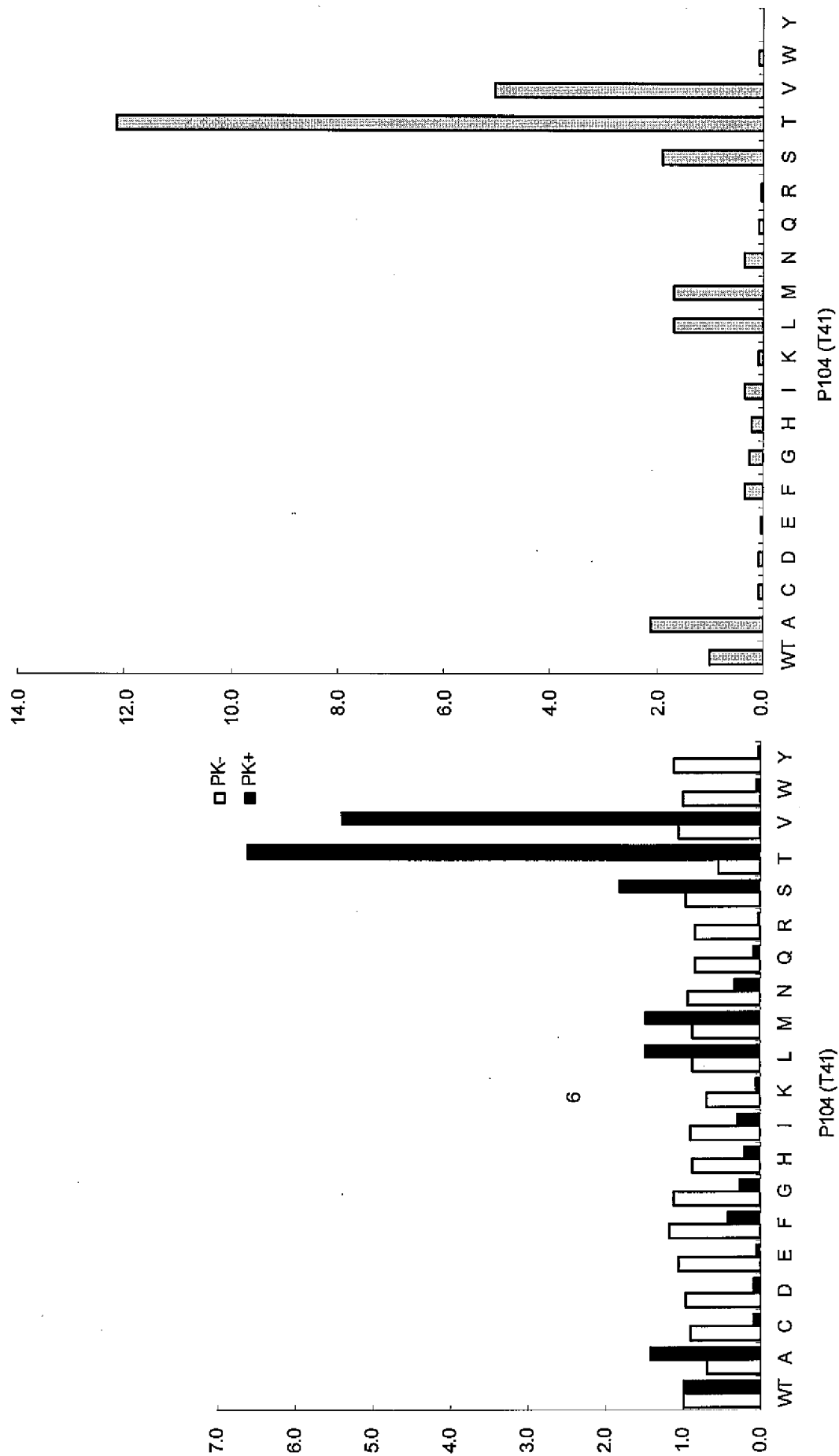
[図15]



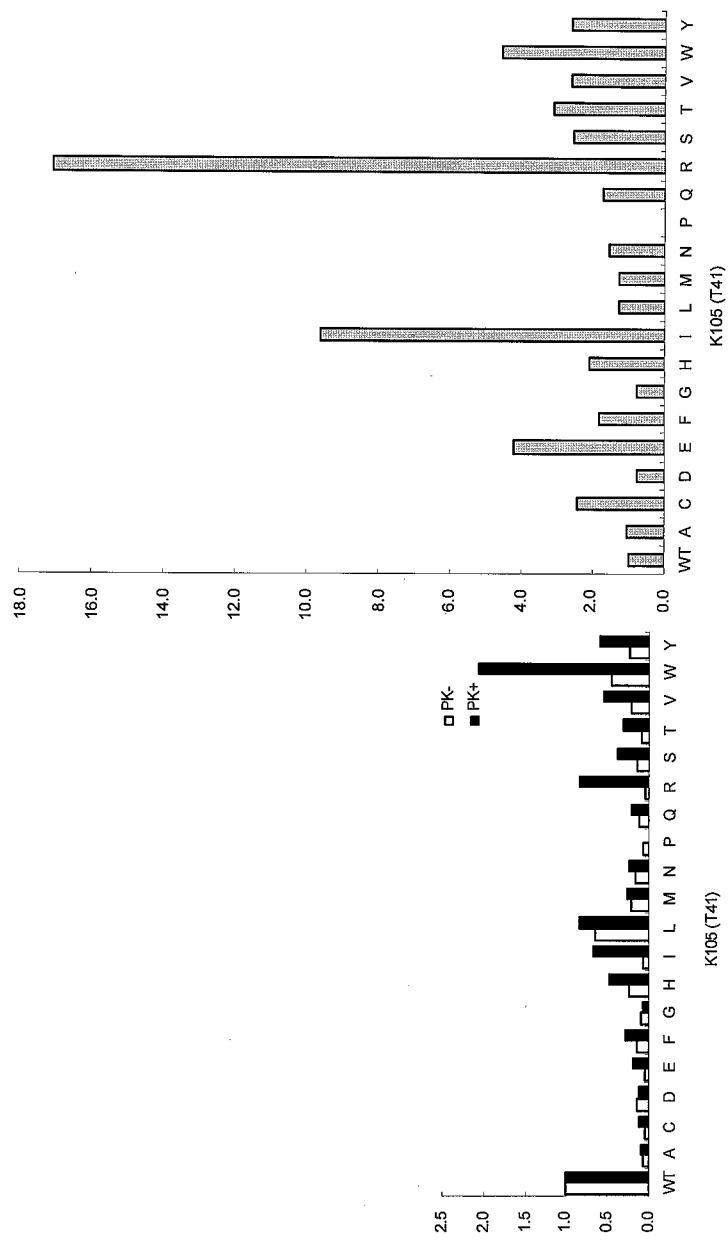
[図16]



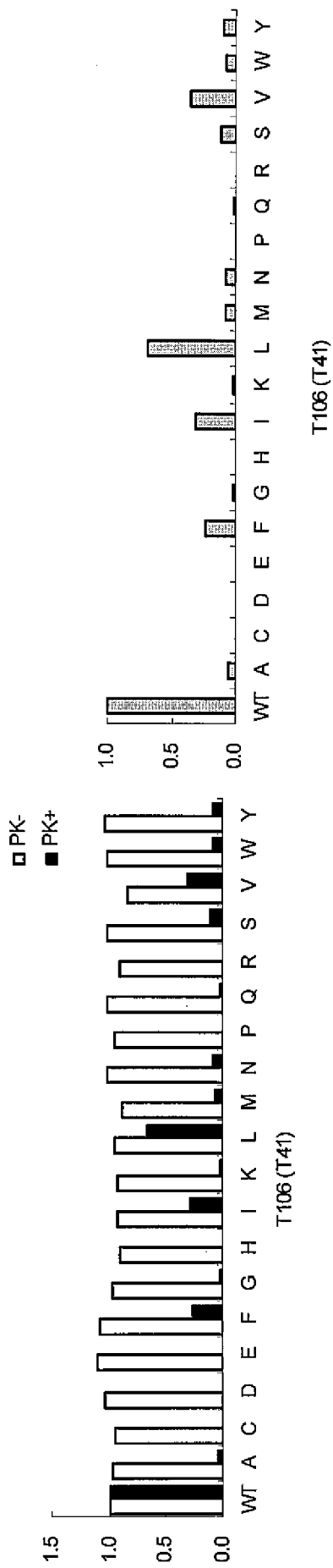
[図17]



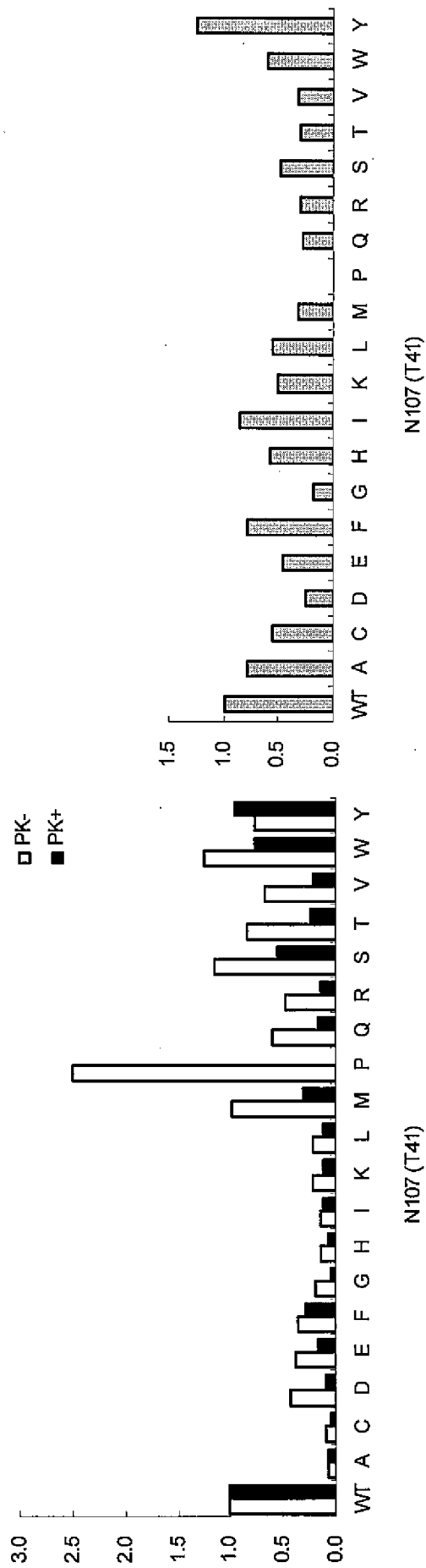
[図18]



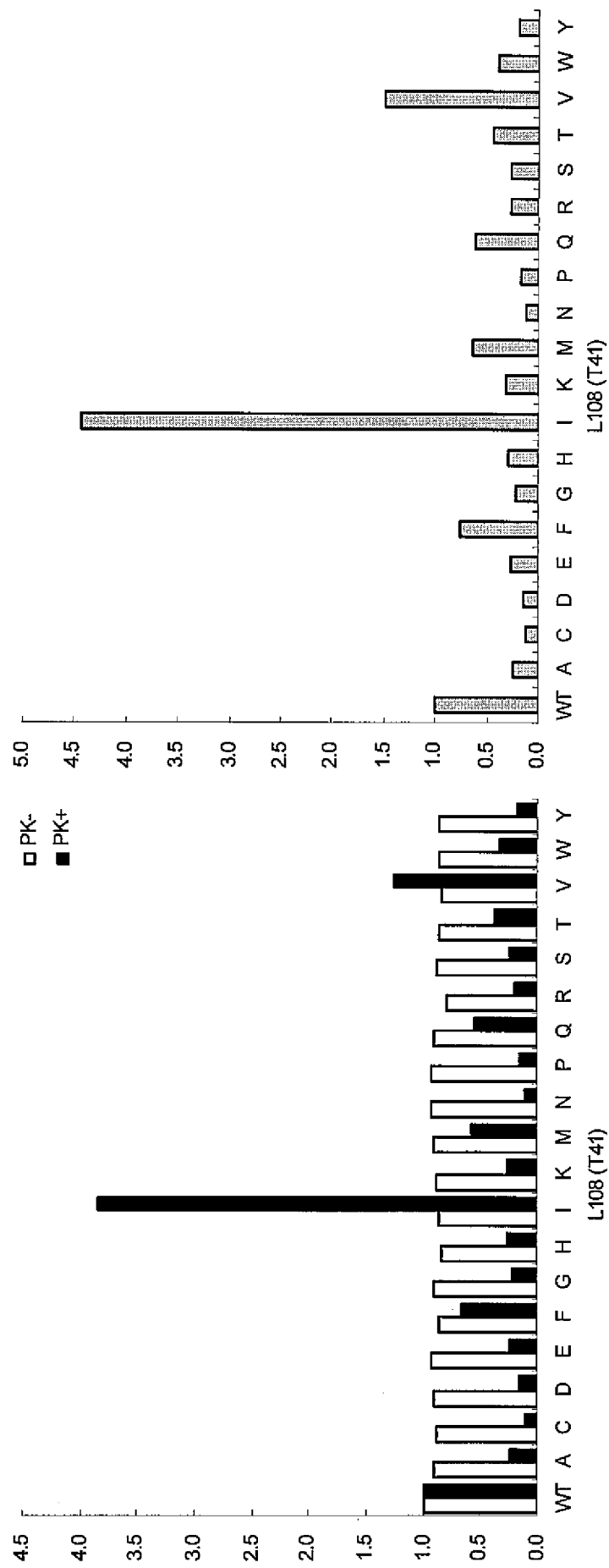
[図19]



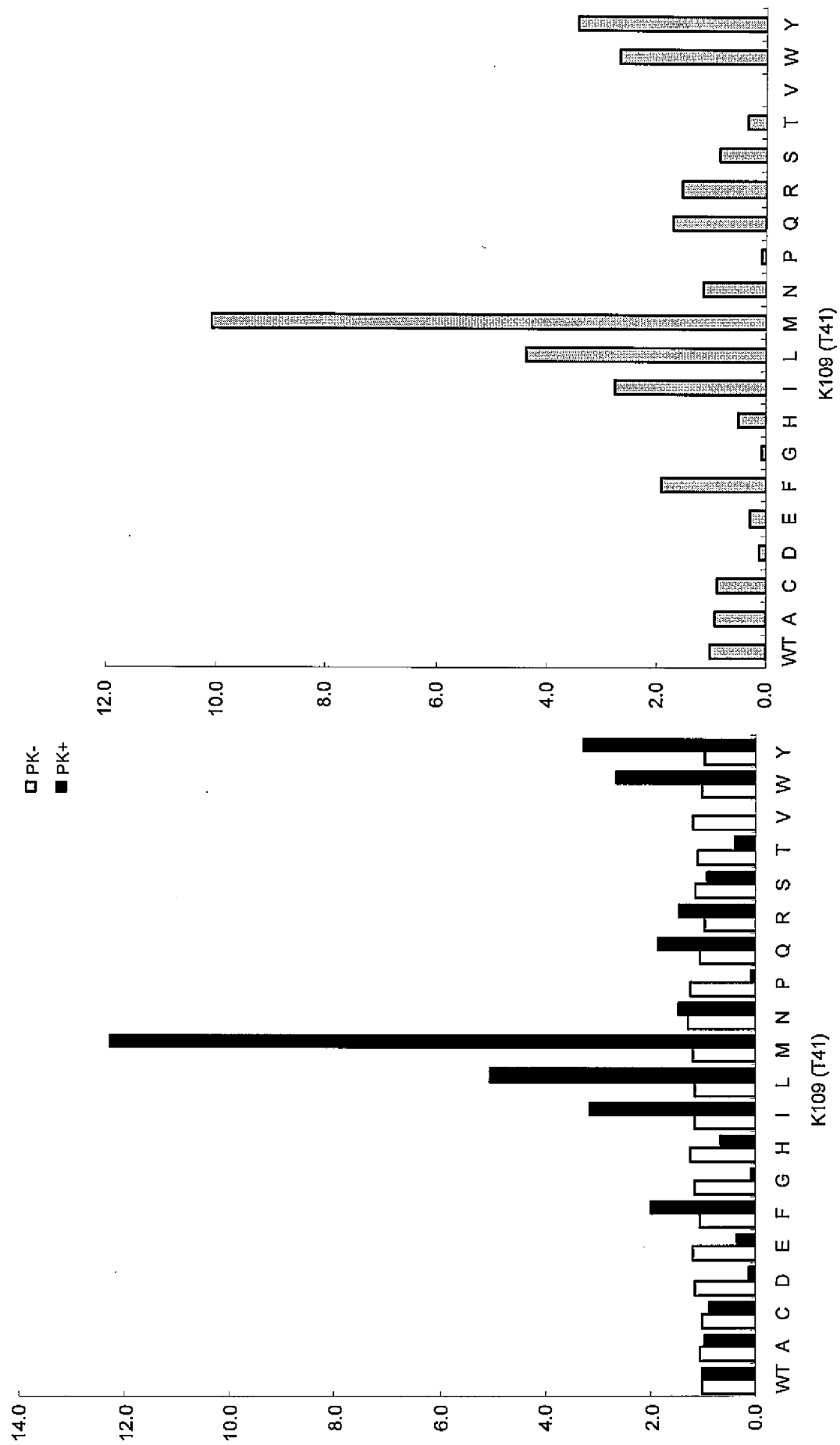
[図20]



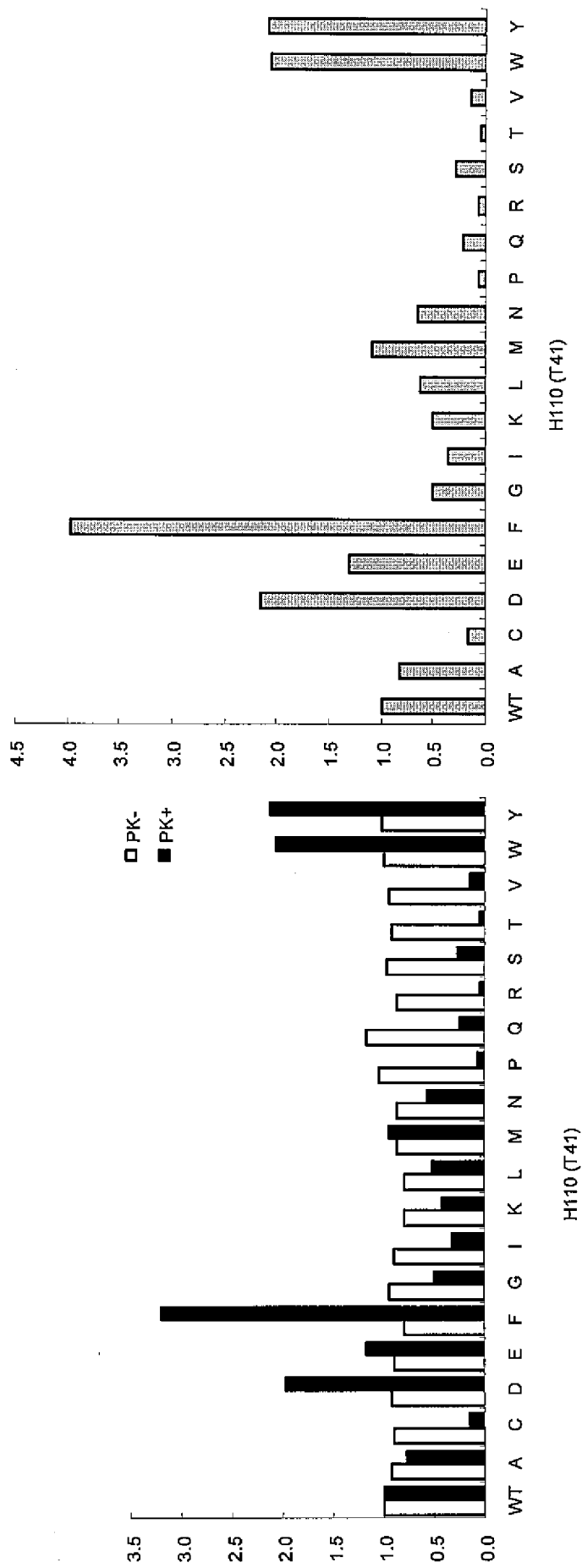
[図21]



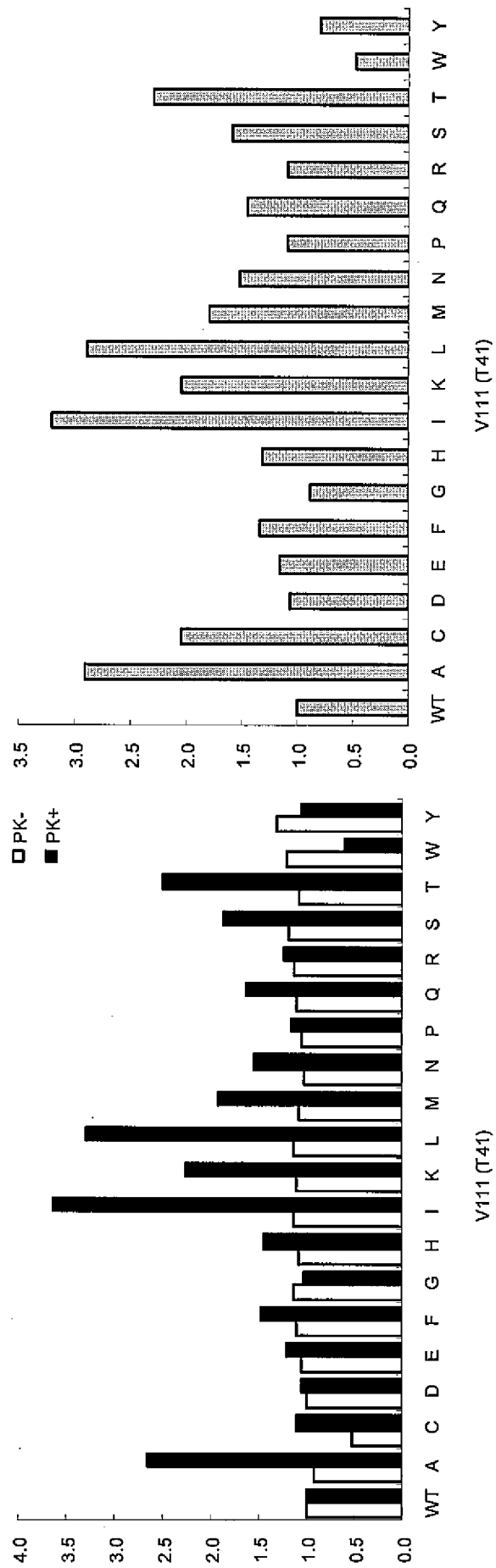
[図22]



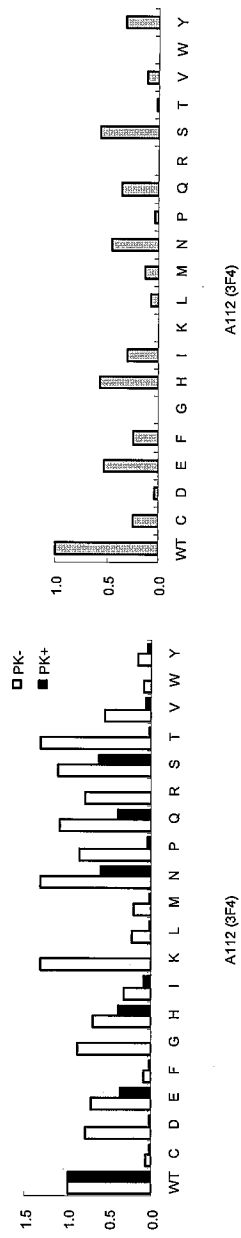
[図23]



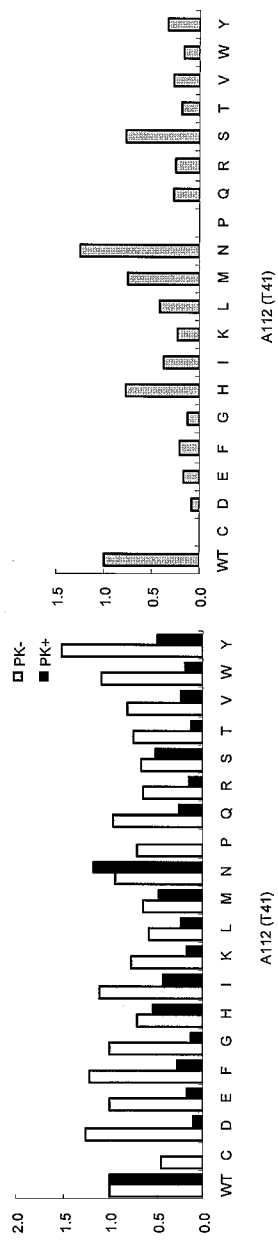
[図24]



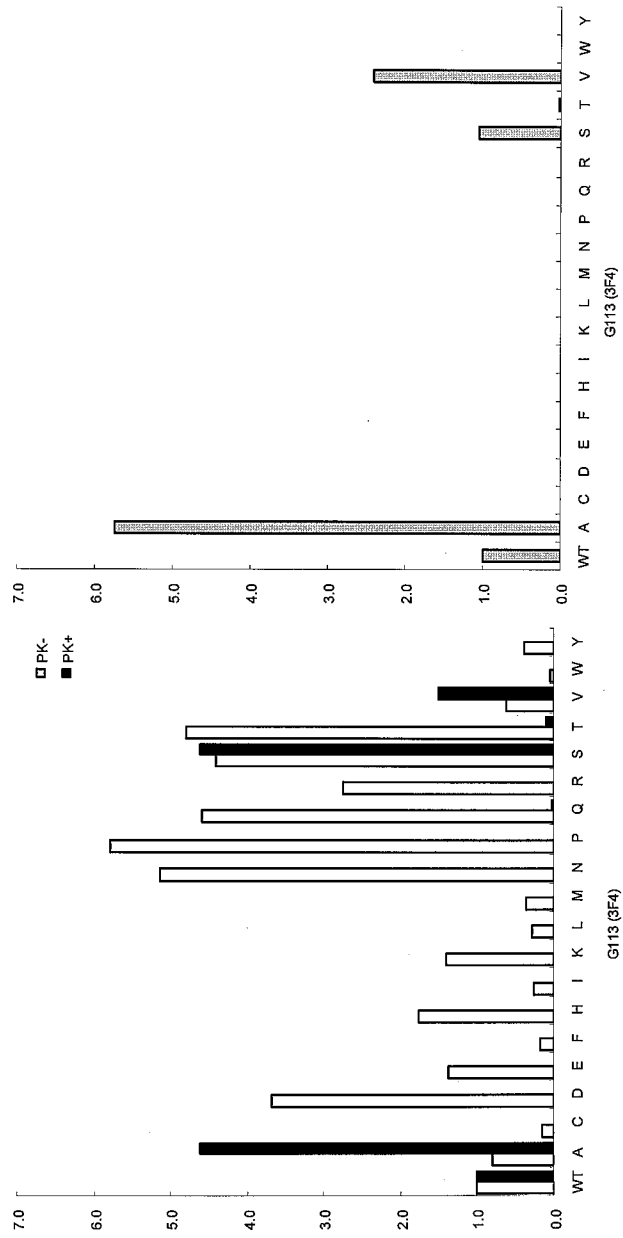
[図25]



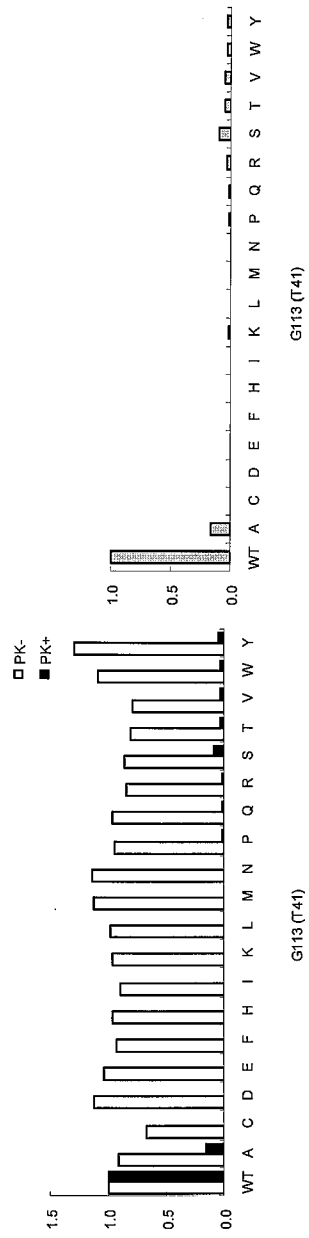
[図26]



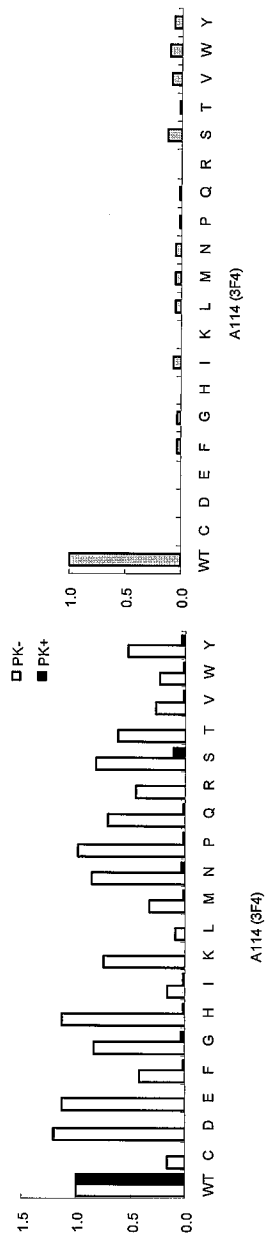
[図27]



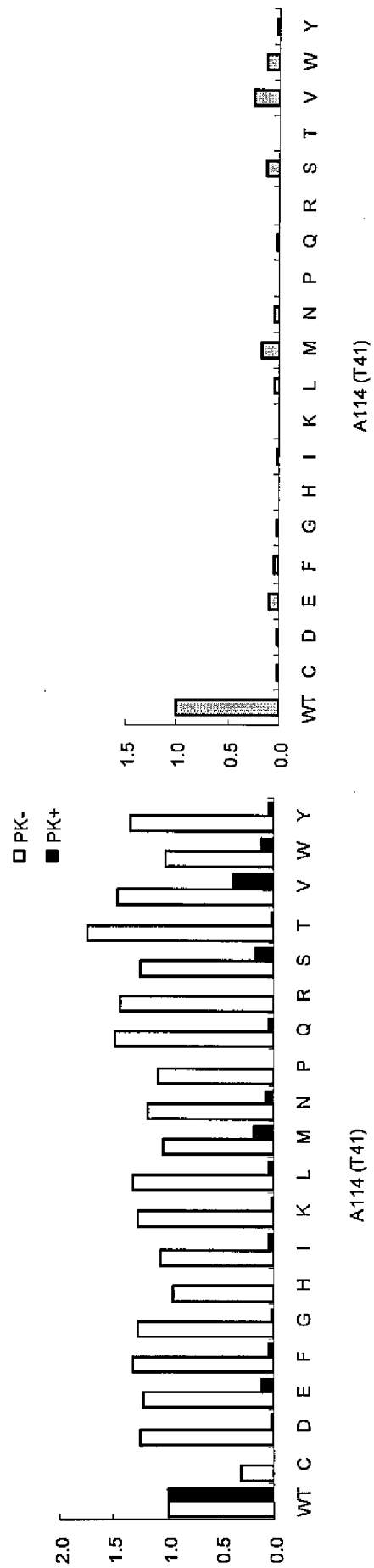
[図28]



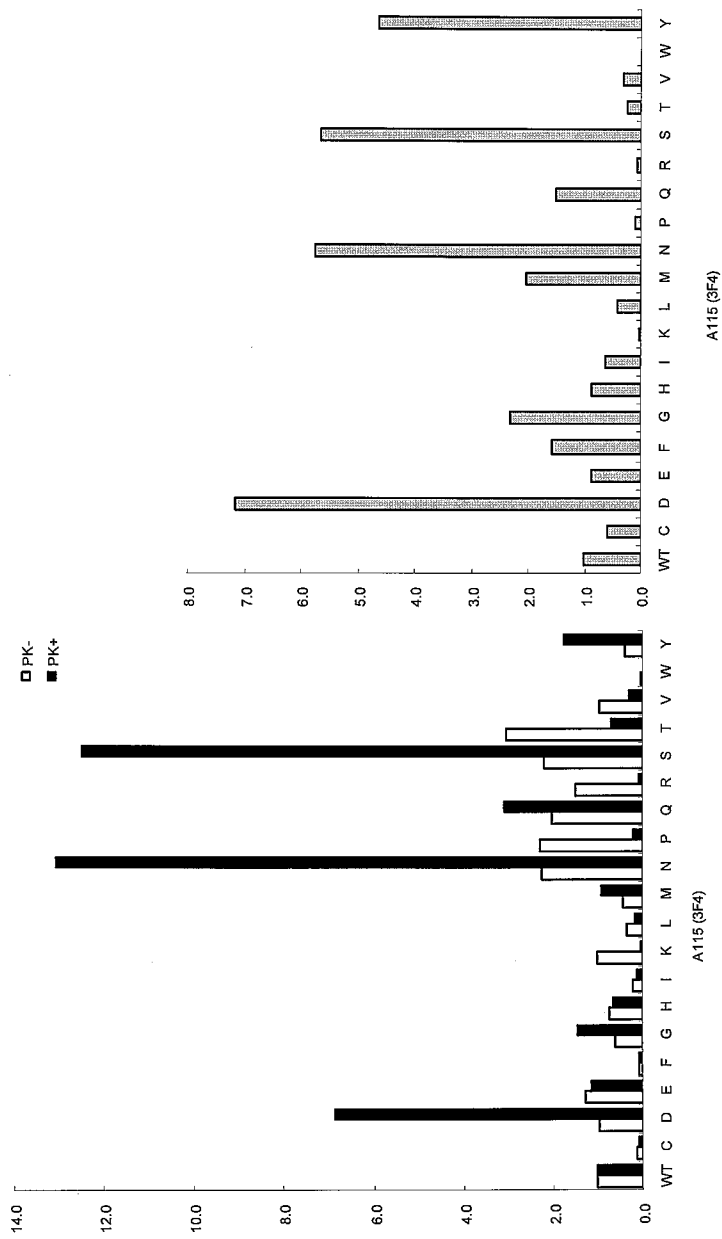
[図29]



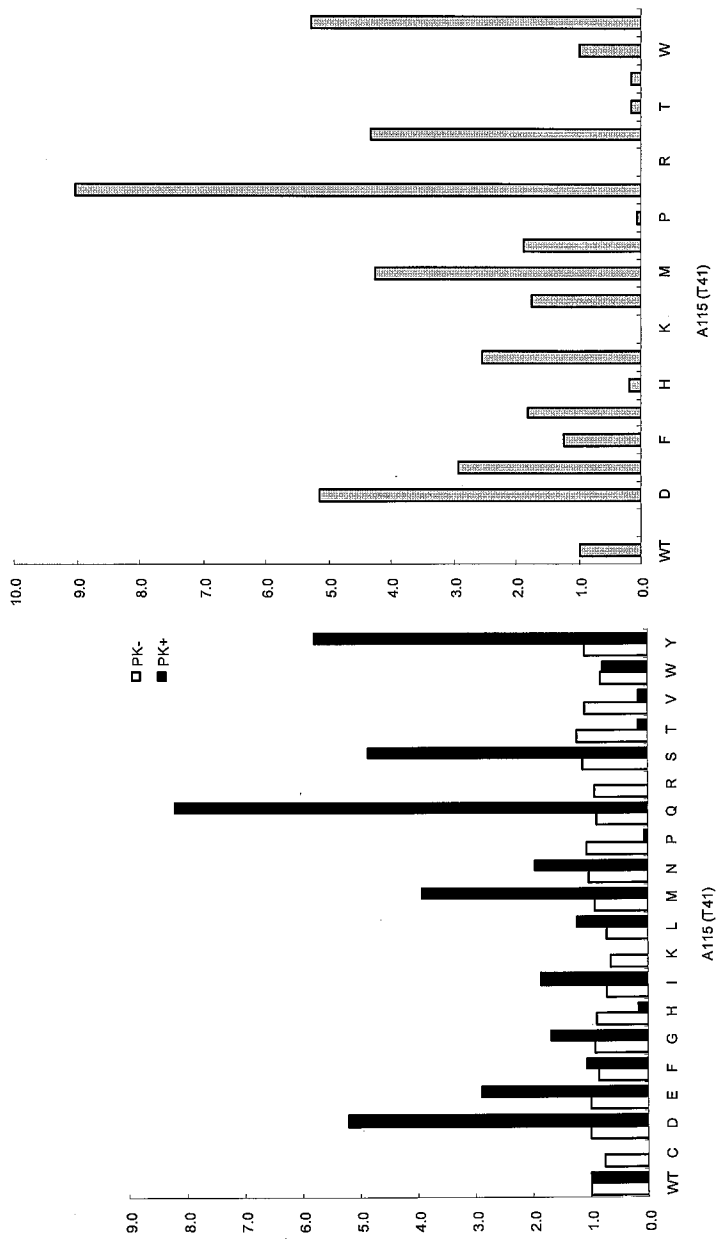
[図30]



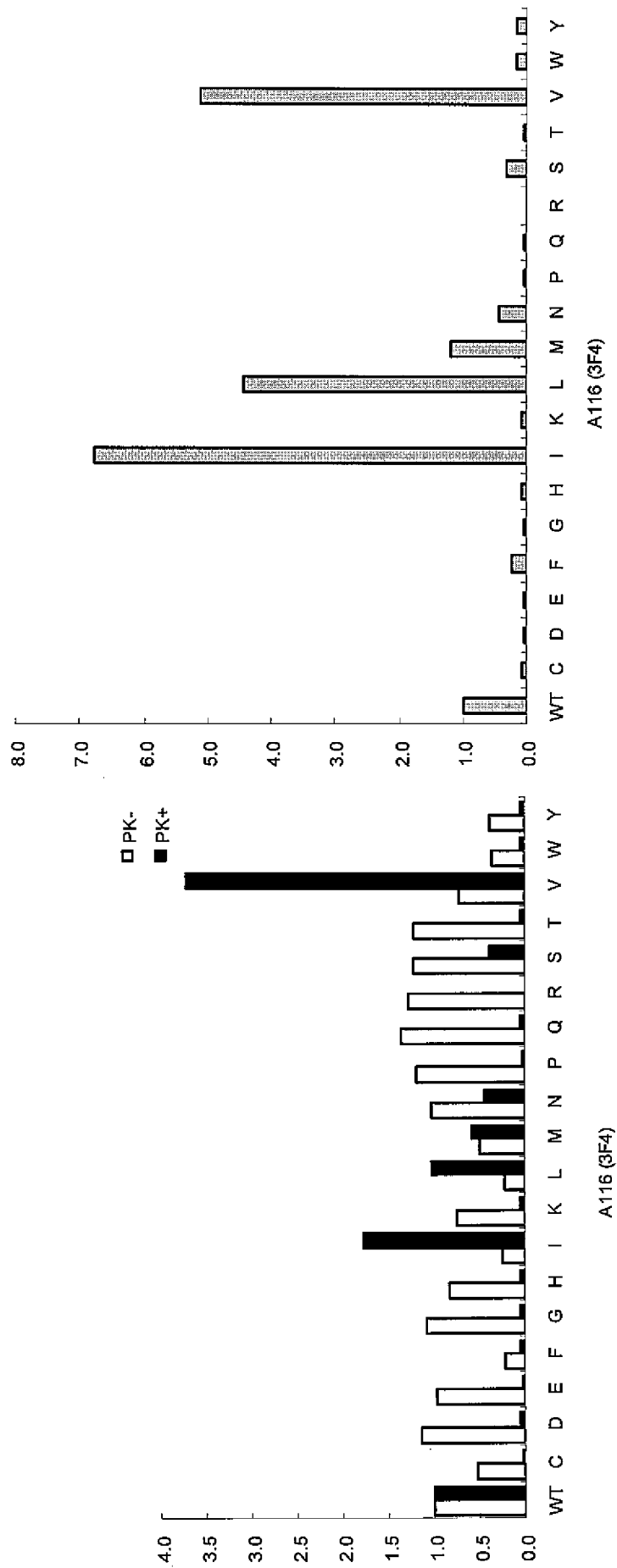
[図31]



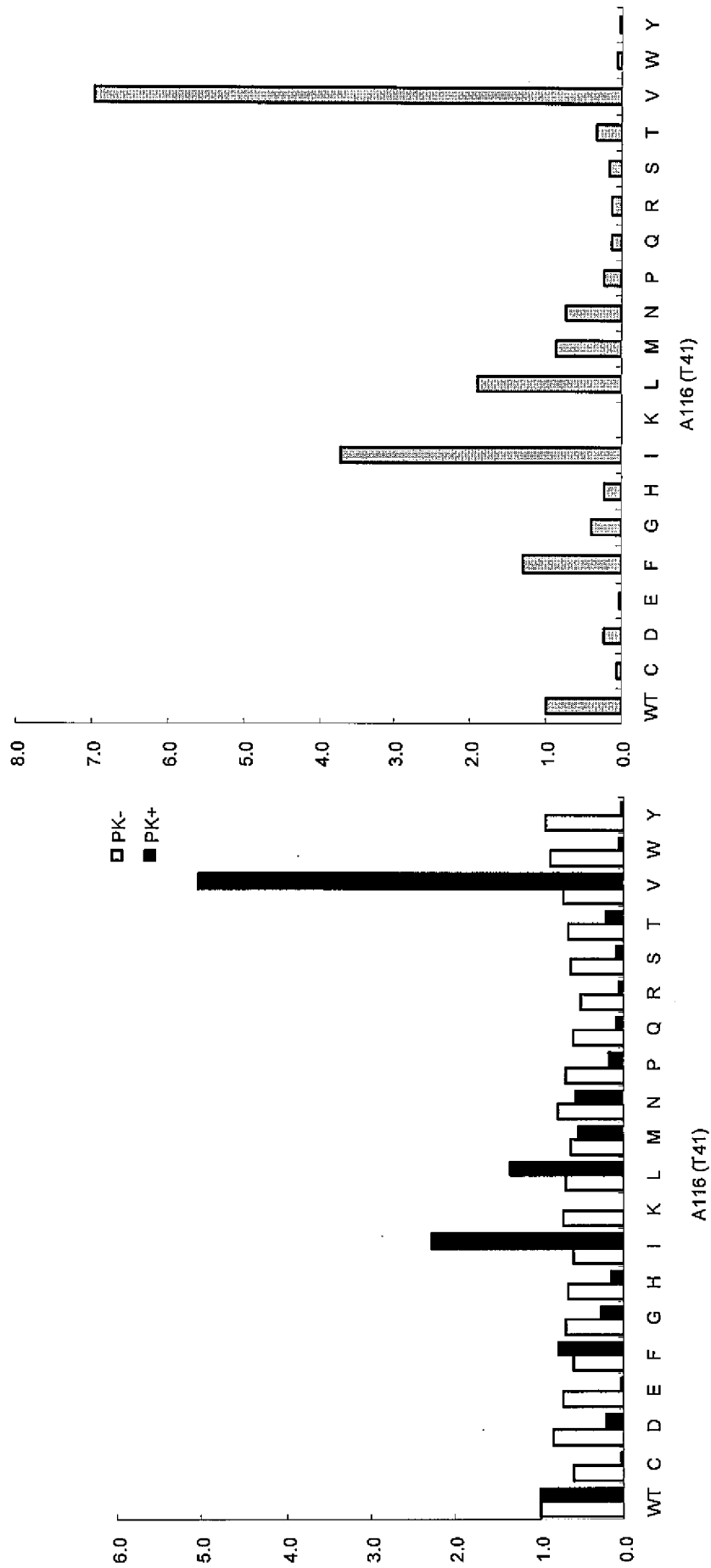
[図32]



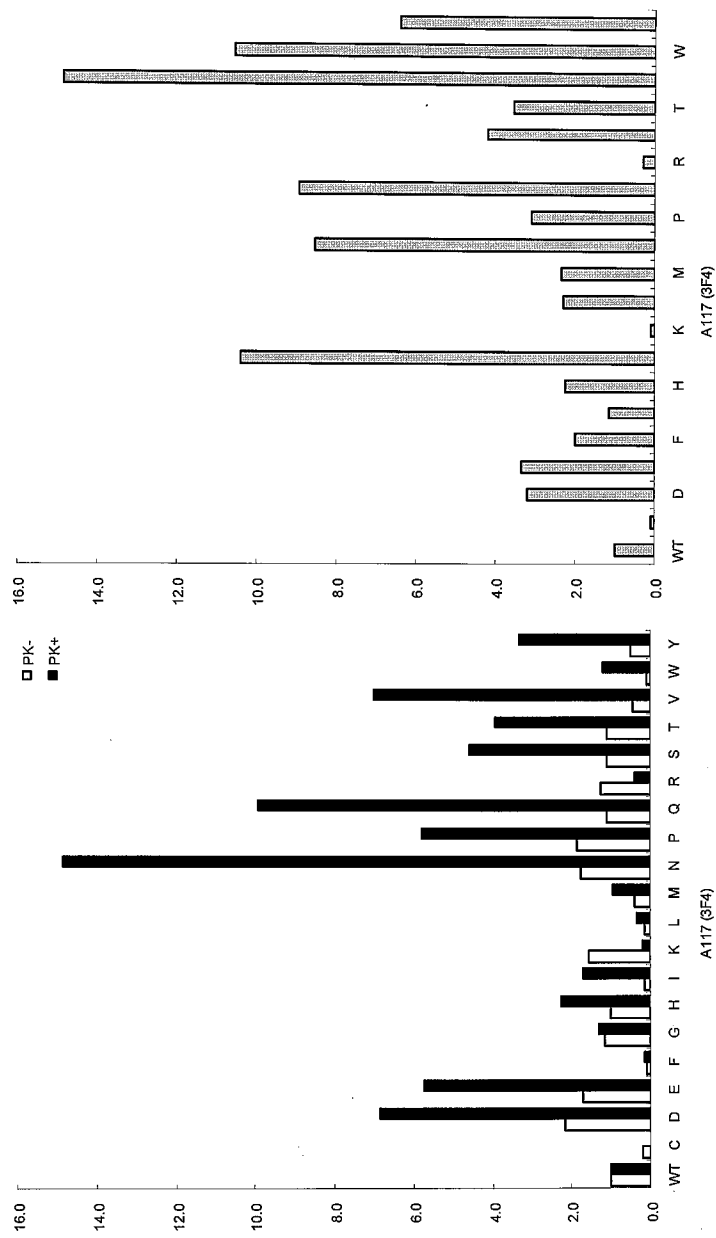
[図33]



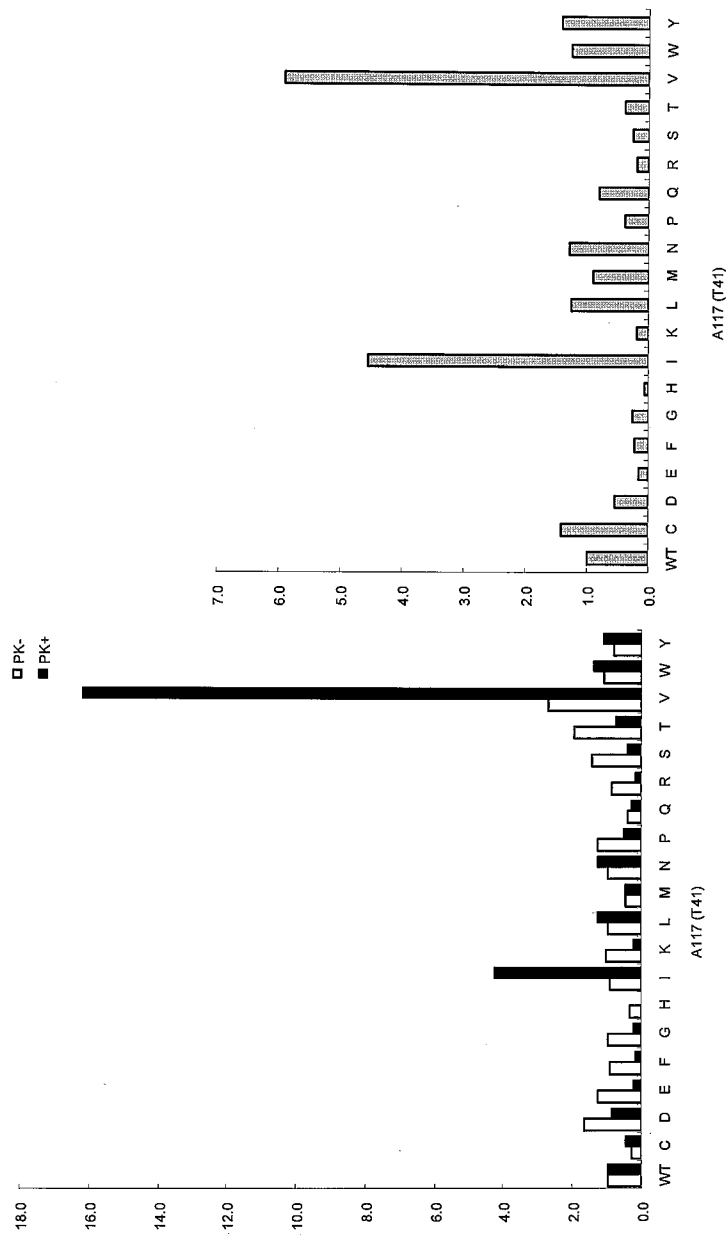
[図34]



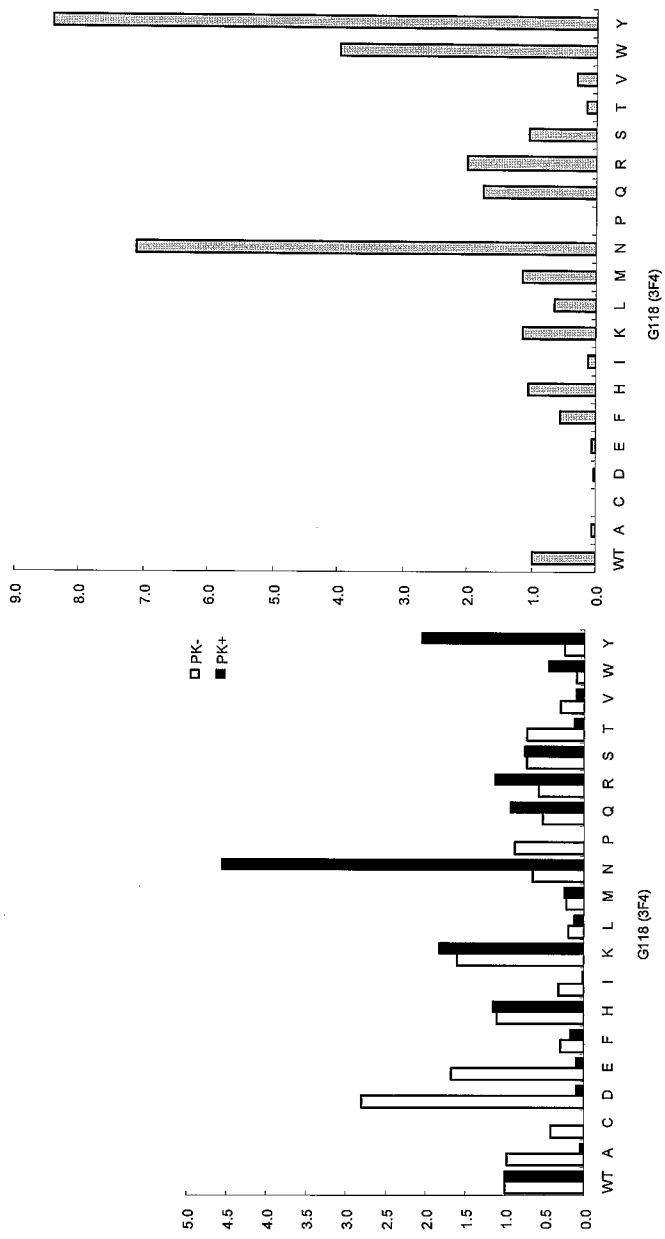
[図35]



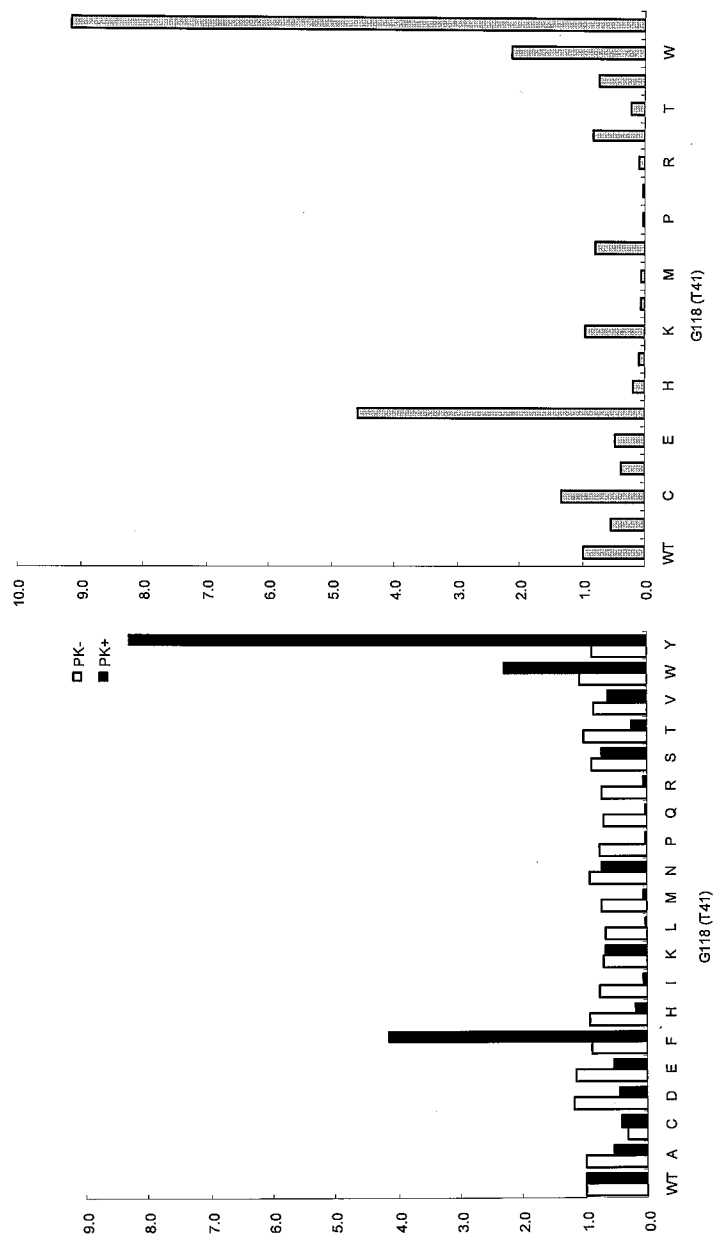
[図36]



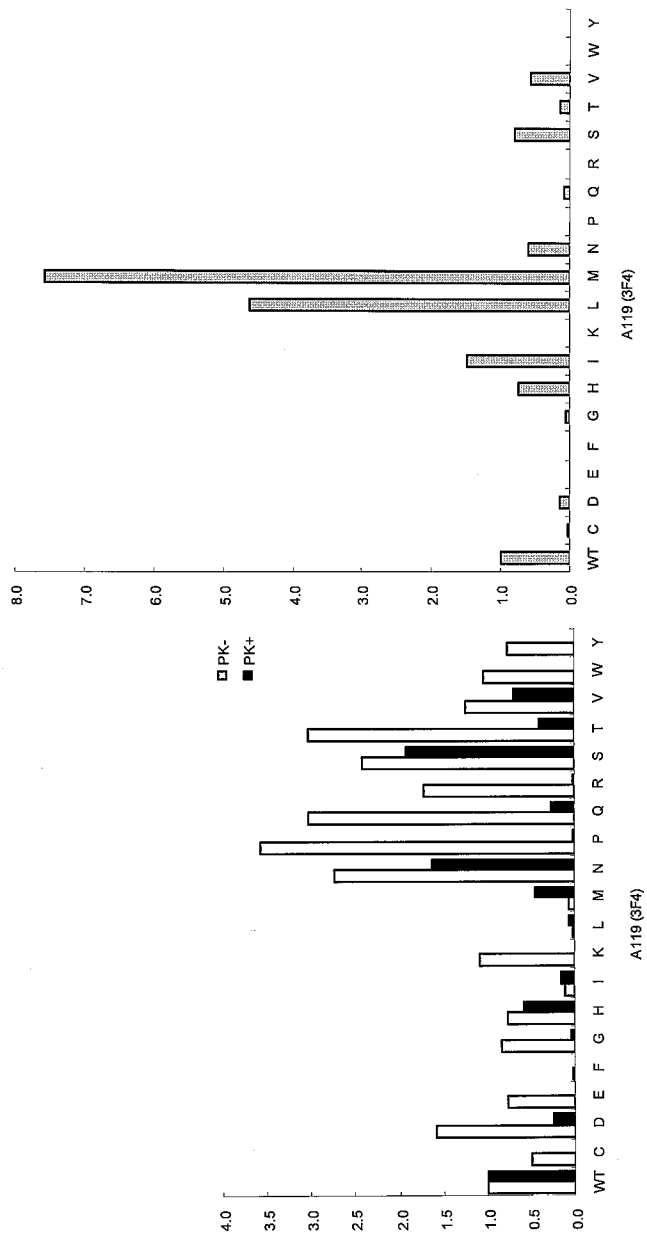
[図37]



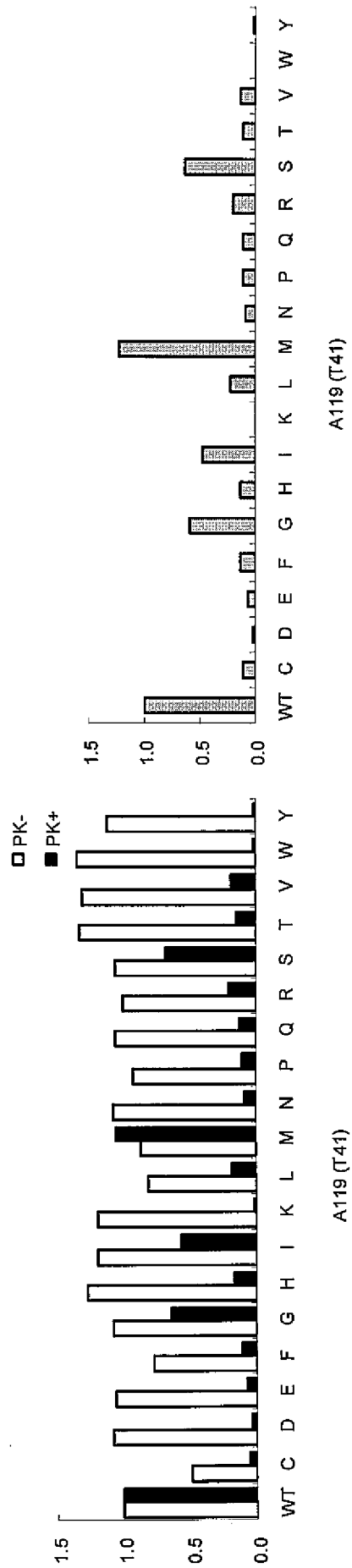
[図38]



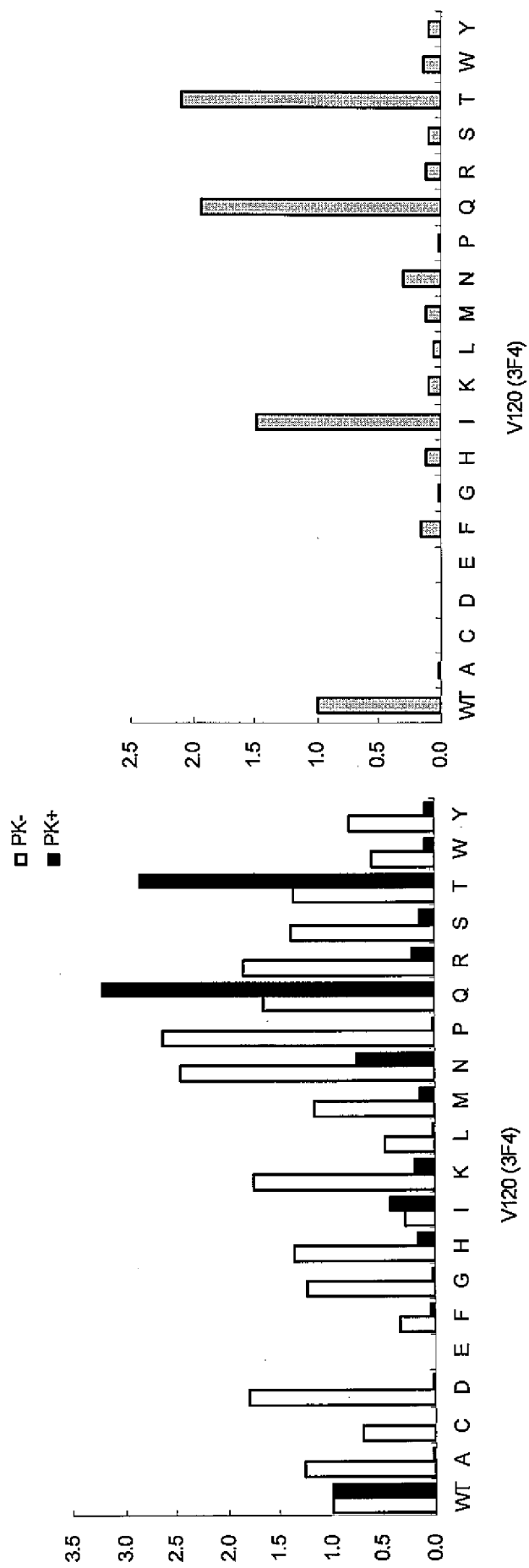
[図39]



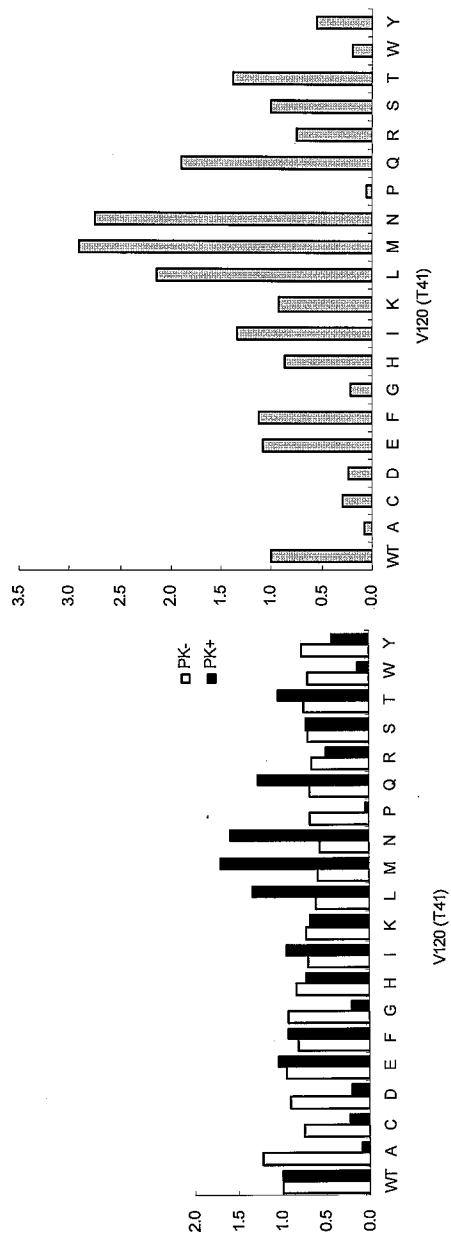
[図40]



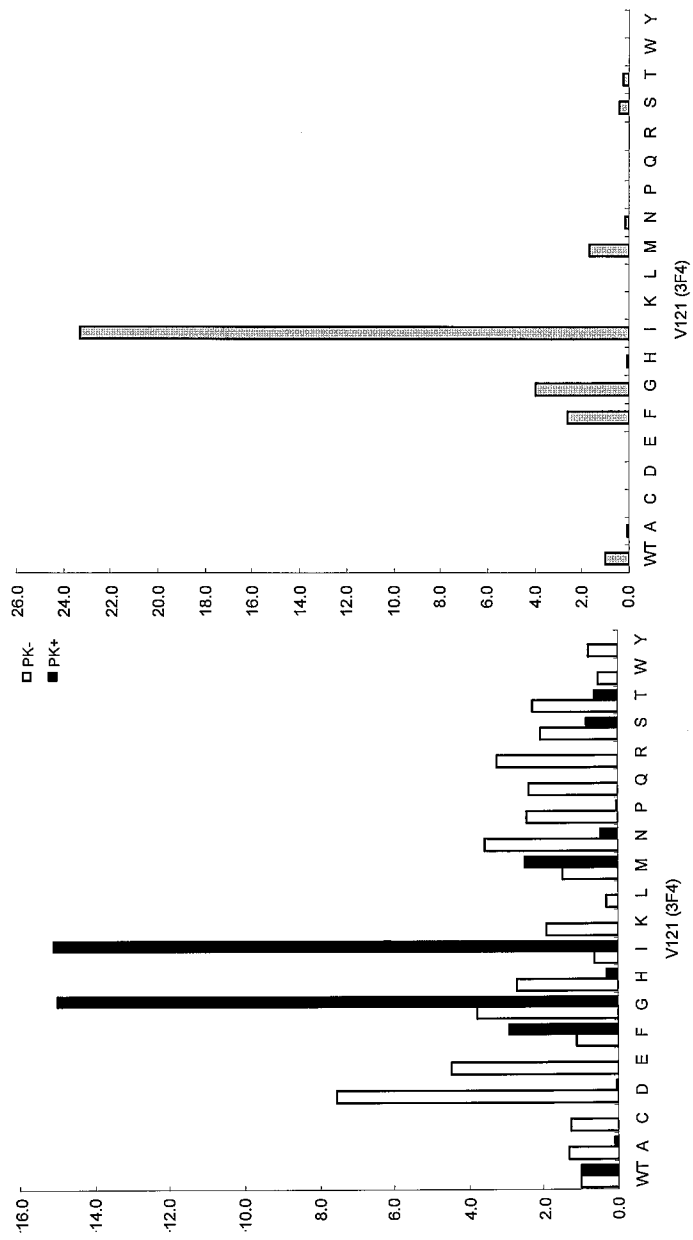
[図41]



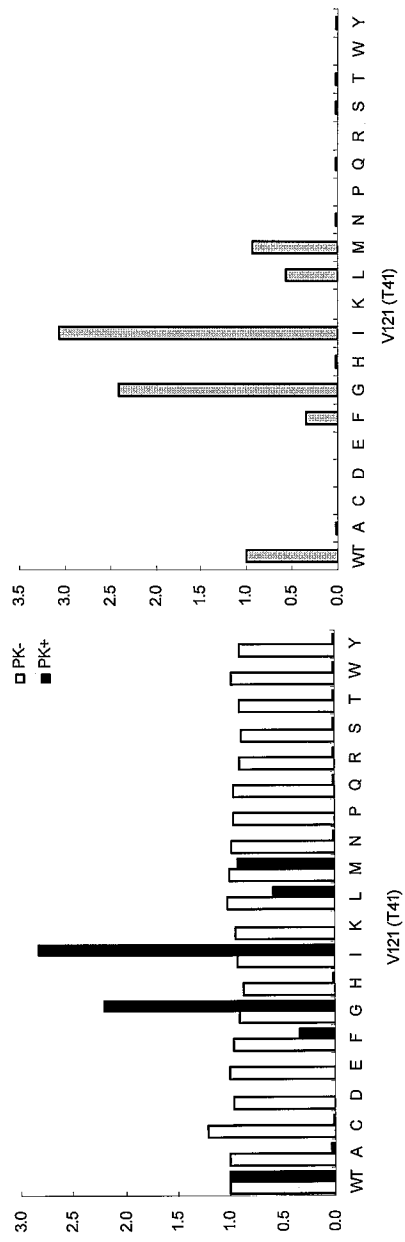
[図42]



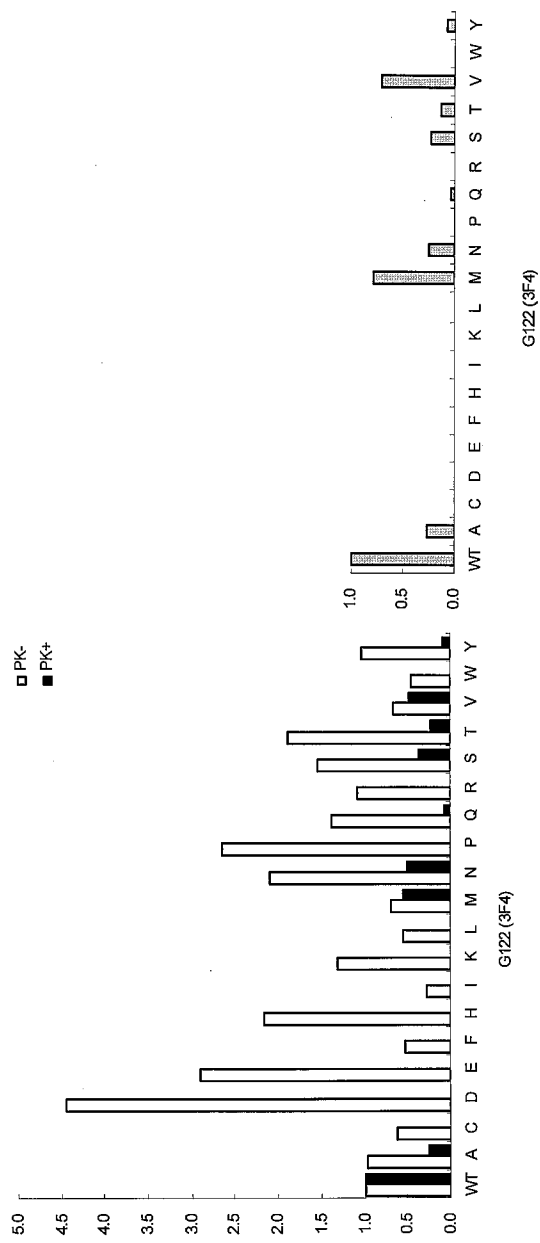
[図43]



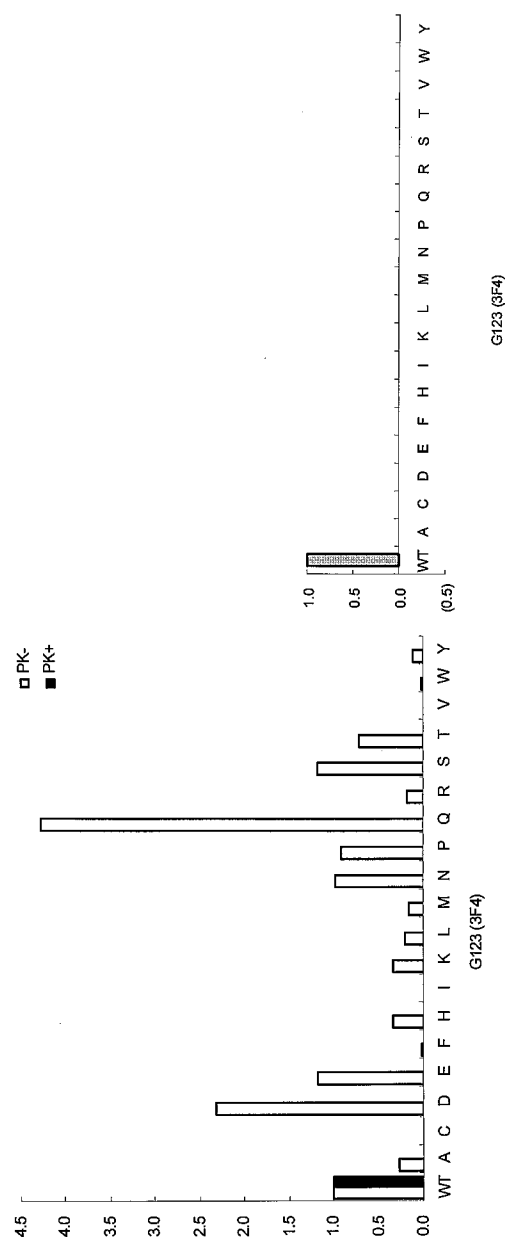
[図44]



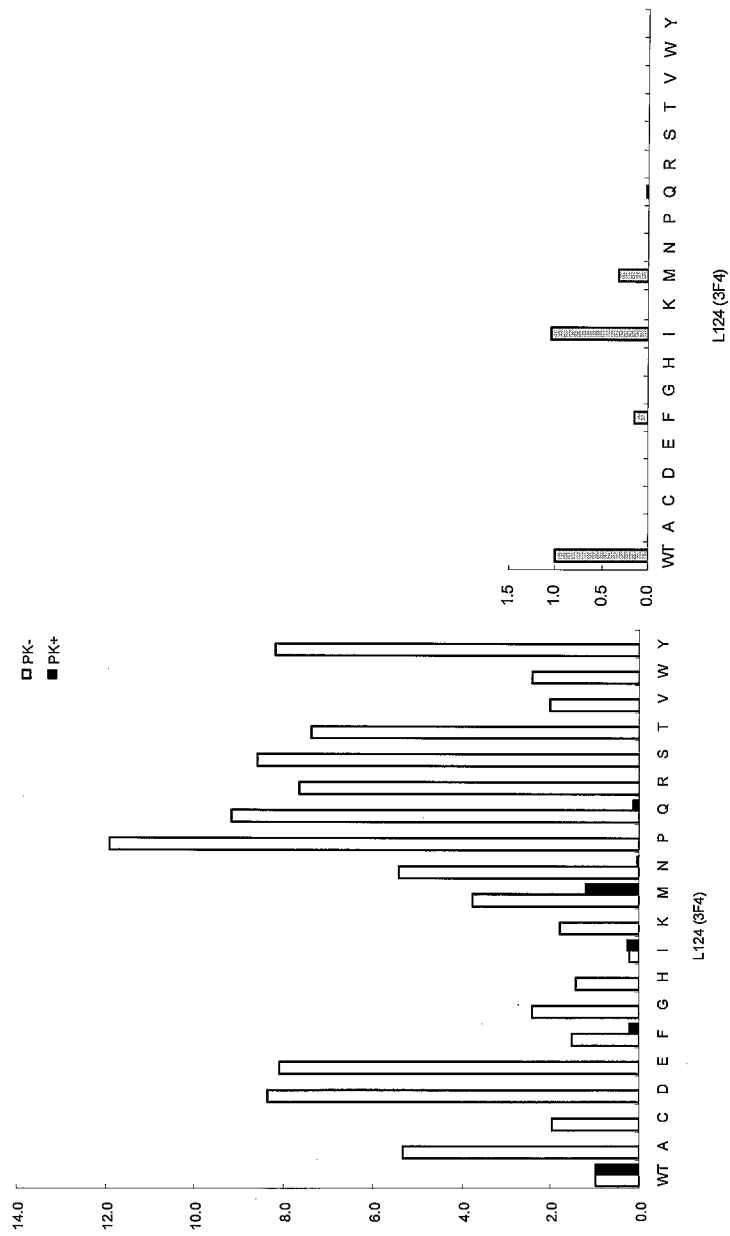
[図45]



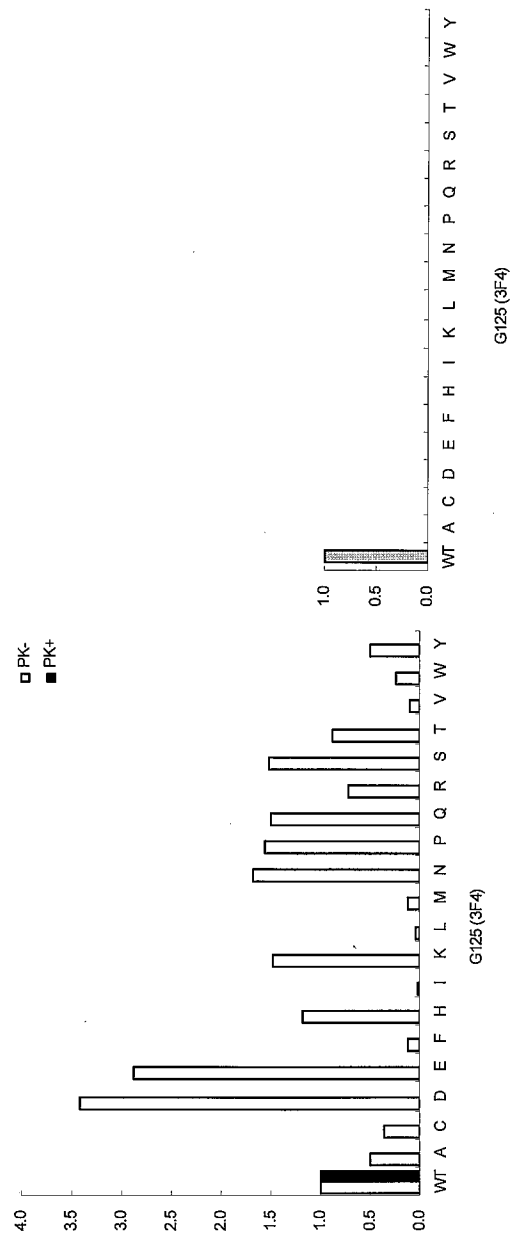
[図46]



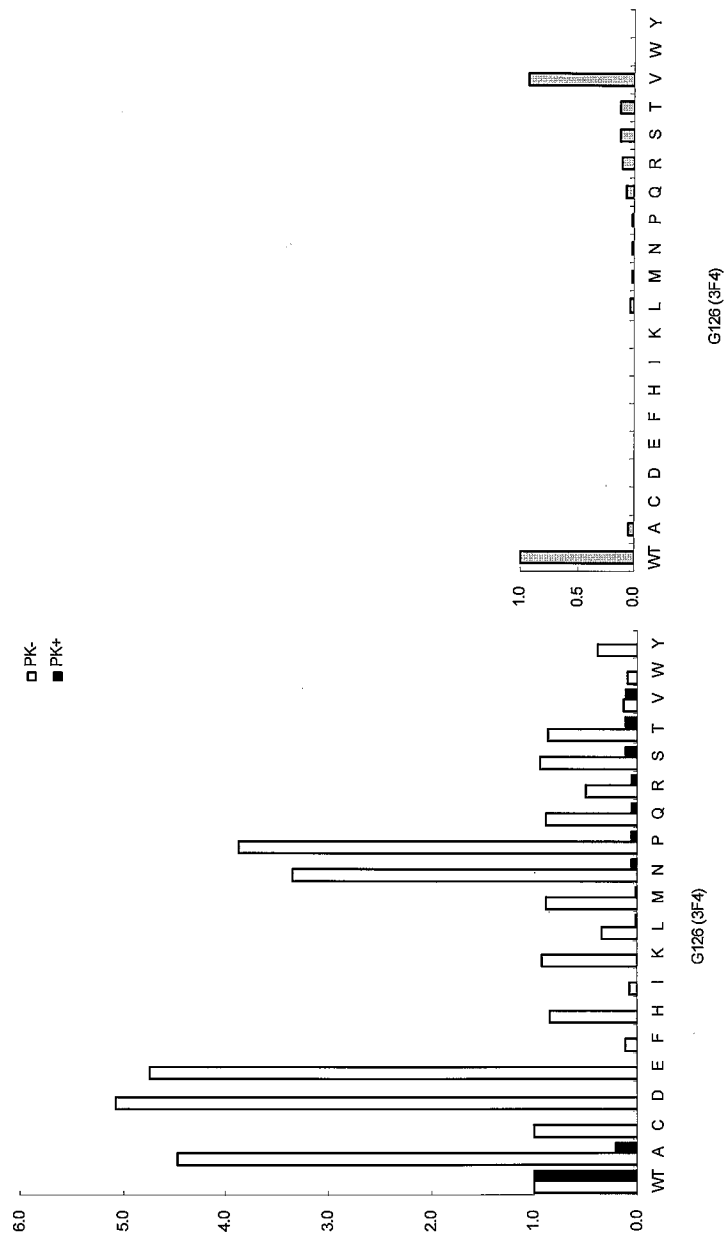
[図47]



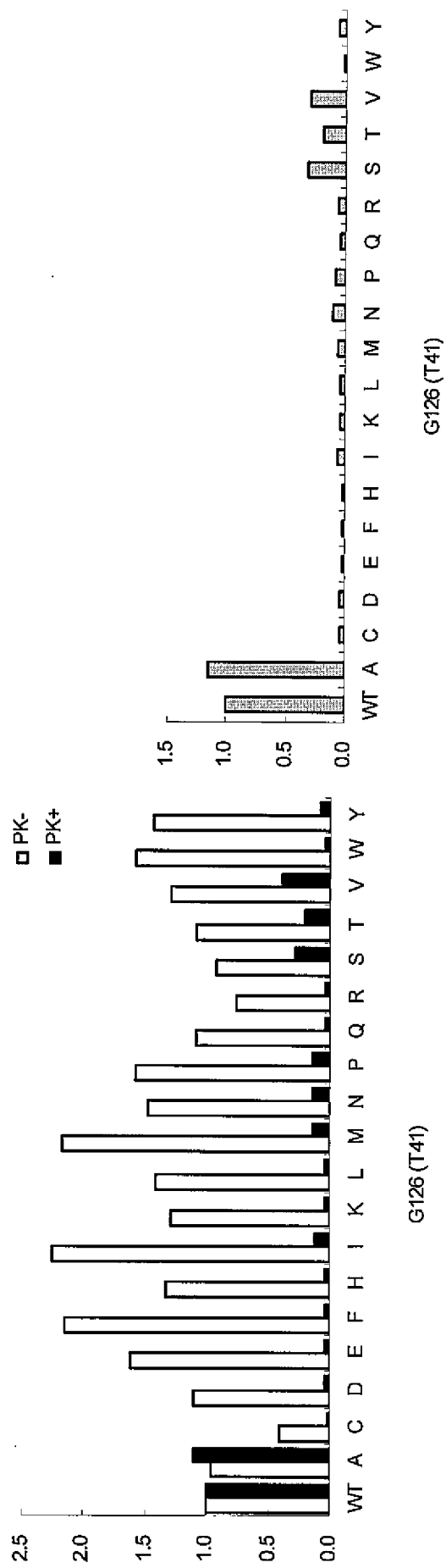
[図48]



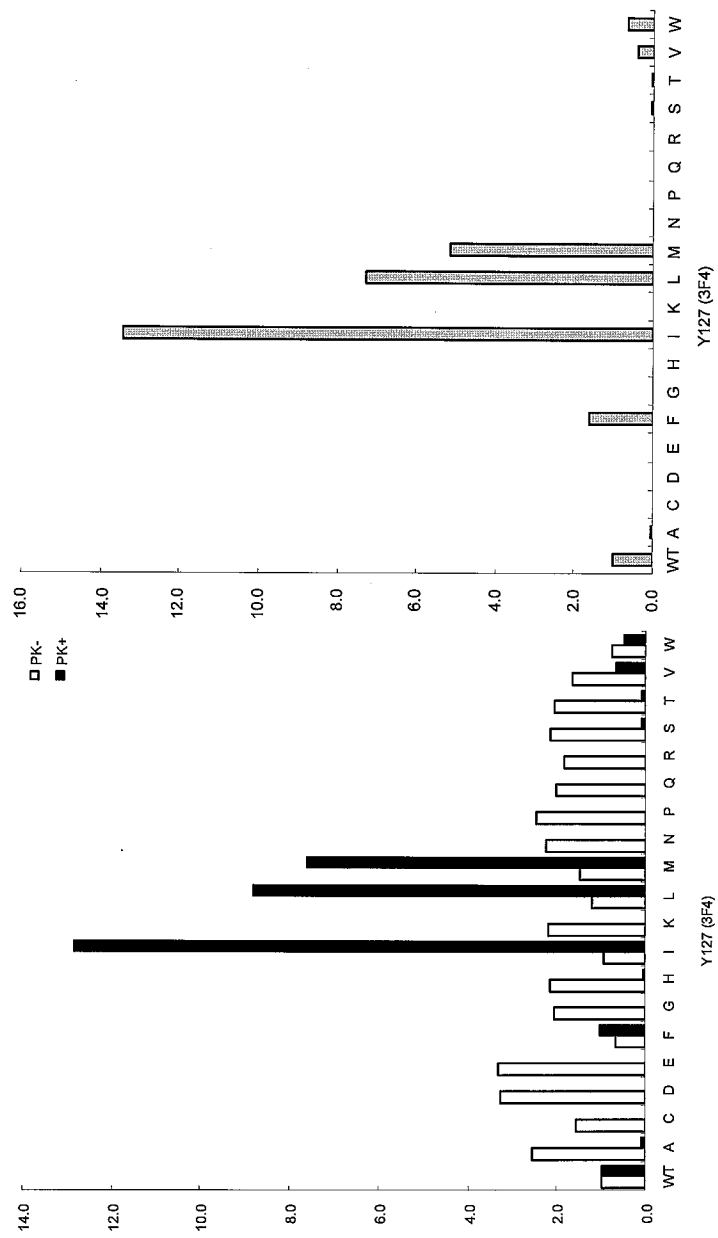
[図49]



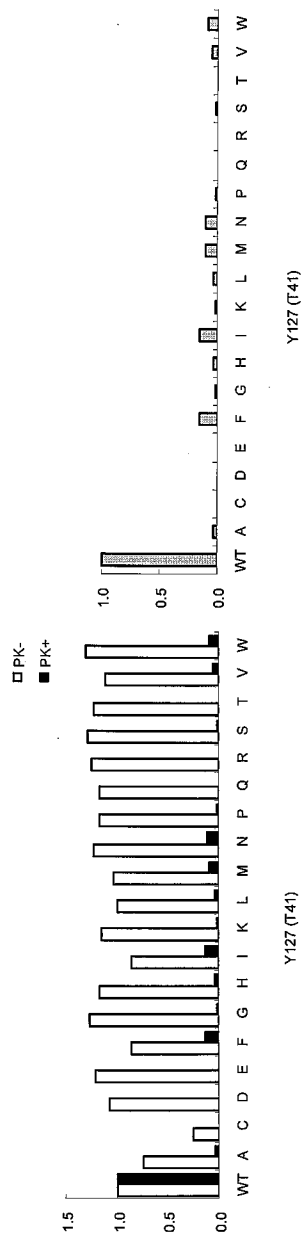
[図50]



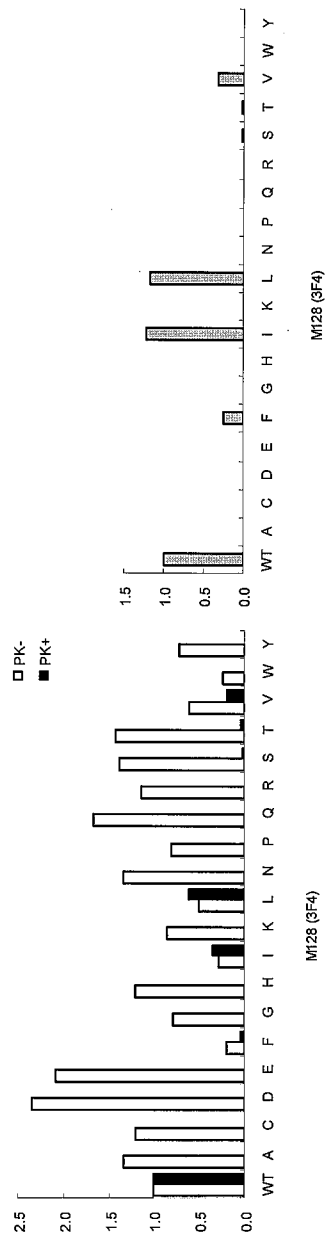
[図51]



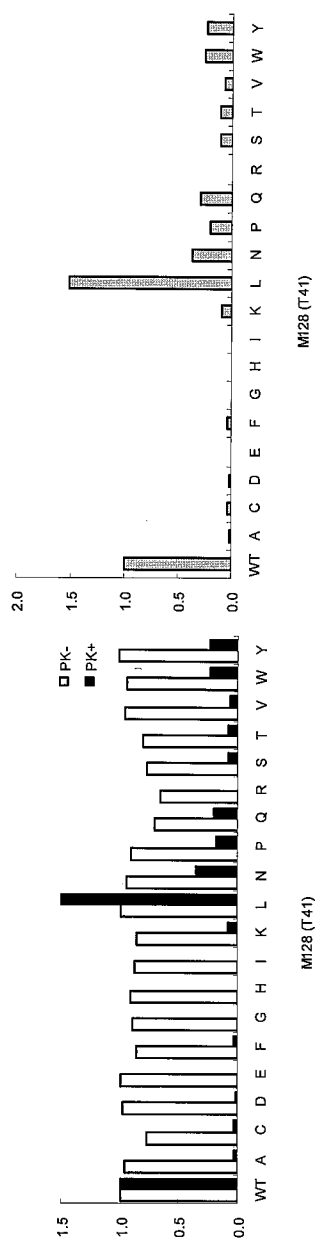
[図52]



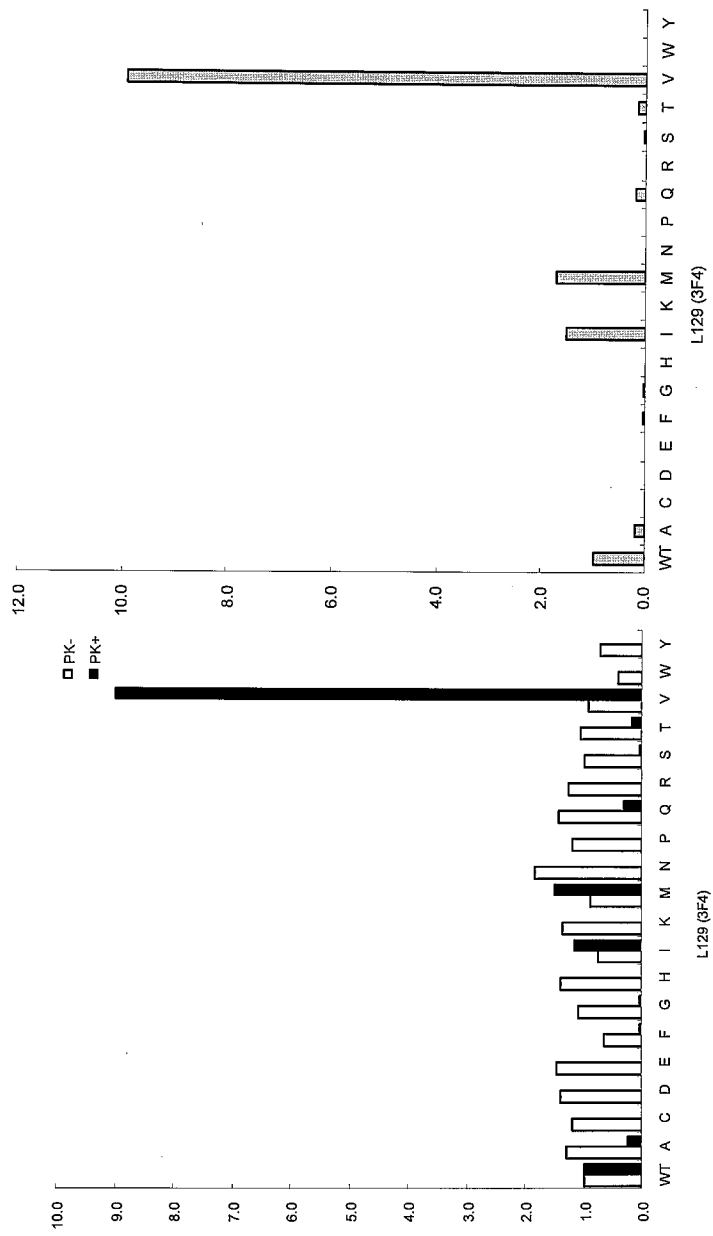
[図53]



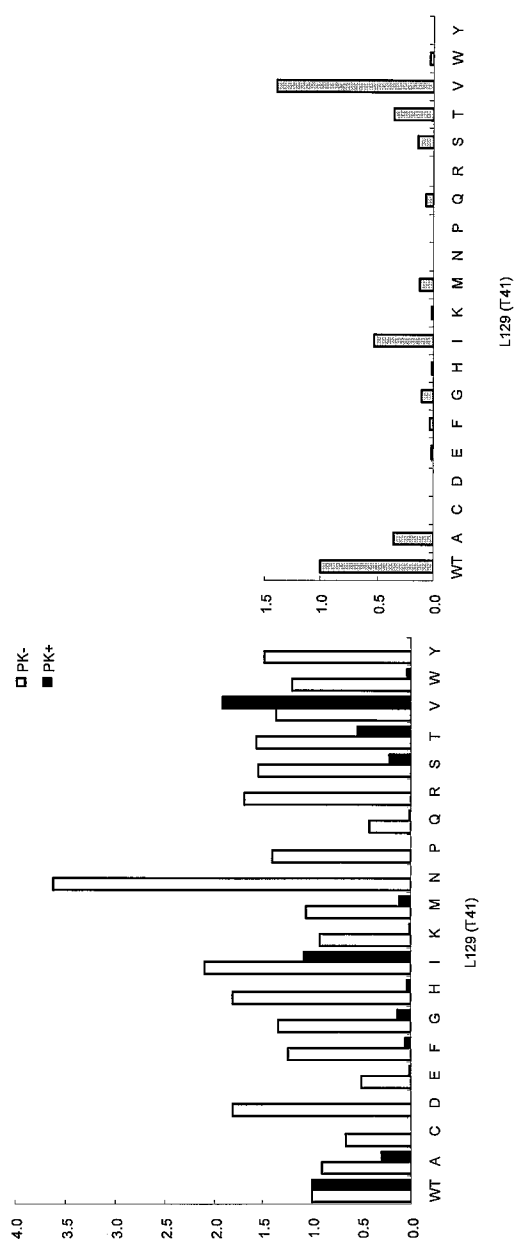
[図54]



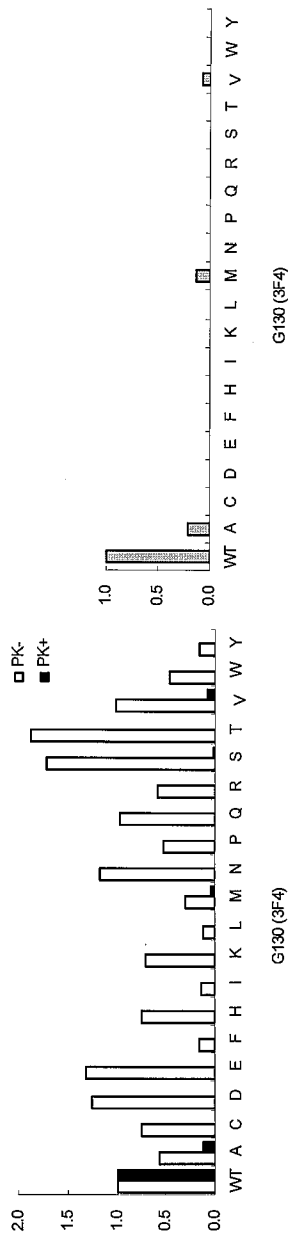
[図55]



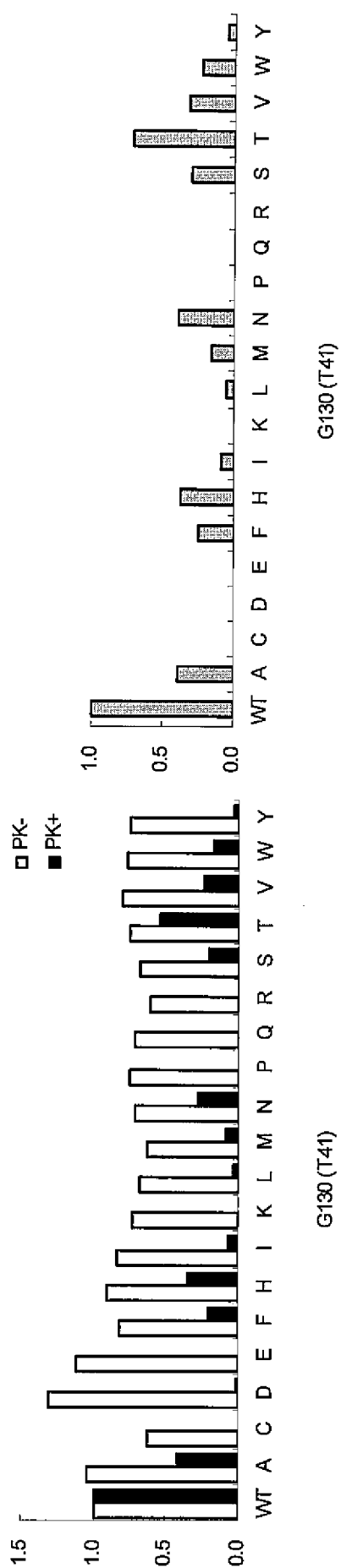
[図56]



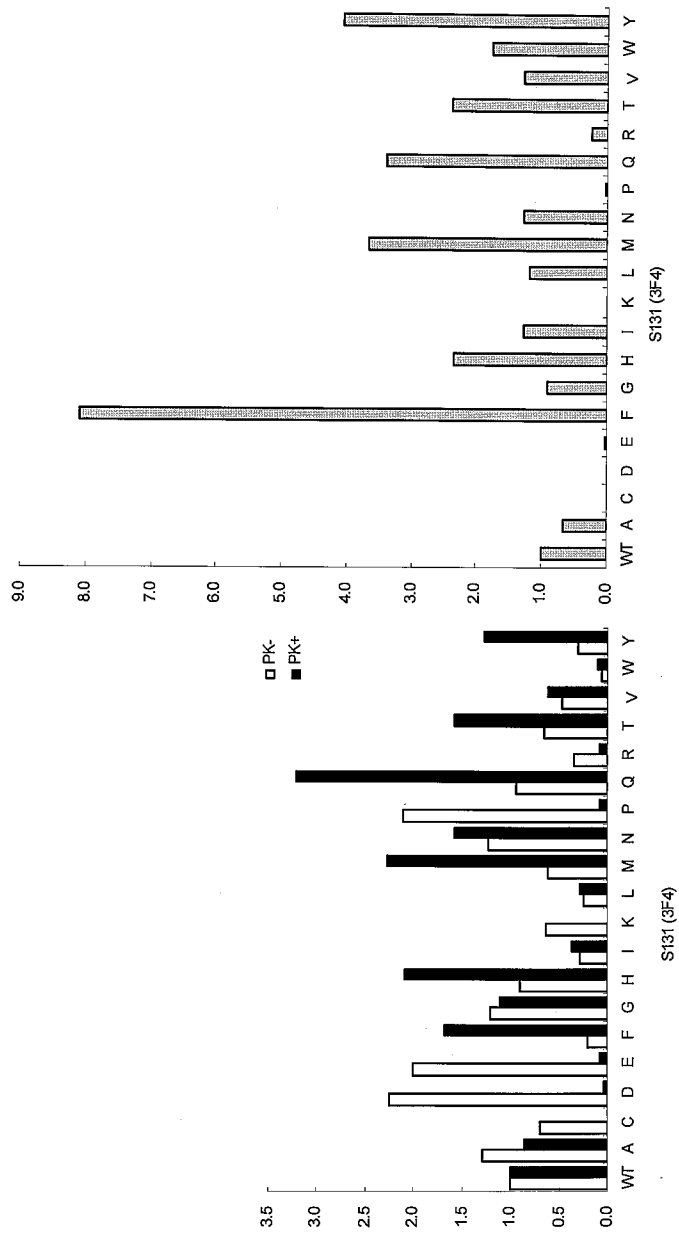
[図57]



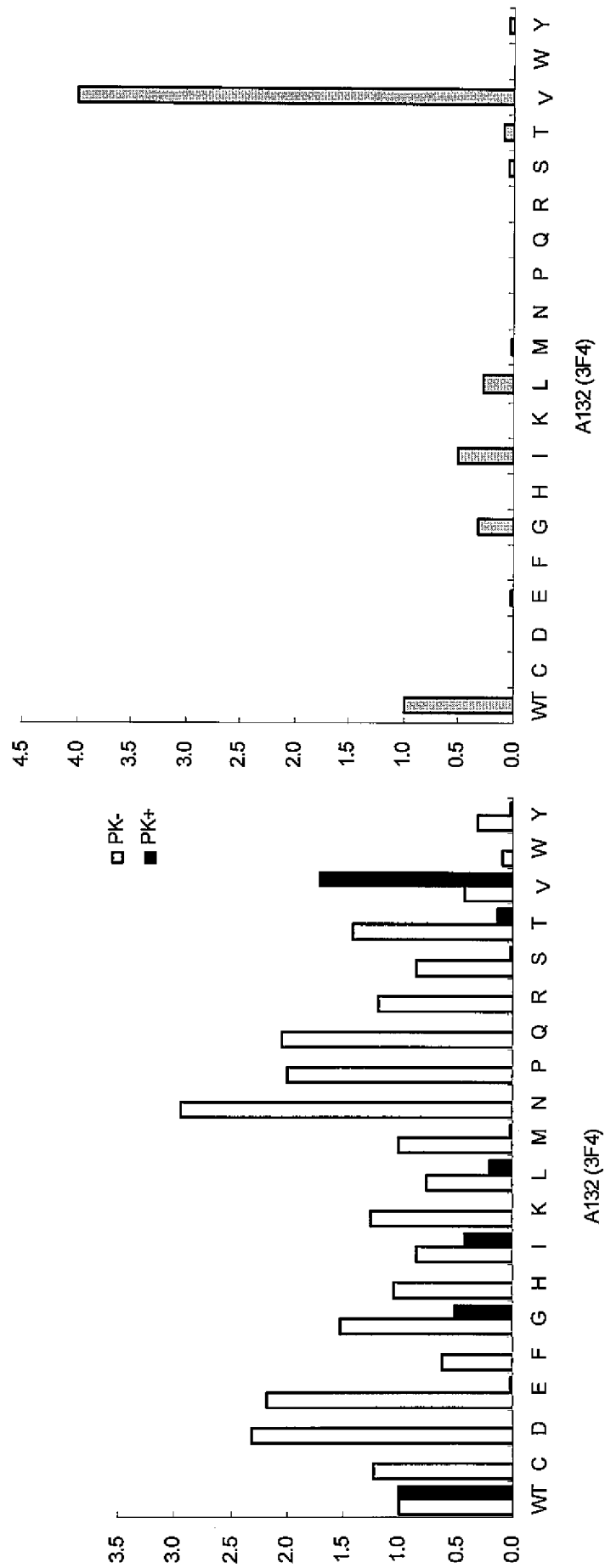
[図58]



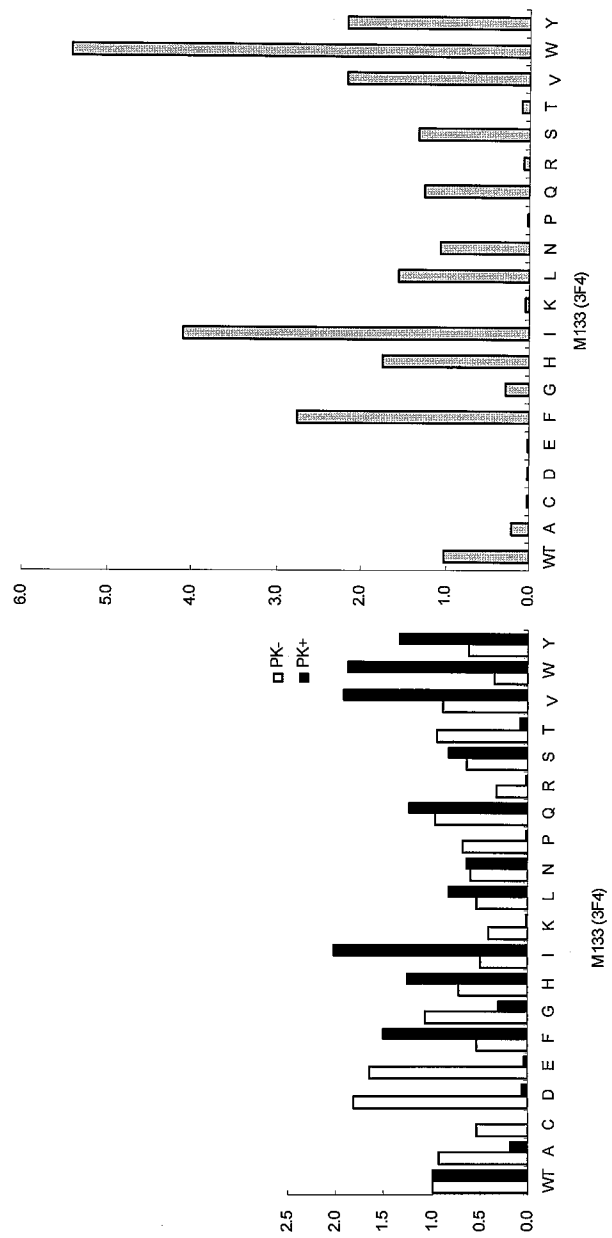
[図59]



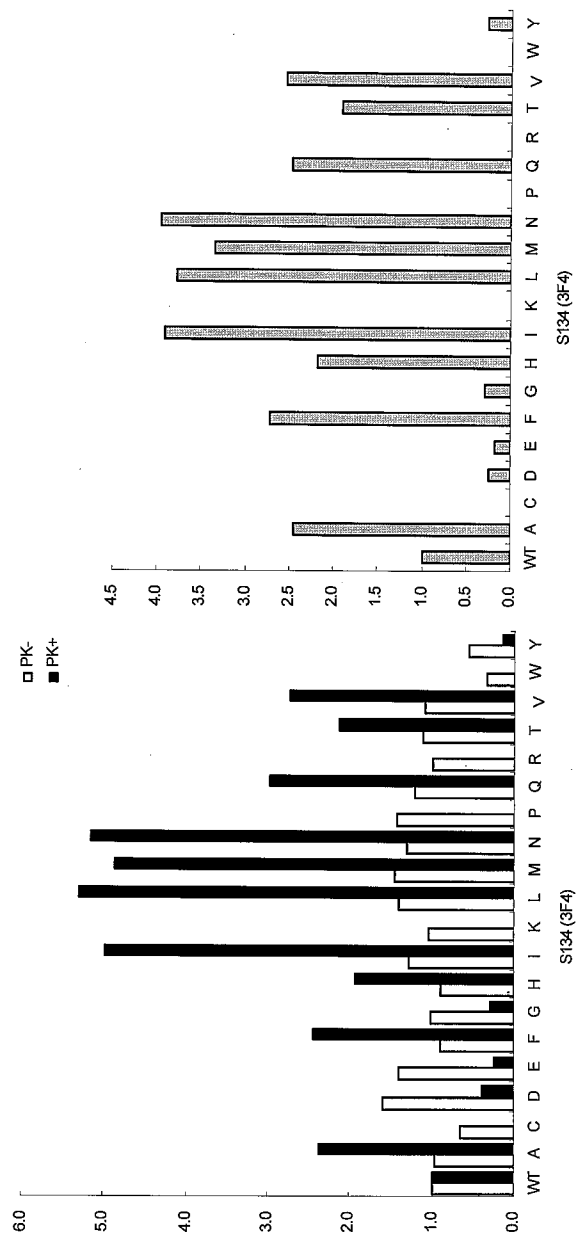
[図60]



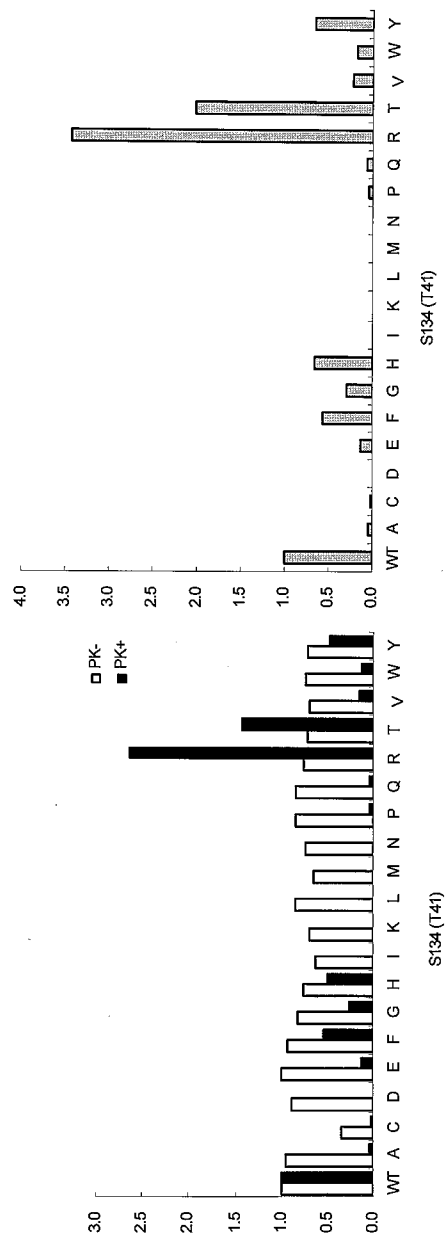
[図61]



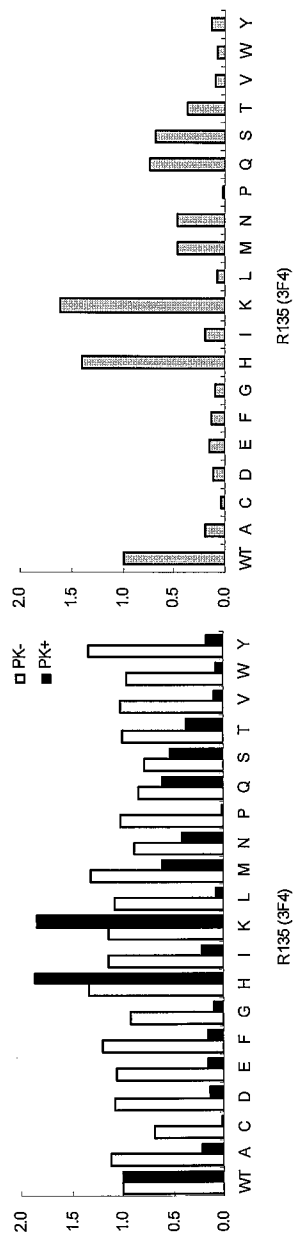
[図62]



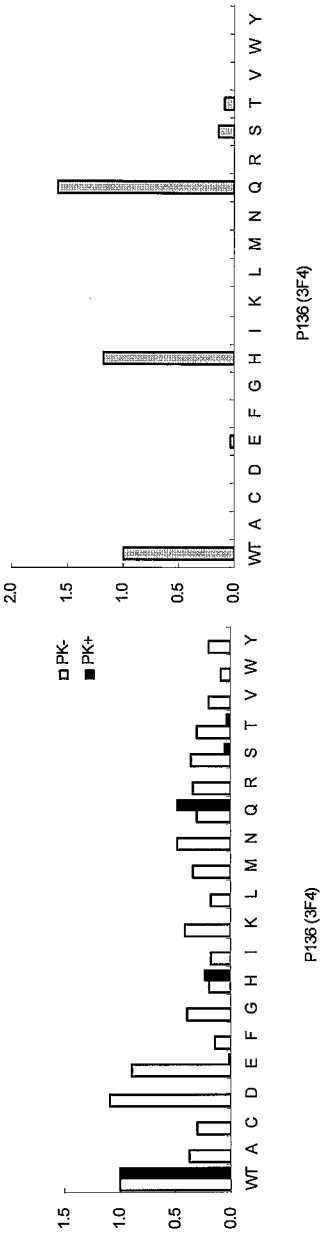
[図63]



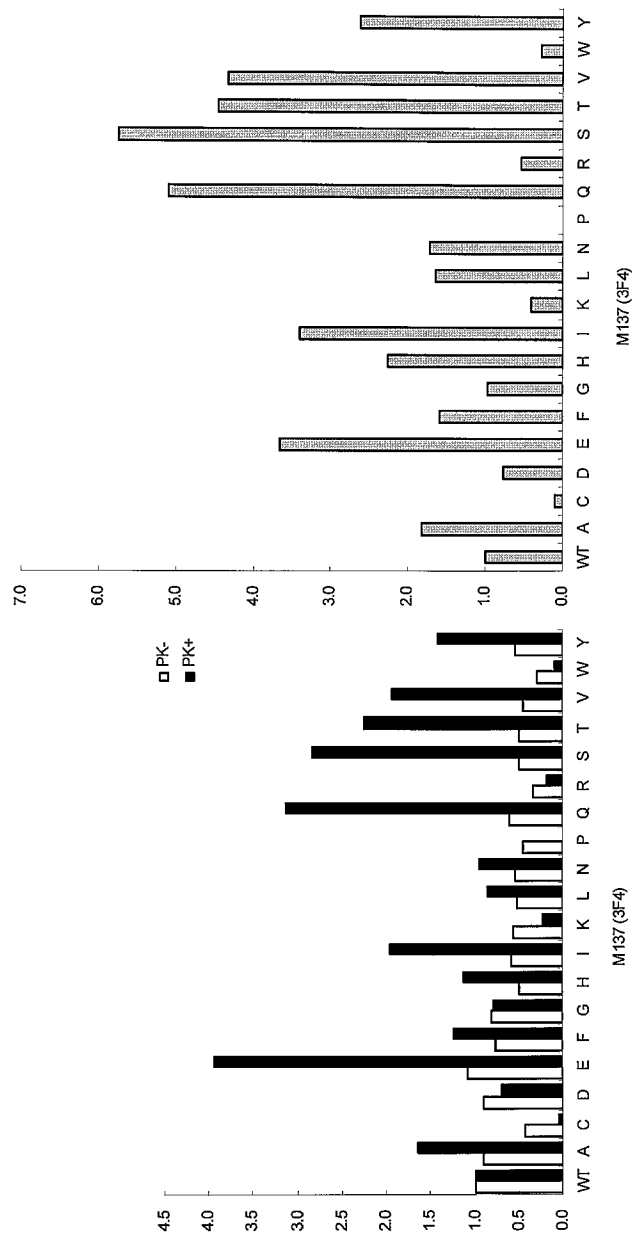
[図64]



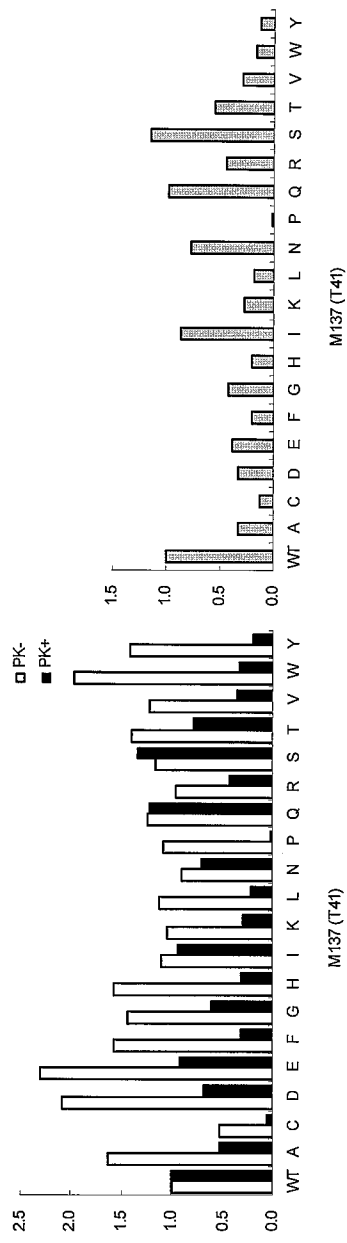
[図65]



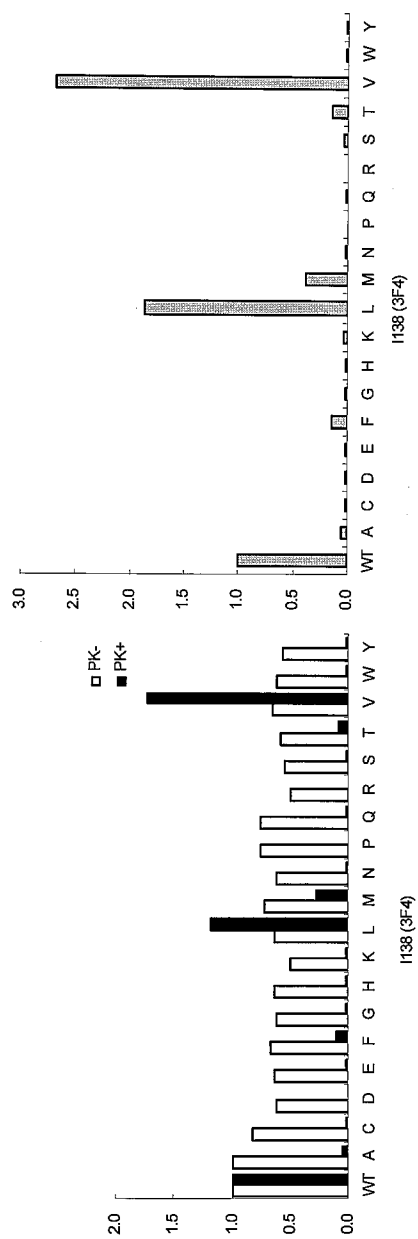
[図66]



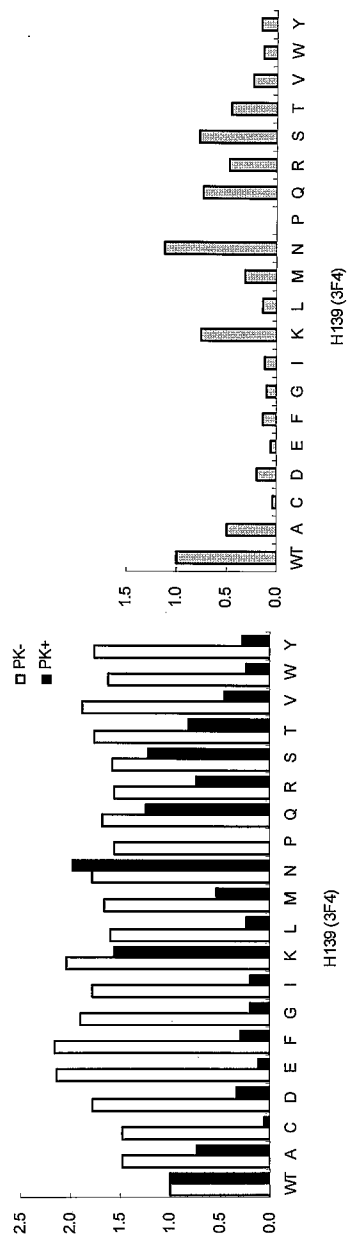
[図67]



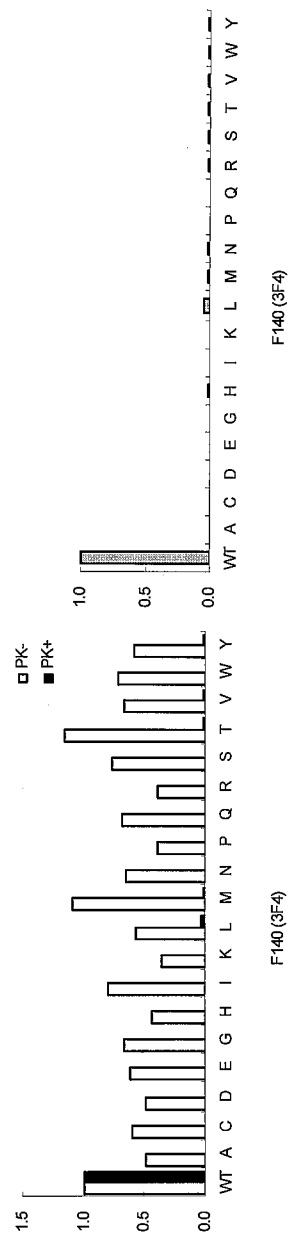
[図68]



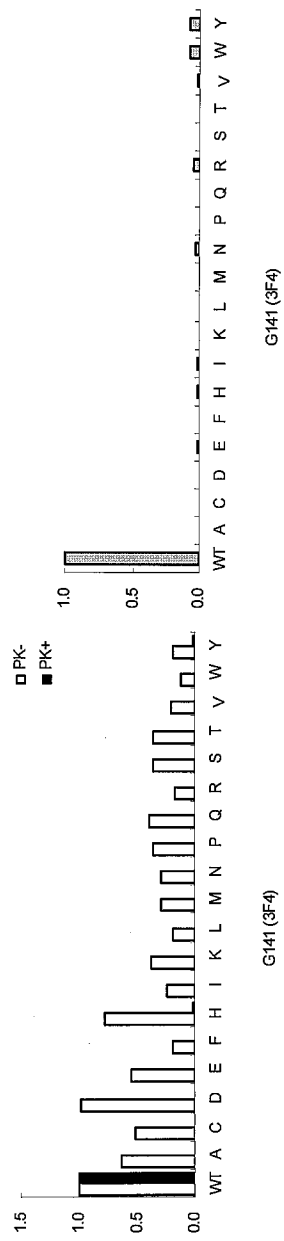
[図69]



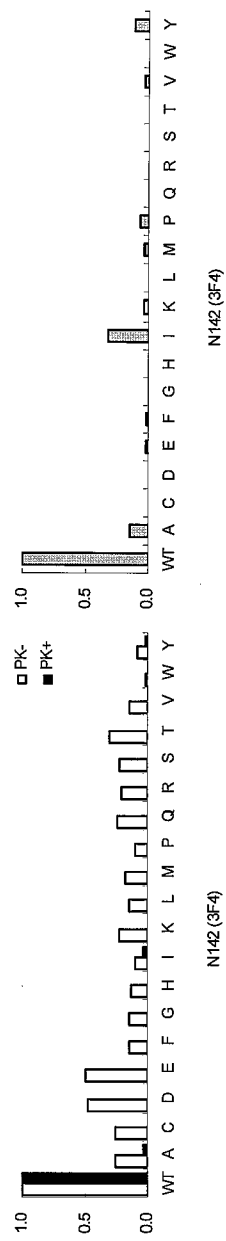
[図70]



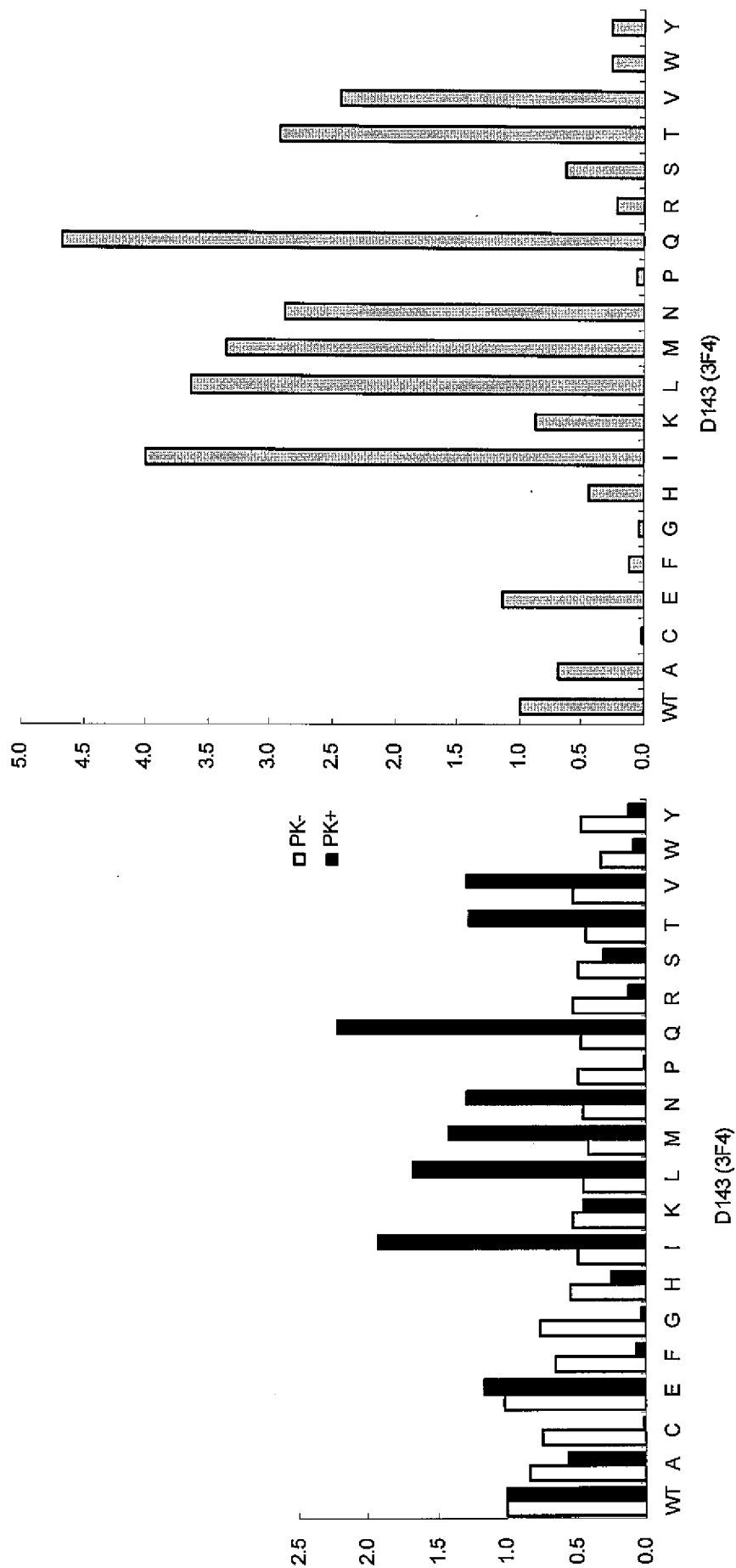
[図71]



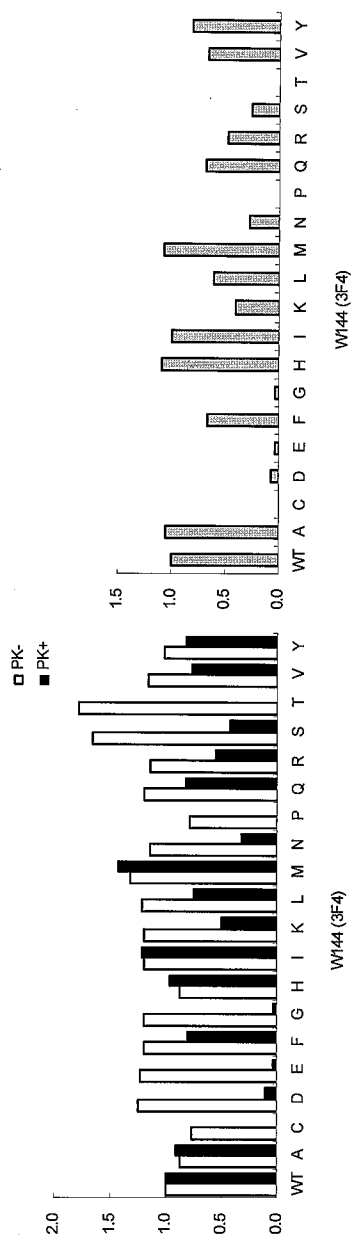
[図72]



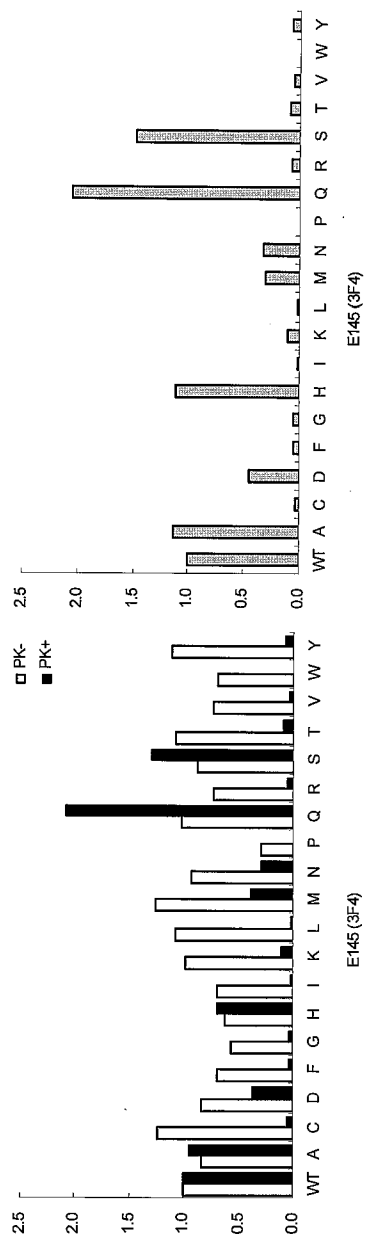
[図73]



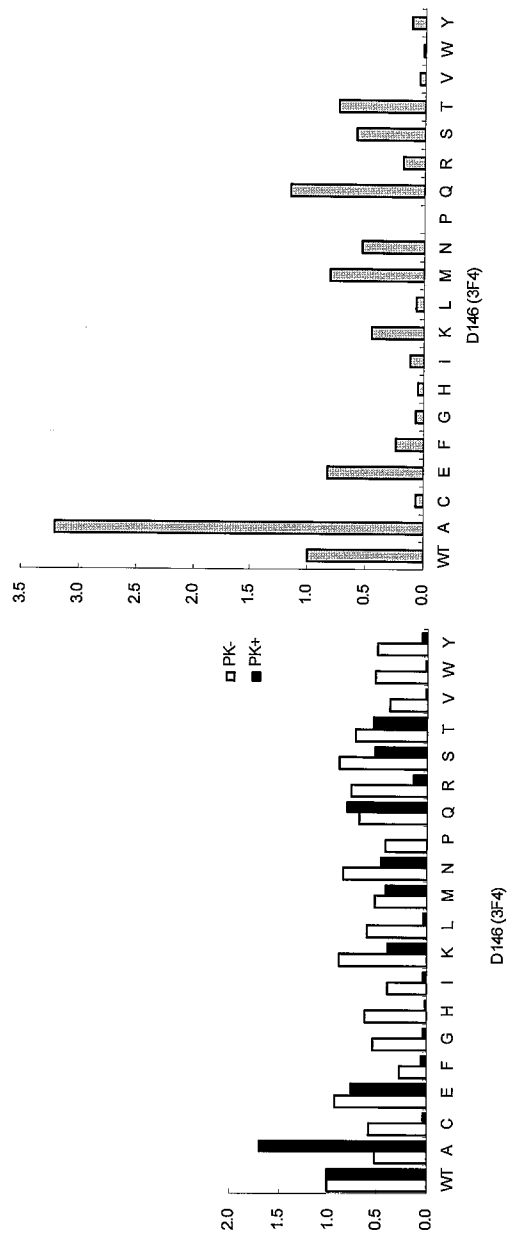
[図74]



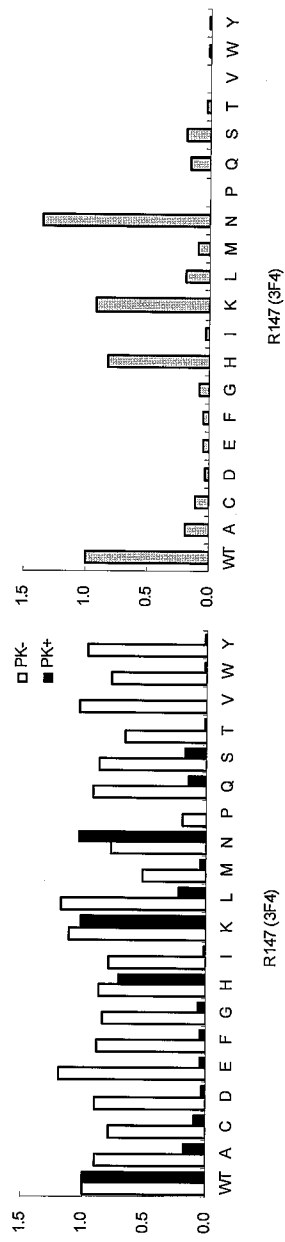
[図75]



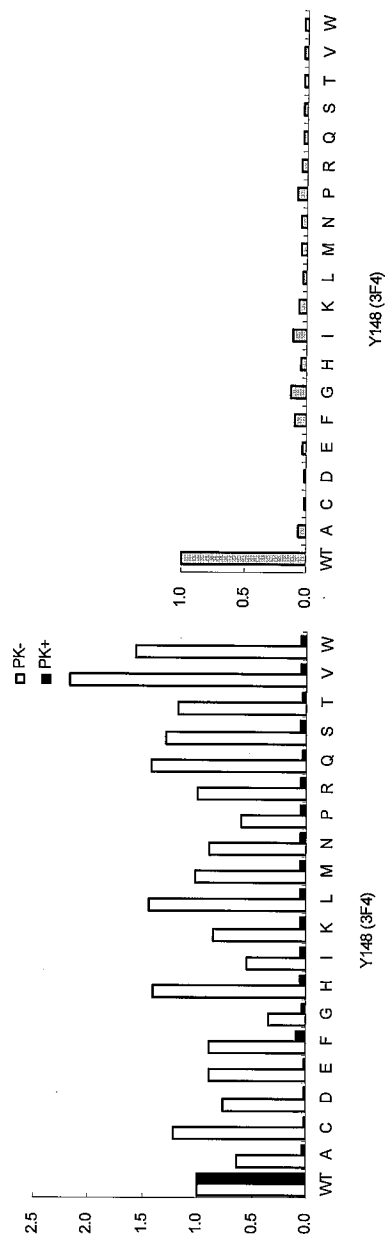
[図76]



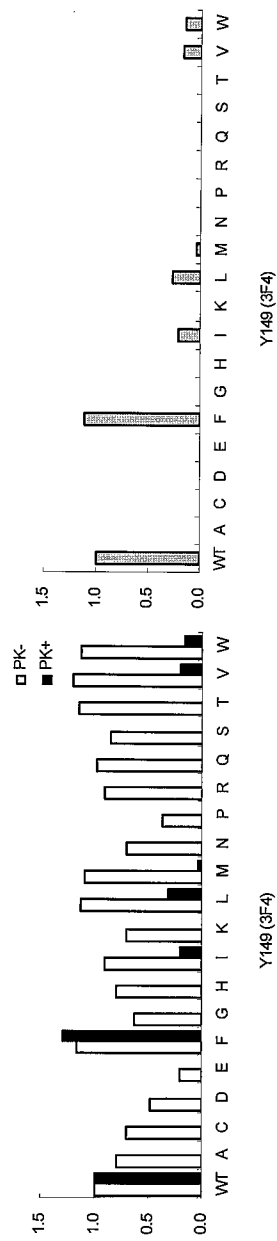
[図77]



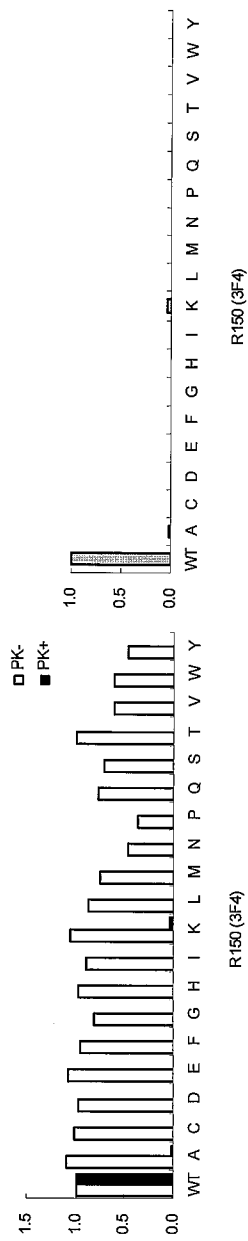
[図78]



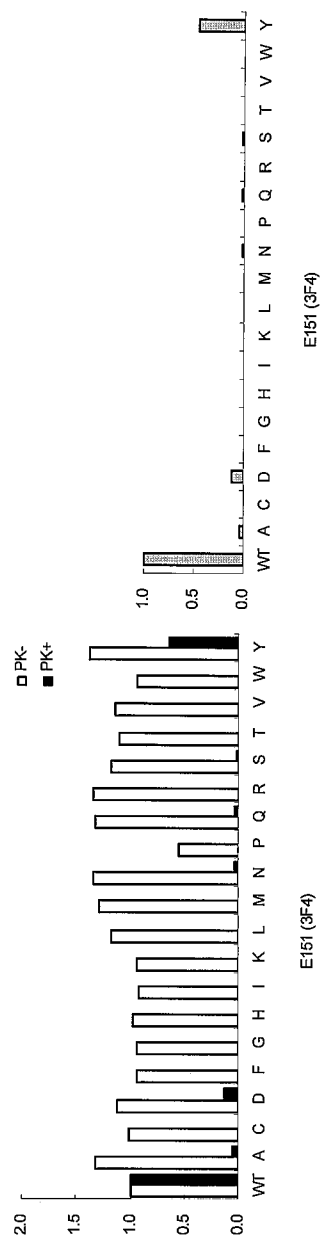
[図79]



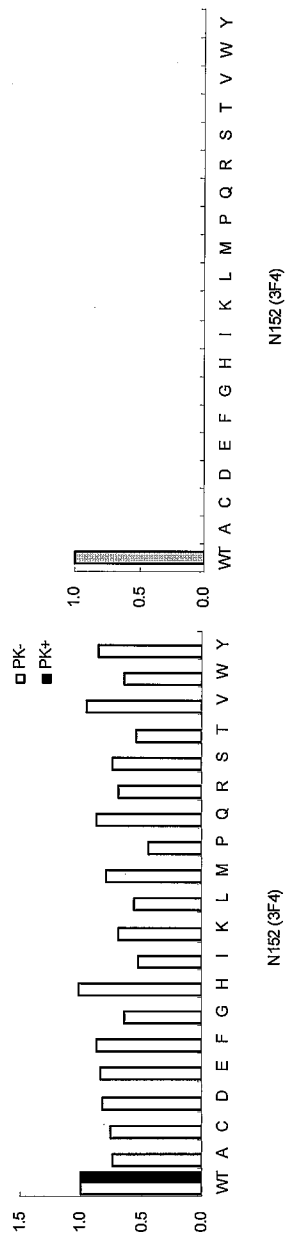
[図80]



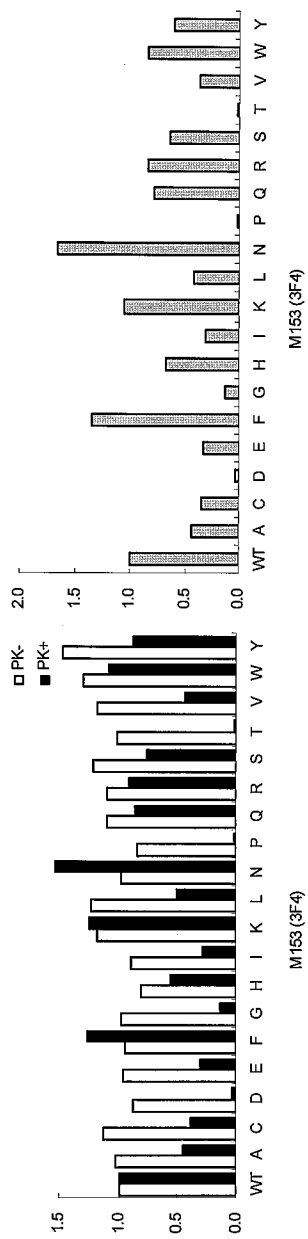
[図81]



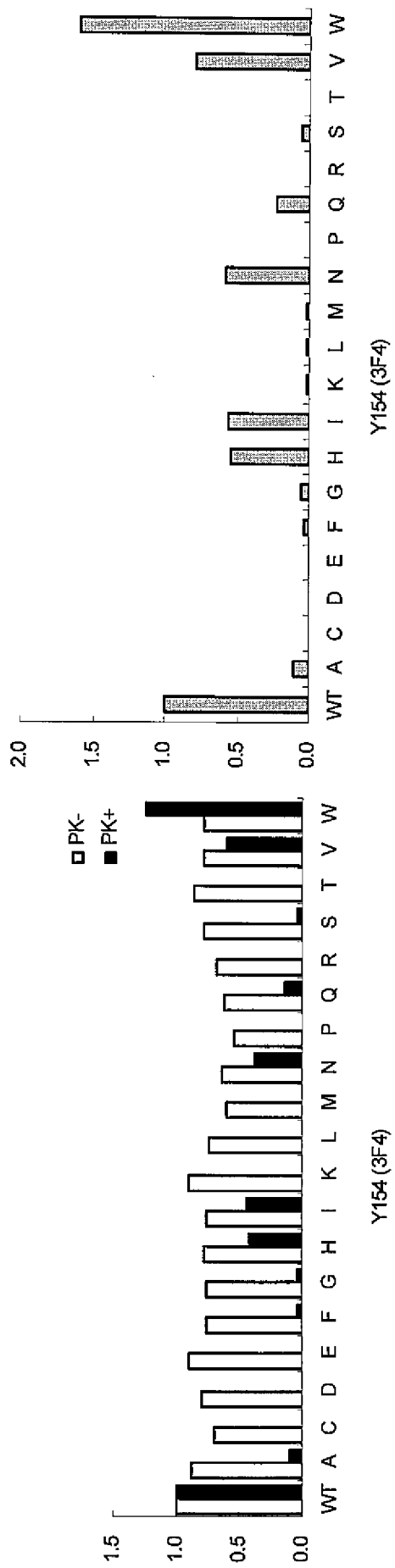
[図82]



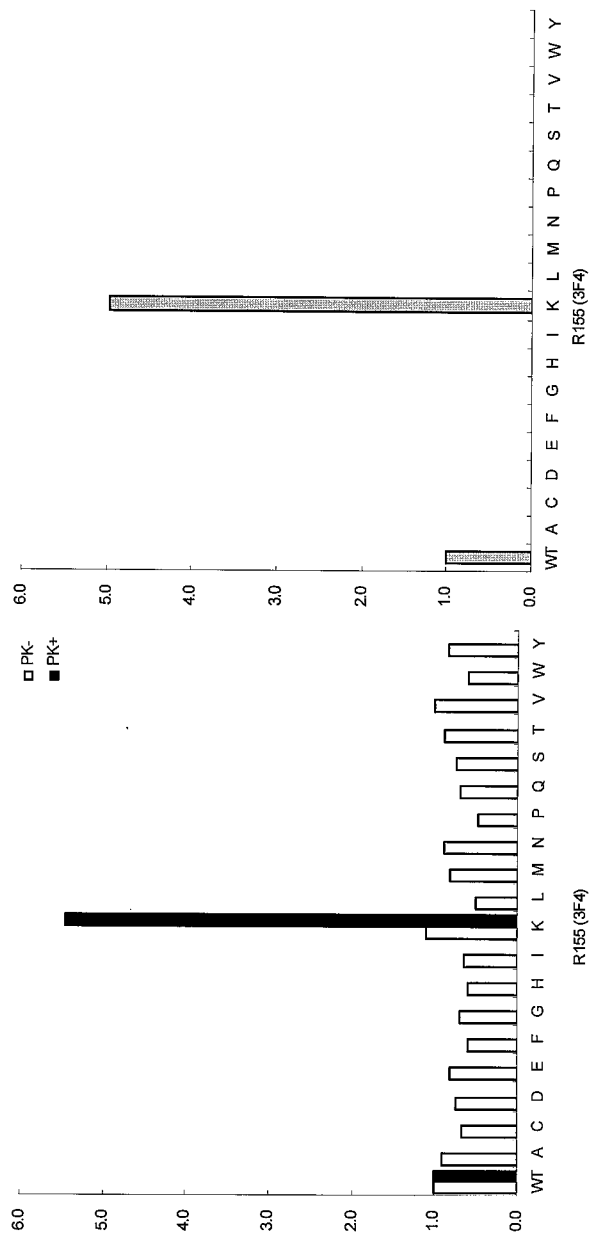
[図83]



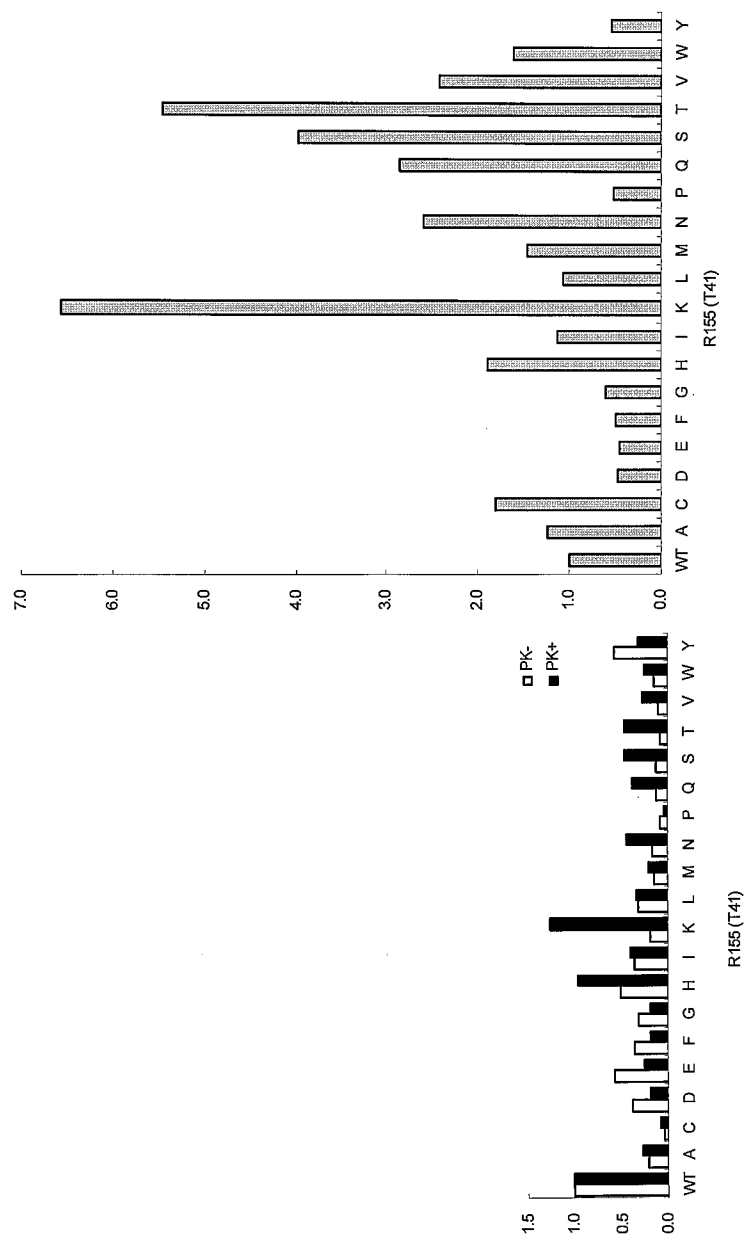
[図84]



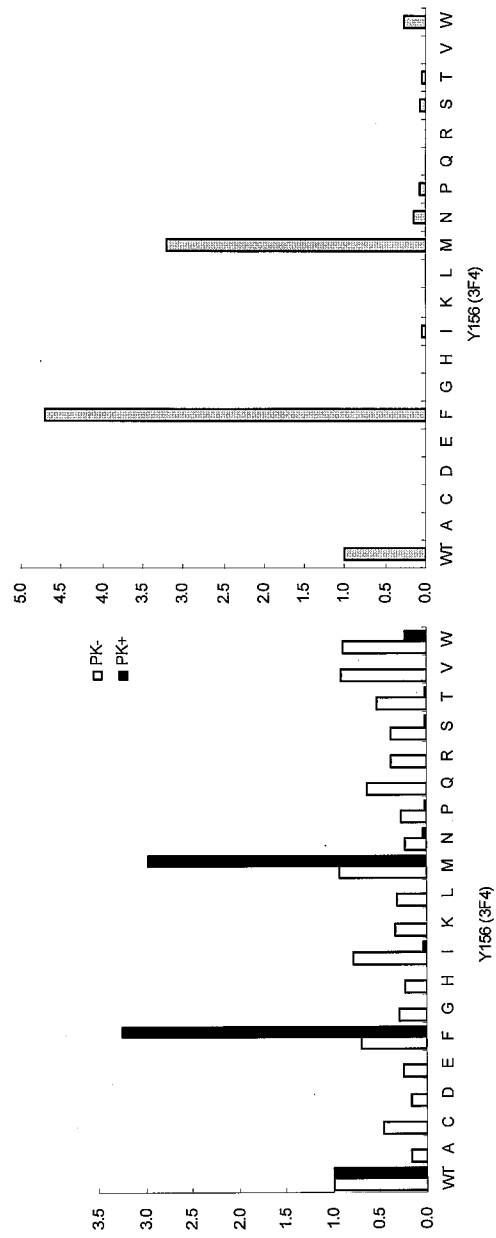
[図85]



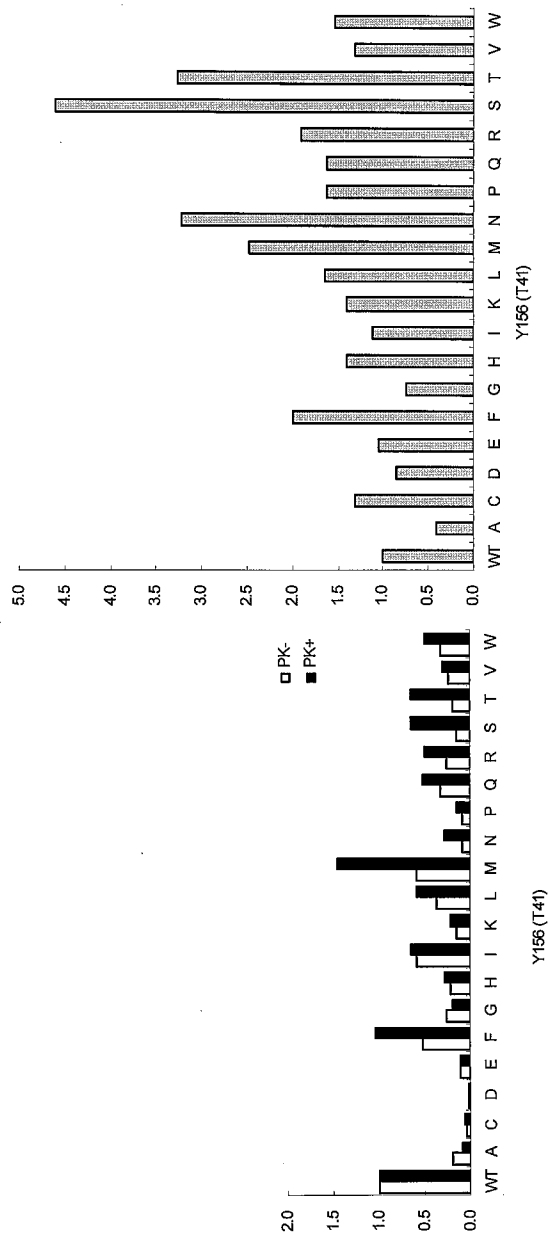
[図86]



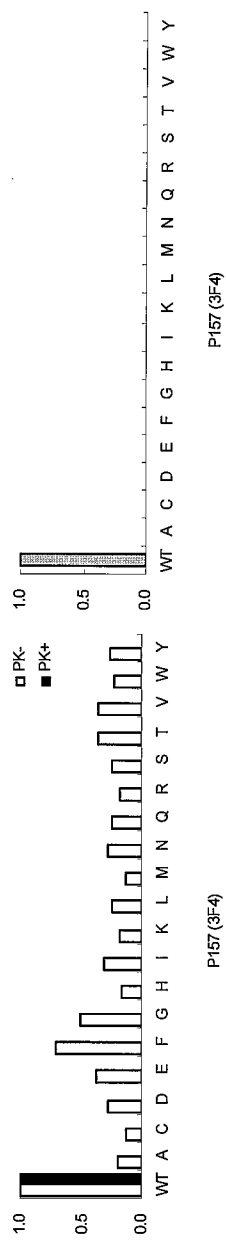
[図87]



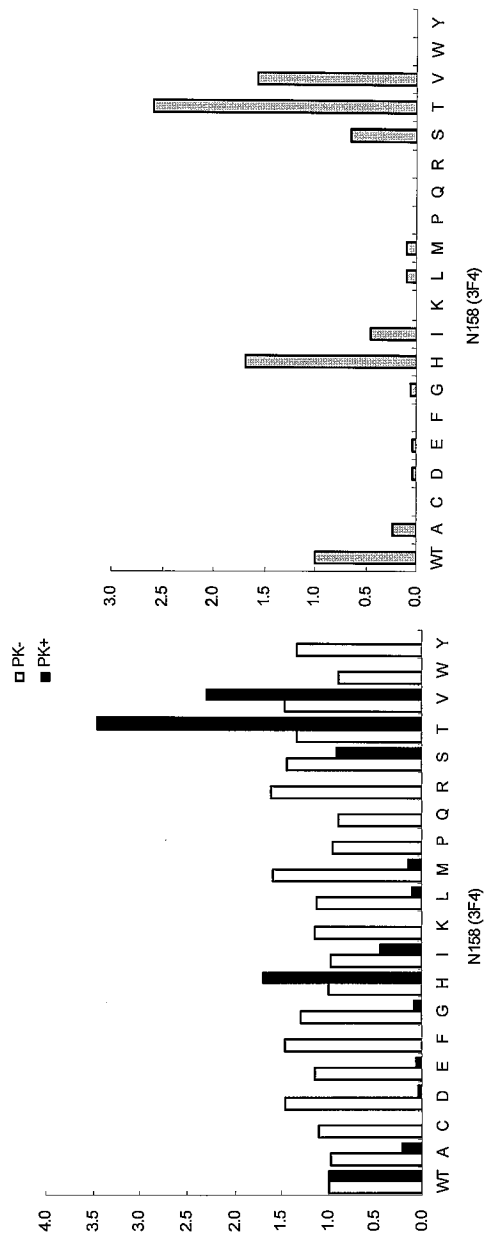
[図88]



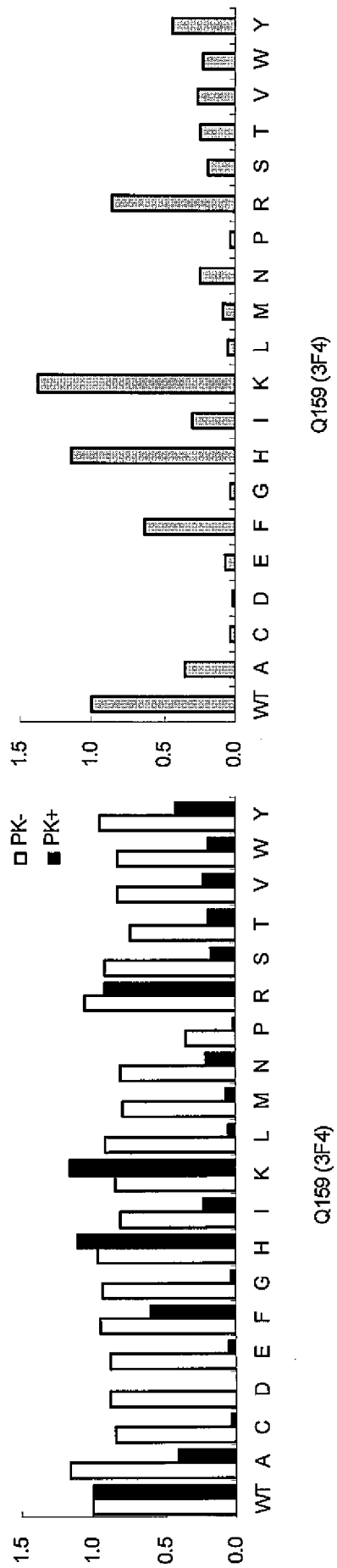
[図89]



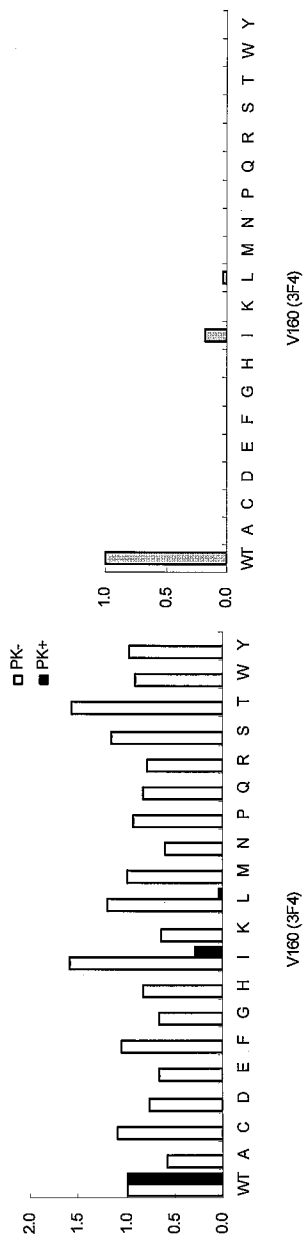
[図90]



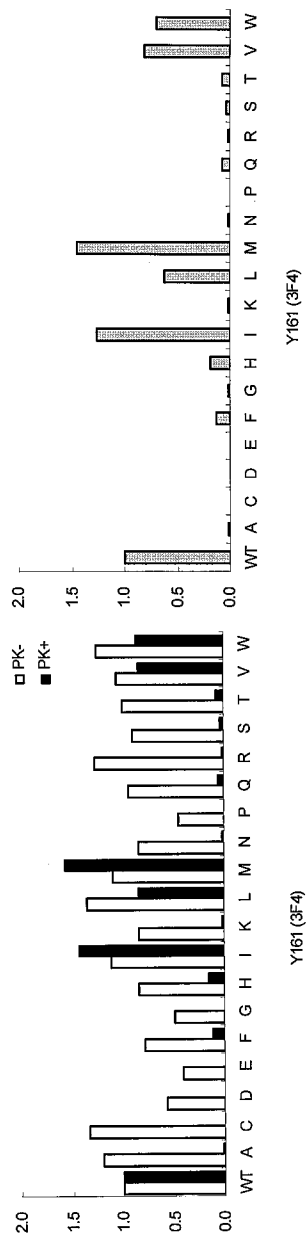
[図91]



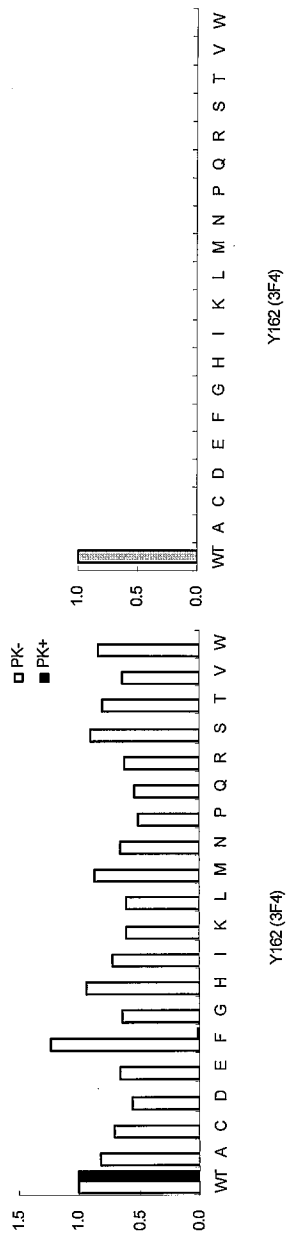
[図92]



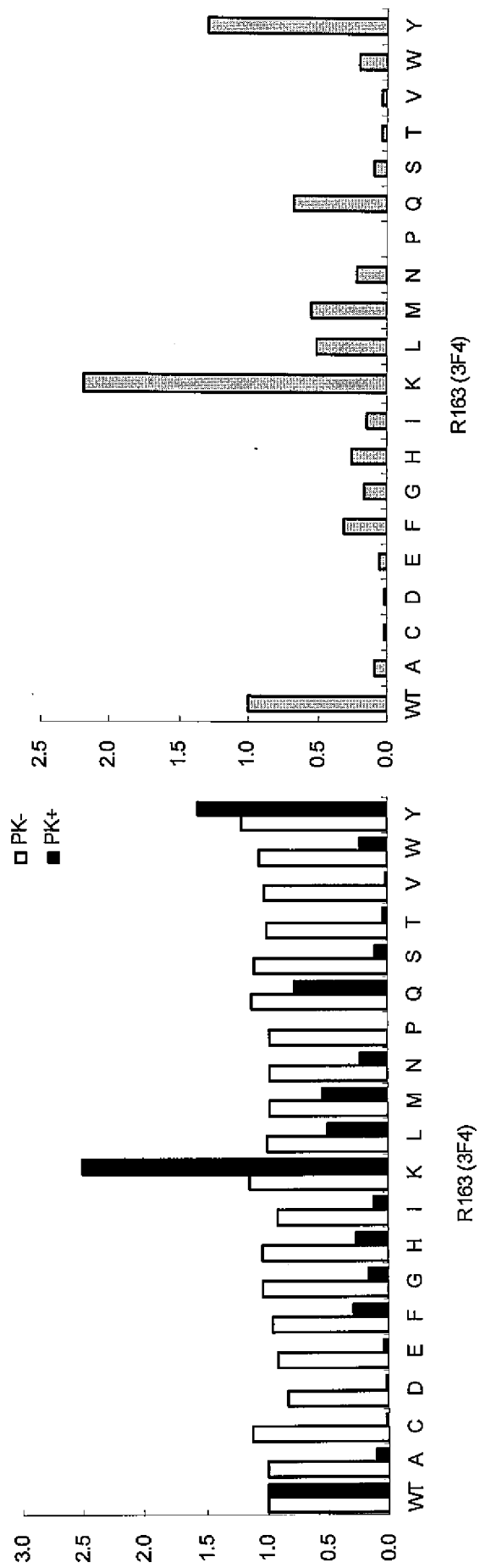
[図93]



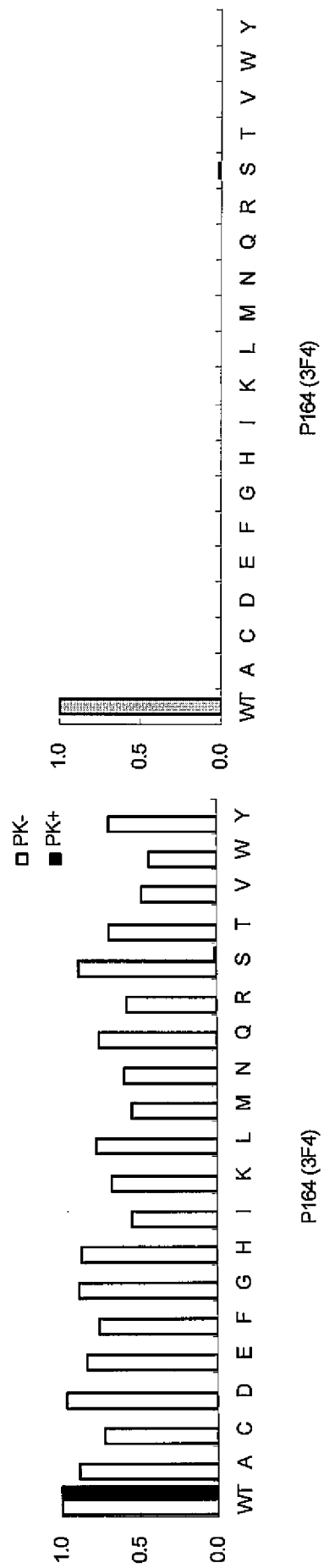
[図94]



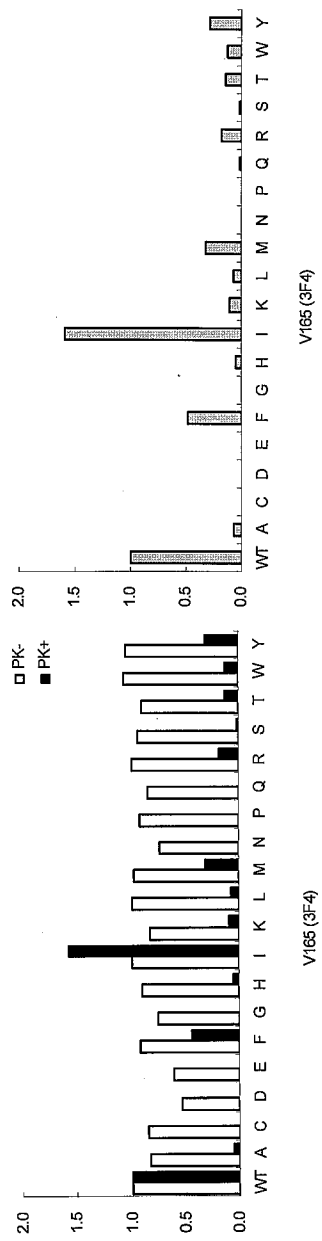
[図95]



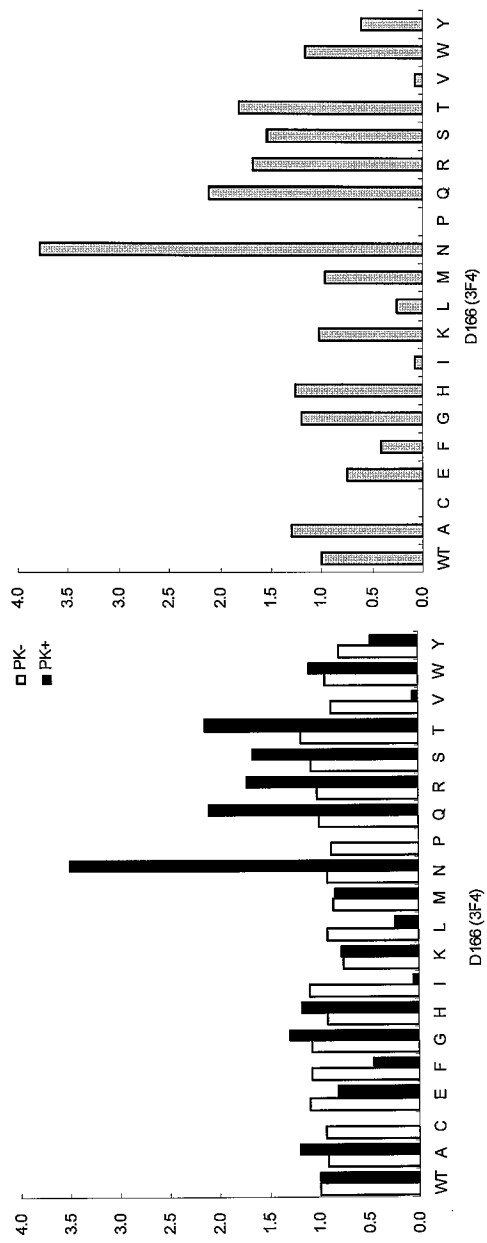
[図96]



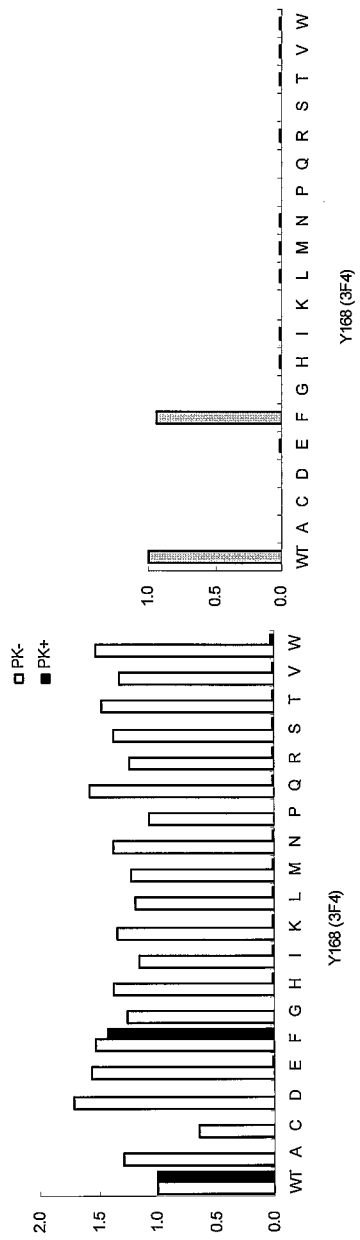
[図97]



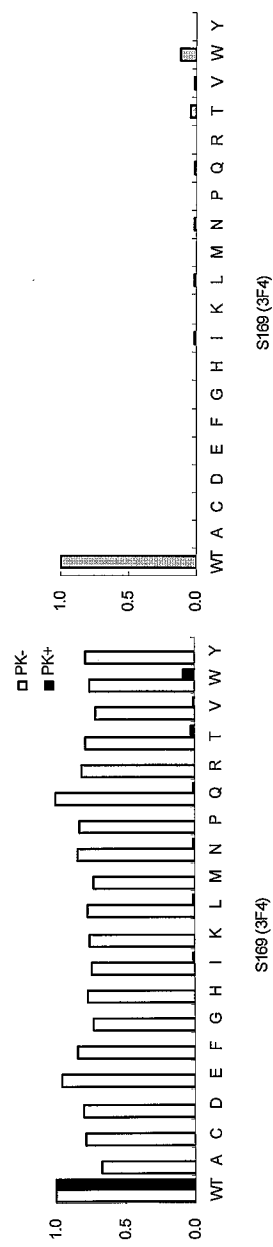
[図98]



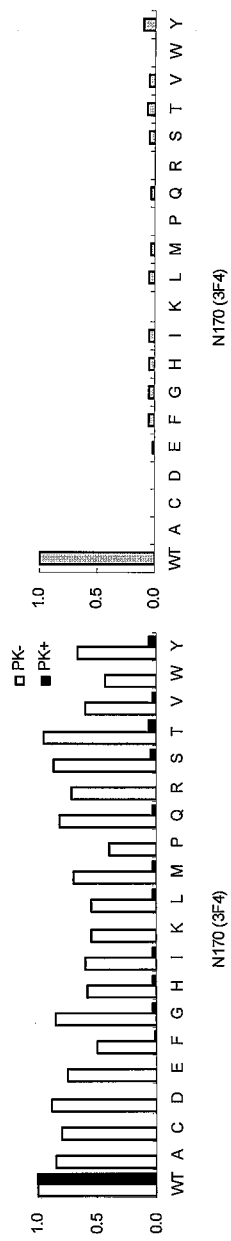
[図100]



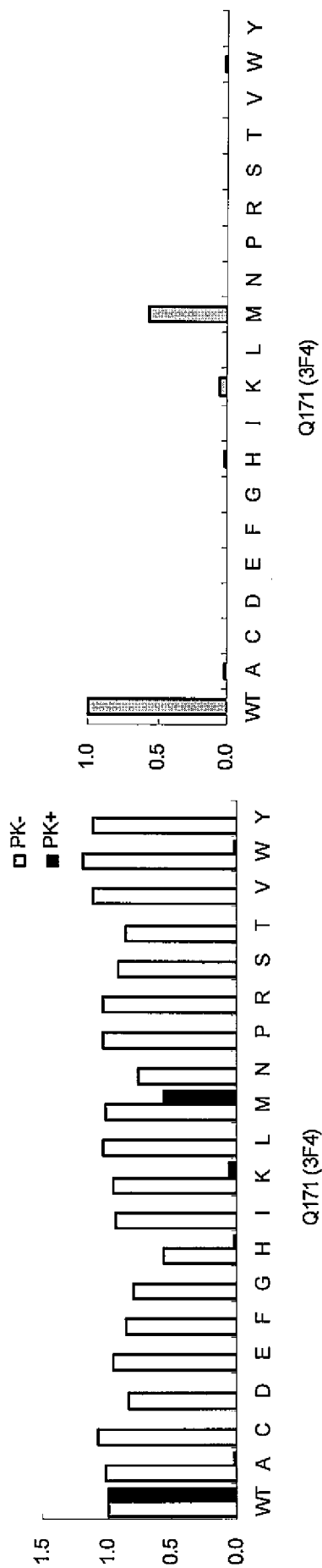
[図101]



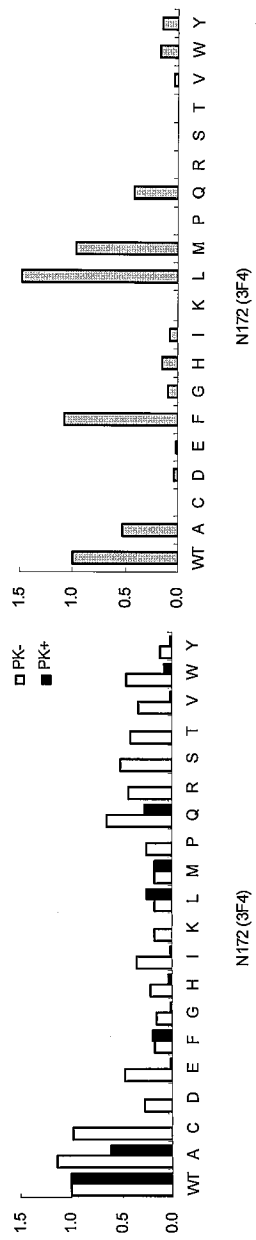
[図102]



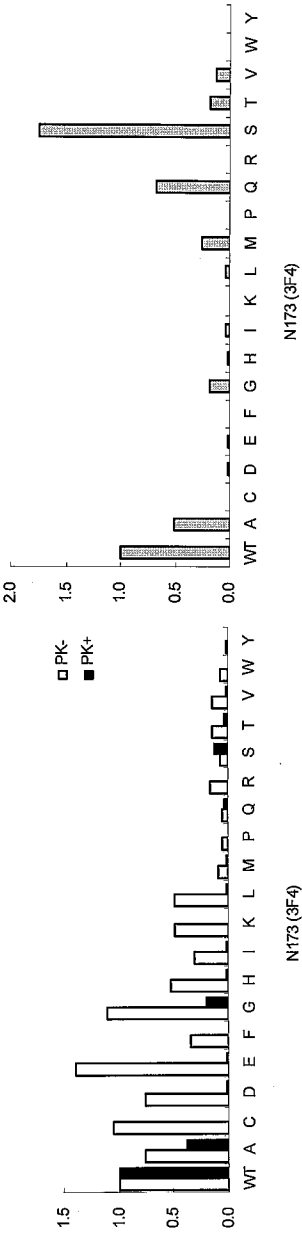
[図103]



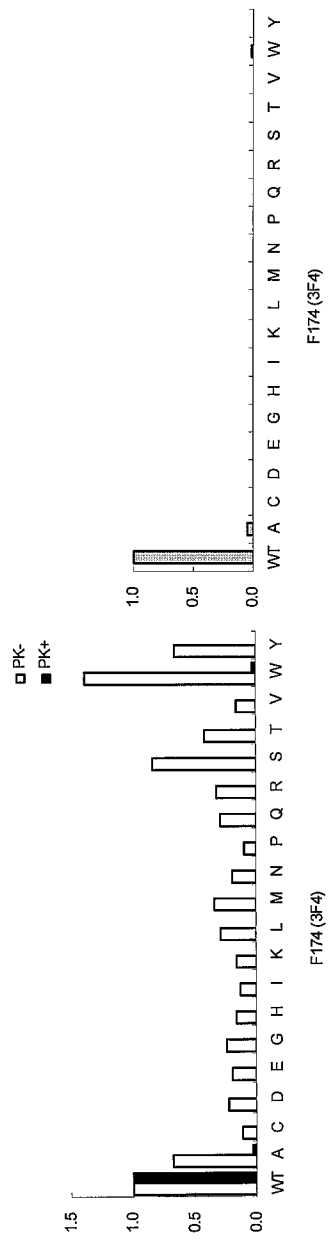
[図104]



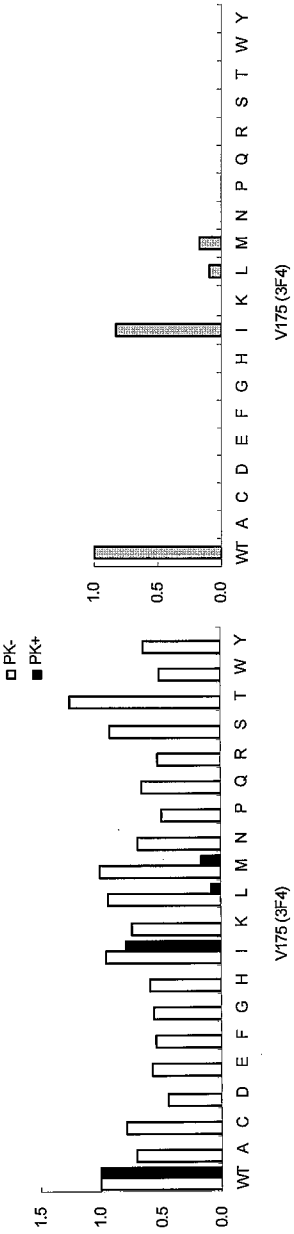
[図105]



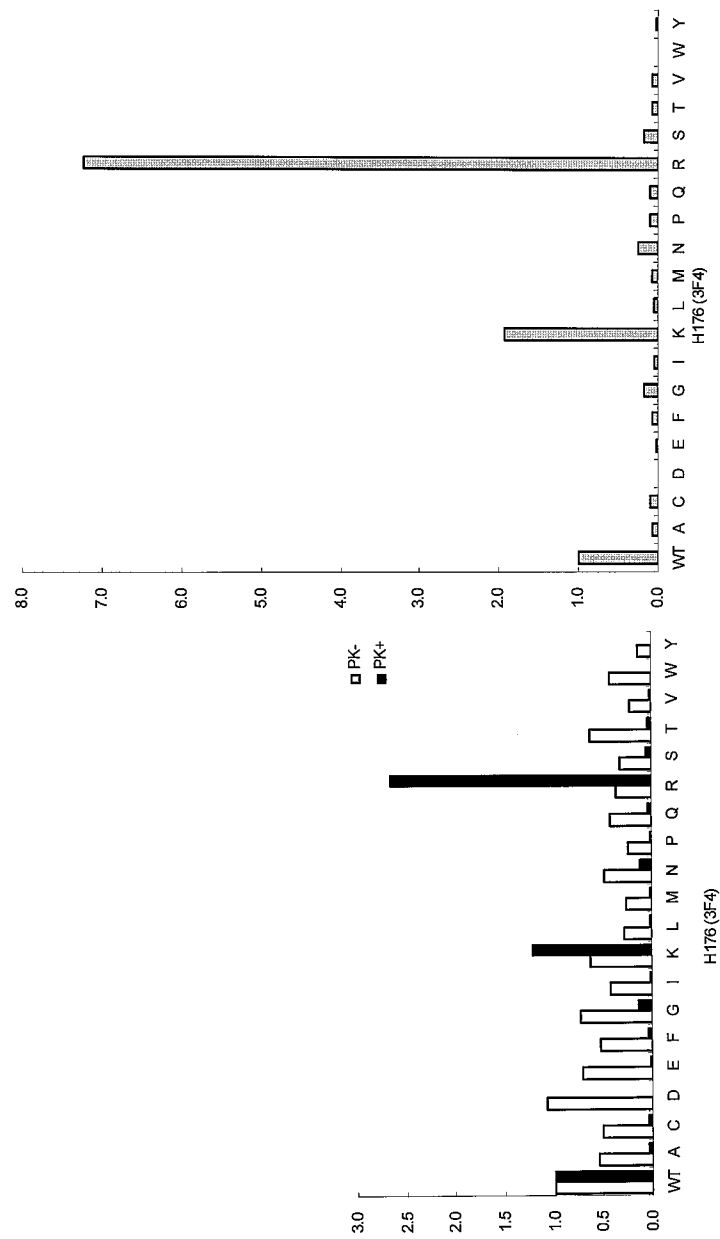
[図106]



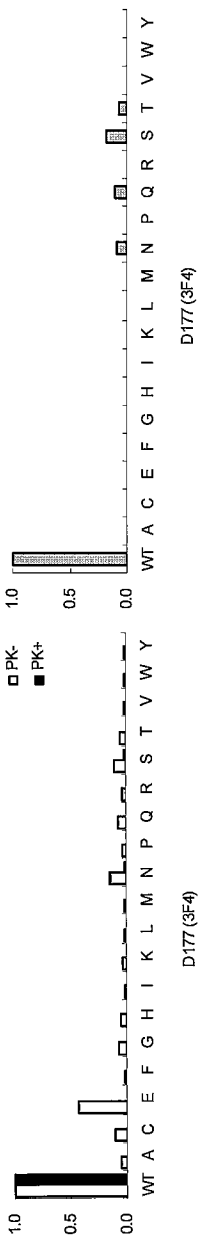
[図107]



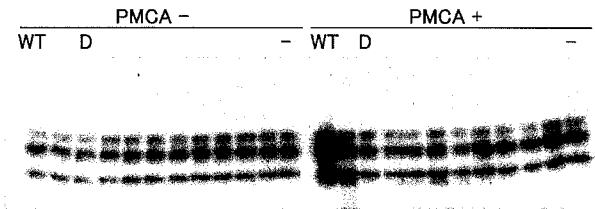
[図108]



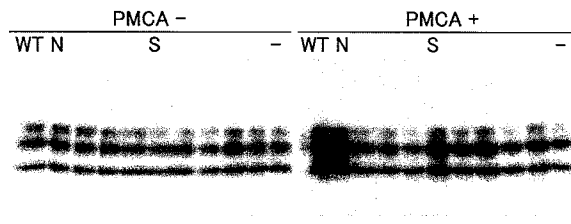
[図109]



[図110]



[図111]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i

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)

C12N15/09, A01K67/027, C07K14/47, C12Q1/00, 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/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2001/027152 A1 (ISIS INNOVATION LTD.), 19 April, 2001 (19.04.01), & JP 2003-512029 A & EP 1222203 A1	1-16
Y	JP 11-056365 A (SEIBUTSU BUNSHI KOGAKU KENKYUSHO K.K.), 02 March, 1999 (02.03.99), (Family: none)	1-16
Y	WO 2001/042453 A1 (BIOMOLECULAR ENG. RES. INST.), 14 June, 2001 (14.06.01), & JP 2001-544328 A	1-16

☒ 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
08 May, 2007 (08.05.07)

Date of mailing of the international search report
22 May, 2007 (22.05.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052342

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 1998/036059 A2 (DEUT. KREBSFORSCHUNGSZENTRUMSTIFTUNG et al.), 20 August, 1998 (20.08.98), & JP 2001-512311 A & EP 0972036 B1 & US 6593105 B1	1-16
Y	WO 2004/007546 A1 (EIDGENOESSISCHE TECH. HOCHSCHULE), 22 January, 2004 (22.01.04), & JP 2006-514536 A & EP 1521772 A1 & US 2005/0244806 A1	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i,

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（I P C））

Int.Cl. C12N15/09, A01K67/027, C07K14/47, C12Q1/00, 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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 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 / MEDLINE / WPIDS (STN), GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq, UniProt / Geneseq

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	WO 2001/027152 A1 (ISIS INNOVATION LTD.) 2001.04.19 & JP 2003-512029 A & EP 1222203 A1	1-16
Y	JP 11-056365 A (SEIBUTSU BUNSHI KOGAKU KENKYUSHO K.K.) 1999.03.02 (ファミリー無し)	1-16

☒ 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

0 8 . 0 5 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 5 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

齊 藤 真 由 美

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

8 9 3 1

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
Y	WO 2001/042453 A1 (BIOMOLECULAR ENG. RES. INST.) 2001.06.14 & JP 2001-544328 A	1-16
Y	WO 1998/036059 A2 (DEUT. KREBSFOR- SCHUNGSZENTRUM STIFTUNG et al.) 1998.08.20 & JP 2001-512311 A & EP 0972036 B1 & US 6593105 B1	1-16
Y	WO 2004/007546 A1 (EIDGENOESSISCHE TECH. HOCHSCHULE) 2004.01.22 & JP 2006-514536 A & EP 1521772 A1 & US 2005/0244806 A1	1-16

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. b の続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 紙形式

☒ 電子形式

c. 提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：