

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4324472号
(P4324472)

(45) 発行日 平成21年9月2日 (2009.9.2)

(24) 登録日 平成21年6月12日 (2009.6.12)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 C
G O 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
請求項の数 22 (全 65 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-530205 (P2003-530205)	(73) 特許権者	501279741
(86) (22) 出願日	平成14年9月13日 (2002.9.13)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ ミシガン
(65) 公表番号	特表2005-505273 (P2005-505273A)		アメリカ合衆国 ミシガン州 4 8 1 0 9
(43) 公表日	平成17年2月24日 (2005.2.24)		アン アーバー サウス ステイト ス トリート 3 0 0 3
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/029165	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02003/026566		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成15年4月3日 (2003.4.3)	(74) 代理人	100128048
審査請求日	平成17年9月9日 (2005.9.9)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	60/323, 997	(72) 発明者	フィンク ジョン ケー.
(32) 優先日	平成13年9月21日 (2001.9.21)		アメリカ合衆国 ミシガン州 アン アー バー プレイシッド ウェイ 2 3 6 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/242, 008		
(32) 優先日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アトラスチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 被験者から提供された試料において、アトラスチン遺伝子を配列番号：1を含む対照遺伝子配列と比較する段階、および

b) アトラスチン遺伝子中の1つまたは複数の差異の有無を検出する段階、を含む、HSPおよびHSPの発症リスクを検出する方法。

【請求項 2】

差異が単一ヌクレオチド多型性である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

差異がアトラスチンのフレームシフト変異を引き起こす、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

差異がアトラスチンにおいてスプライス変異を引き起こす、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

差異がアトラスチンにおいて非保存的なアミノ酸置換、挿入、および欠失を引き起こす、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

差異が表1に示される変異からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

段階b)における検出がハイブリダイゼーション解析によって行われる、請求項1記載の方法。

10

20

【請求項 8】

段階b)における検出が、核酸配列を野生型アトラスチンの核酸配列と比較する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

配列番号：1、3、4、および5からなる群より選択される配列を含む単離された核酸。

【請求項 10】

異種プロモーターに機能的に連結された、請求項9記載の核酸。

【請求項 11】

請求項10記載の核酸を含むベクター。

【請求項 12】

請求項11記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 13】

動物および植物細胞からなる群より選択される、請求項12記載の宿主細胞。

【請求項 14】

生物体中に存在する、請求項13記載の宿主細胞。

【請求項 15】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 16】

a) 被験者から提供された試料において、アトラスチン遺伝子を配列番号：1を含む対照遺伝子配列と比較する段階、および

b) アトラスチン遺伝子中の1つまたは複数の差異の有無を検出する段階、を含む、HSPおよびHSPの発症リスクを検出する方法であって、該配列の差異は、アトラスチン遺伝子の883位のヌクレオチドにおけるシトシンからチミンへの変化、アトラスチン遺伝子の941位のヌクレオチドにおけるアデニンからグアニンへの変化、およびアトラスチン遺伝子の944位のヌクレオチドにおけるシトシンからアデニンへの変化からなる群より選択される、方法。

【請求項 17】

検出がハイブリダイゼーション解析によって行われる、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

検出が、核酸配列を野生型アトラスチンの核酸配列と比較する段階を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 19】

差異が、239位におけるRからCへのアミノ酸変化を引き起こす、請求項1記載の方法。

【請求項 20】

差異が、258位におけるHからRへのアミノ酸変化を引き起こす、請求項1記載の方法。

【請求項 21】

差異が、259位におけるSからYへのアミノ酸変化を引き起こす、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

a) 被験者から提供された試料において、アトラスチン遺伝子を配列番号：1を含む対照遺伝子配列と比較する段階、

b) アトラスチン遺伝子中の1つまたは複数の差異の有無を検出する段階、を含む、HSPおよびHSPの発症リスクを検出する方法であって、該差異は、239位におけるRからCへのアミノ酸変化、258位におけるHからRへのアミノ酸変化、および259位におけるSからYへのアミノ酸変化からなる群より選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は国立衛生研究所からの助成金2R01NS33645-05および1R01NS38713、ならびに復員軍人省からの助成金により、部分的に政府の支援を受けている。本発明において政府は特定の権利を有する。

10

20

30

40

50

【0002】

発明の技術分野

本発明は「アトラスチン」と命名された新規遺伝子およびその翻訳されたペプチド産物、ならびにそれに由来する方法および組成物に関する。より具体的には、本発明は遺伝性痙性対麻痺（HSP）および関連疾患の、診断および治療のためのアトラスチンの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

遺伝性痙性対麻痺（HSP）は、潜行性の進行性の下肢の衰弱および痙縮によって特徴づけられ、アメリカには数千人、世界全体では数万人の患者がいる。発症年齢は様々である。車イスが必要になる場合も多い。HSPは、神経障害が、進行性の下肢の痙攣性衰弱、緊張性排尿障害、下肢の振動感覚の軽度の減退、および時には関節の位置感覚の減退に限定される場合には「非複合型」または「純粋型」に分類される。真性糖尿病のような他の合併症が無く、非複合型HSPに見られる障害に伴って、発作、痴呆、筋委縮、錐体外路障害、または末梢神経障害のような他の神経性所見または他の系の関与が見られる場合には「複合型」に分類される。

10

【0004】

現在、非複合型HSPの診断は、典型的な臨床的特徴が存在し、かつ考えうる別の診断が除外されることで確立される。HSPの臨床的特徴には、潜行性で進行性の両側下肢の衰弱、および腸腰筋、膝窩腱、および前脛骨筋で最大となる筋緊張の上昇；しばしば遠位下肢における軽度の振動感覚障害を伴う、下肢反射亢進および足底伸筋反射；ならびに同様な疾患の家族歴が含まれる。脳および脊髄の磁気共鳴映像法(MRI)では、正常であるか、または薄い脳梁および/もしくは脊髄萎縮が示される可能性がある。大部分の患者では、遺伝性痙性対麻痺の診断は、除外的診断である。鑑別診断（多発性硬化症、脊髄の関与する構造的異常、B12欠損、副腎脊髄神経障害、および他の白質萎縮症、ならびにドーパ応答性失調症を含む）を充分検討する必要がある。

20

【0005】

いくつかの検査室では、スパスチンおよびプロテオリピドタンパク質(PLP)遺伝子の変異 (mutation) を検査する分子遺伝学検査が行われている。他の型のHSPの出生前検査は、研究段階で、検討されている。

30

【0006】

上述のように、現在のところHSPの診断は一般的に他の疾患の排除によるもの、および家族歴の観察である。他の除外的診断と同様に、患者は誤診される可能性があり、実際に誤診されている。HSPの正確な診断検査法およびこの衰弱性の疾患の治療のための新しい方法が必要とされている。

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

本発明は一般的に、遺伝性痙性対麻痺（HSP）の診断および治療のための組成物および方法に関する。本発明は特定の診断および治療方法に限定することは意図しない。本発明の配列は、進行性でしばしば麻痺が起こるHSP疾患の原因と同定された。HSPにはいくつかの種類がある。本発明の遺伝子は、第14染色体上で、「SPG3遺伝子座」として知られる領域にある。本発明は、HSPならびに脊髄損傷および筋萎縮性側索硬化症を含む他の脊髄疾患のような、神経変性性疾患の治療法の開発を推し進める組成物および方法を提供する。

40

【0008】

1つの態様では、本発明は天然および変異配列（例えば、1つまたは複数の多型を含むアトラスチン）を含む、図2に示されるアトラスチン遺伝子（配列番号：1）の少なくとも断片をコードする単離核酸またはタンパク質（配列番号：2）を考慮する。本発明は特定の機構に限定されず、機構の理解は本発明の実施に不要であるが、アトラスチンは、グアニ

50

ン結合/GTPアーゼ活性部位をともに特徴づける種間で保存されたモチーフ（P-ループ、DxxGモチーフおよびRDループ）を含む。アトラスチンの1次配列および2次構造は、いくつかのGTPアーゼと有意な相同性を示す。

【0009】

別の態様では、核酸はポリペプチド断片をコードする。本発明を断片の性質またはサイズによって限定することは意図しない。さらに別の態様では、核酸は融合タンパク質をコードする。また、本発明はアトラスチン遺伝子の変異を含み、配列番号：3、4、および5と呼ばれる単離配列に関する。

【0010】

本発明を上述のペプチドまたはその一部をコードする核酸（「トランスジーン」）の特定の性質について、限定することは意図しない。1つの態様では、核酸は、ベクター中に含まれる。別の態様では、ベクターは宿主細胞中にある。さらに別の態様では、ベクターはトランスジェニック動物中にある。さらに、遺伝子は、トランスジェニック動物のゲノム中に組み込まれる可能性がある。特定の態様では、本発明のトランスジェニック動物は、誘導性の、組織特異的なプロモーター中に含まれるトランスジーンを用いて作製される。

10

【0011】

本発明は上述のcDNAから転写されるRNA、およびこのRNAから翻訳されるタンパク質（通常は精製されたタンパク質）も考慮する。さらに、本発明はこの翻訳されたタンパク質で免疫して産生した抗体も考慮する。

20

【0012】

本発明の態様は、特定の利用法や理論に限定されないが、SPG3-関連HSPの原因としてアトラスチン遺伝子の変異を発見し、それによってHSPを診断し、遺伝カウンセリングを行なう能力を提供する。SPG3-関連HSPは常染色体優性HSPの～9%であるので、アトラスチン遺伝子変異を検査すれば、この形式での常染色体優性HSPの診断検査が可能になる。さらに、早期発症型ADHSPの11家系のうち、3家系でアトラスチンの変異が観察されたことは、この遺伝子の変異が小児で発症するADHSPには比較的一般的な原因であることを示唆する。正常および変異アトラスチン機能の解析を行えば、SPG3-関連HSPおよび他の関連する神経変性性疾患の分子病態生理学の洞察が得られる。

【0013】

30

本発明は、スクリーニングアッセイ法における上述の組成物の使用も考慮する。本発明は特定のスクリーニング方法に限定されない。1つの態様では、形質転換した細胞株等の細胞が使用されるが、これに限定されない。別の態様では、初代細胞が使用される。本発明はトランスフェクション構築物の性質に限定されない。使用するトランスフェクション構築物は、アッセイ法の設定時において、選択された細胞株で利用できる最適な構築物である。1つの態様では、本発明はトランスフェクトされた細胞株を利用した系における、疑われる化合物（例えば、薬剤候補）のスクリーニングを考慮する。1つの態様では、細胞は一過性にトランスフェクトされる。別の態様では、細胞は安定的にトランスフェクトされる。さらに別の態様では、本発明の翻訳産物は、無細胞アッセイ系で使用される。さらに別の態様では、本発明の翻訳産物に対して産生された抗体は、免疫沈降アッセイ法またはインビボで使用される。

40

【0014】

さらに、本発明はアトラスチンの結合パートナーおよび相互作用するタンパク質を同定するためにも使用される。1つの態様では、本発明の翻訳産物に対して産生された抗体を、免疫沈降実験で使用し、アトラスチンと相互作用するペプチドを単離する。別の態様では、本発明は、相互作用するタンパク質を同定するために使用される融合タンパク質の産生に使用される。さらに別の態様では、酵母ツーハイブリッド系を用いてスクリーニングが行われる。

【0015】

別の態様では、本発明のペプチドはマイクロチップアッセイで使用される。例えば、本

50

発明は、a) 任意の順序で、i) 調べる種のライブラリーから得られたペプチドまたはペプチド断片を含む第一の固相支持体（例えば、マイクロチップ）、およびii) 配列番号：1のDNAによってコードされるペプチドまたはその一部、を提供する段階と；b) マイクロアッセイマイクロチップに、結合が起こる条件下でペプチドを接触させる段階とを含むスクリーニング法を考慮する。

【0016】

本発明は、アトラスチンの新しい相同体またはその天然の変異を同定するためにも使用される。本発明は標準的な分子手順を用いた相同体のスクリーニングを考慮する。1つの態様では、スクリーニングはノーザンおよびサザンブロットティングを用いて行われる。

【0017】

本発明は、a) 任意の順序で、i) 配列番号：1のオリゴヌクレオチド配列の少なくとも一部を含めた組換え発現ベクターを含む第1の細胞群、およびii) 被験化合物、を提供する段階と；b) 化合物を第1および第2の細胞群に接触させる段階と；c) 化合物の効果を検出する段階とを含む、化合物のスクリーニング方法を考慮する。この方法は、配列番号：3、4、および5を用いても使用できる。別の態様では、化合物の効果は、当技術分野で周知の方法による、GTPアーゼのスクリーニングによって検出される。さらに別の態様では、第2の細胞群は、適当な対照（例えば、空のベクター）を含めた、組換え発現ベクターを含む。

【0018】

本発明は、a) 任意の順序で、i) 配列番号：1の配列の少なくとも一部を含む核酸、およびii) 相同体を含むと考えられる細胞または組織から得られたDNAライブラリー、を提供する段階と；b) 相同体をコードすると考えられるDNAが検出される条件下で、ライブラリーのDNAを第1または第2の核酸にハイブリダイズさせる段階とを含む、相同体のスクリーニング方法も考慮する。この方法は、配列番号：3、4、および5を用いても使用できる。

【0019】

本発明は、a) 任意の順序で、i) 配列番号：2のペプチド配列の少なくとも一部を含むペプチド（融合タンパク質、例えば、タンパク質精製に有用な部分等の別の部分を含むタンパク質、の一部である部分を含むがこれに限定されない）、およびb) 相互作用するペプチドを持つと考えられる供給源（例えば、細胞または組織）からの抽出物、を提供する段階と；c) 相互作用するペプチドが検出される条件下でペプチドと抽出物とを混合する段階とを含む、相互作用するペプチドのスクリーニング方法も考慮する。この方法は、配列番号：3、4、および5の翻訳産物の少なくとも一部を用いても使用できる。

【0020】

本発明はa) 任意の順序で、i) 配列番号：2の配列を持つペプチドの少なくとも一部と反応する（例えば、特異的な）抗体、およびii) 相互作用するペプチドを持つと考えられる供給源（例えば、細胞または組織）からの抽出物、を提供する段階と；b) 相互作用するペプチドが検出される条件下で抗体と抽出物とを混合する段階とを含む、相互作用するペプチドのスクリーニング方法も考慮する。この方法は、配列番号：3、4、および5の翻訳産物の少なくとも一部と反応する抗体を用いても使用できる。

【0021】

本発明は、アトラスチン遺伝子またはその一部を発現する細胞株の作製を考慮する。本発明は特定の細胞株（例えば、神経または非神経細胞）に限定されない。

【0022】

本発明は、a) アトラスチンDNA（例えば、配列番号：1）またはその一部が、i) 固相支持体表面に接着しているか、ii) 懸濁液中に入れているかのいずれかであり、b) DNAに結合すると考えられる化合物を、結合が促進される様式で添加し、c) 結合を測定する、DNA結合アッセイ法を考慮する。使用する検出方法は、染色、ゲル電気泳動、および分光光度法を含むが、これらに限定されない。この方法は、配列番号：3、4、および5の少なくとも一部を用いても使用できる。

10

20

30

40

50

【0023】

本発明は、ハイスループットスクリーニング法を考慮する。そのような方法には、DNAアレイアッセイ法、分光光度法、質量分析法、ロボットの利用、コンピュータ化したアッセイ系、および市販のシステムの利用を含むが、これらに限定されない。

【0024】

本発明は、アトラスチンの結合部位に結合するタンパク質のスクリーニングを考慮する。本発明は、特定のアッセイ法に限定されない。1つの態様では、本発明の配列（配列番号：1、3、4、および5によってコードされるタンパク質またはその一部）をコードするDNAを固相表面（例えば、マイクロチップ）に結合させ、そのDNA配列に結合すると考えられるタンパク質をDNAと接触させる。結合したタンパク質を当技術分野で周知の方法によって解析する。

10

【0025】

本発明は、変異アトラスチン遺伝子の出生前検査を考慮する。そのような技術は、当技術分野で周知である。例えば、変異アトラスチンアルルに関して、親または胎児をスクリーニングできる。

【0026】

本発明はa) 任意の順序で、i) 調べる種のDNAライブラリーから得られる核酸を含む第1の固相支持体、およびii) 配列番号：1、3、4、および5ならびにその一部からなる群より選択されるオリゴヌクレオチド、を提供する段階と；b) ハイブリダイゼーションが起きる条件下で固相支持体にオリゴヌクレオチドを接触させる段階とを含む方法を考慮する。1つの態様では、本発明は、固相支持体がマイクロチップであることを考慮する。

20

【0027】

本発明は、a) 任意の順序で、i) 配列番号：1、3、4、および5ならびにその一部からなる群より選択されるオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を含めた組換え発現ベクターを含む第1細胞群、ii) ベクターに空のベクターを含めた組換え発現ベクターを含む第2の細胞群、およびiii) 被験化合物、を提供する段階と；b) 第1および第2の細胞群に化合物を接触させて、セロトニン作動性（serenergic）受容体生成細胞またはセロトニン放出細胞を産生する段階と；c) セロトニン作動性受容体生成またはセロトニン放出が検出される条件下で細胞を培養する段階とを含む、化合物のスクリーニング方法を考慮する。

【0028】

本発明は、a) 任意の順序で、i) 配列番号：1、3、4、および5ならびにその一部からなる群より選択されるオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を含む核酸、およびii) 相同体を含むと考えられる細胞または組織から得られるDNAライブラリー、を提供する段階と；b) 相同体をコードすると考えられるDNAが検出される条件下で、ライブラリーのDNAを第1または第2の核酸とハイブリダイズさせる段階とを含む、相同体のスクリーニング方法を考慮する。

30

【0029】

本発明は、a) 任意の順序で、i) 配列番号：2のペプチド配列の少なくとも一部を含むペプチド、およびii) 1つまたは複数の相互作用するペプチドを持つと考えられる供給源からの抽出物、を提供する段階と；c) 1つまたは複数の相互作用するペプチドが検出される条件下で、ペプチドと抽出物とを混合する段階とを含む方法を考慮する。1つの態様では、ペプチドは融合タンパク質である。

40

【0030】

本発明は、a) 任意の順序で、i) 配列番号：2の配列を持つペプチドの少なくとも一部と反応する抗体、およびii) 1つまたは複数の相互作用するペプチドを持つと考えられる供給源からの抽出物、を提供する段階と；b) 1つまたは複数の相互作用するペプチドが検出される条件下で、抗体と抽出物とを混合する段階とを含む方法を考慮する。1つの態様では、ペプチドは融合タンパク質である。

【0031】

1つの態様では、本発明は、a) アトラスチン遺伝子を含む核酸を被験者から提供する段

50

階；およびb) アトラスチン遺伝子中で1つまたは複数の差異 (variation) の有無を検出する段階を含む、HSPを有する被験者およびHSPを発症するリスクを有する被験者を同定する方法を考慮する。別の態様では、本発明はさらにc) 1つまたは複数の差異の有無に基づいて被験者がHSPを発症するリスクを有するかどうかを決定する段階を考慮する。さらに別の態様では、本発明は、差異が単一スクレオチド多型であると考慮する。また別の態様では、本発明は差異がアトラスチン遺伝子中にフレームシフト変異を引き起こすと考慮する。さらに別の態様では、本発明は、差異がアトラスチン遺伝子中にスプライス変異を引き起こすと考慮する。さらに別の態様では、本発明は、変異はアトラスチン中で非保存的なアミノ酸置換、挿入、および欠失を引き起こすと考慮する。さらに別の態様では、本発明は、差異が表1に示される変異からなる群より選択されると考慮する。さらに別の態様では、本発明は、段階b)における検出がハイブリダイゼーション解析によって実施されうると考慮する。さらに別の態様では、本発明は段階b)における検出が、核酸配列を野生型アトラスチンの核酸配列と比較する段階を含むと考慮する。

10

【0032】

1つの態様では、本発明は、a) アトラスチンプロテアーゼを含む血液試料を患者から提供する段階；およびb) アトラスチンプロテアーゼの1つまたは複数の差異の有無を検出する段階を含む、HSPを有する被験者およびHSP発症リスクを有する被験者の同定方法を考慮する。別の態様では、本発明は、段階b)における検出は、抗体アッセイ法によって実施されると考慮する。

【0033】

20

1つの態様では、本発明は、変種アトラスチンアシルを特異的に検出する能力のある検出アッセイ法を含む、被験者がHSPまたはHSP発症リスクを有するかどうかを決定するためのキットを考慮する。別の態様では、本発明は、表1に示される変異からなる群より選択される少なくとも1つの変異を含む核酸配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブを、検出アッセイ法に含むキットを考慮する。

【0034】

1つの態様では、本発明は、変種アトラスチンGTPアーゼを特異的に検出する能力のある検出アッセイ法を含む、被験者がHSPまたはHSP発症リスクを有するかどうかを決定するためのキットを考慮する。別の態様では、本発明は、野生型アトラスチンおよび少なくとも1つのアミノ酸変異を含むアトラスチンからなる群より選択されるアトラスチンに結合する能力のある抗体を、検出アッセイに含むキットを考慮する。

30

【0035】

1つの態様では、本発明は配列番号：1、3、4、および5からなる群より選択されるポリペプチドをコードする配列を含む単離された核酸を考慮する。1つの態様では、本発明は、核酸配列を異種プロモーターに機能的に連結することを考慮する。さらに別の態様では、本発明は、ベクター中に含まれる、核酸配列を考慮する。さらに別の態様では、本発明は、前記態様のベクターを含む宿主細胞を考慮する。さらに別の態様では、本発明は、動物および植物細胞からなる群より選択される、前記態様の宿主細胞を考慮する。さらに別の態様では、本発明は、生物体中に存在する、前記態様の宿主細胞を考慮する。

【0036】

40

1つの態様では、本発明は、配列番号：1、3、4、および5からなる群より選択される配列を含む、単離された核酸配列を考慮する。1つの態様では、本発明は、表示された配列番号：1、3、4、および5をコードする、コンピュータで読み込める媒体を考慮する。

【0037】

1つの態様では、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを考慮する。別の態様では、本発明は、表示された配列番号：2のポリペプチドをコードする、コンピュータで読み込める媒体を考慮する。

【0038】

1つの態様では、本発明は、a) アトラスチン遺伝子を含む核酸を被験者から提供する段階；およびb) アトラスチン遺伝子中に1つまたは複数の差異の有無を検出する段階を含む

50

、HSPのアリルを有するリスクのある被験者を同定する方法を考慮する。別の態様では、本発明は、さらにc) 1つまたは複数の差異の有無に基づいて、被験者HSPを有するリスクがあるかどうかを判断する段階を含む。

【0039】

1つの態様では、本発明は、疾患の兆候が軽減するように治療有効量のアトラスチンを投与する段階を含む、HSPの患者の治療方法を考慮するが、ここで、アトラスチンは、組換えアトラスチン；合成アトラスチン；組換えアトラスチンの変異体、変種、断片、および融合体；ならびに合成アトラスチンの変異体、変種、断片、および融合体からなる群より選択される。

【0040】

定義

本発明を理解するために以下の定義を提供する。

【0041】

「遺伝性痙性対麻痺(HSP)」は、主な症状が、潜行性の進行性下肢衰弱および痙縮である、臨床および遺伝的に多様な疾患の群として定義される。この疾患ファミリーの他の名前は以下に示すが、これらは本明細書においてはHSPと同義と見なす。

FSP 家族性痙攣性麻痺 (familial spastic paraplegia、およびfamilial spastic paraparesis)

HSP 遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia、またはhereditary spastic paraparesis)

シュトリュンペル病

シュトリュンペル-ローライン病

痙性脊髄麻痺

進行性脊髄両麻痺

痙性対麻痺

遺伝性進行性痙性対麻痺

SPG 痙性対麻痺

SSP 痙性脊髄麻痺

トロイヤー(Troyer)症候群 (複合型HSPの特定の変種)

シルバー症候群

原発性側索硬化症

家族性脳性麻痺

家族性両側麻痺

フレンチセツルメント(French settlement)病 (FSD)

【0042】

「HSPの発症リスク有する」または同等の用語は、遺伝的素因もしくは環境要因、またはその両方のために、一般集団と比較したときにHSPを発症する傾向が高い個体を指す。

【0043】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって結合したアミノ酸を含む化合物を指し、互換的に使用される。遺伝子によってコードされた「タンパク質」または「ポリペプチド」は、遺伝子によってコードされたアミノ酸配列に限定されず、タンパク質の翻訳後修飾も含む。

【0044】

本明細書で使用される「アミノ酸配列」という用語は、タンパク質分子のアミノ酸配列を指すが、「ポリペプチド」または「タンパク質」のような「アミノ酸配列」および同様な用語は、アミノ酸配列を、述べられたタンパク質分子に関連する完全で天然のアミノ酸配列に限定するわけではない。さらに、「アミノ酸配列」は、タンパク質をコードする核酸配列から推定できる。

【0045】

タンパク質に関して使用される「一部」という用語は(「所定のタンパク質の一部」な

10

20

30

40

50

ど)、そのタンパク質の断片を指す。断片のサイズは、4アミノ酸残基から、全アミノ酸配列より1つ少ないアミノ酸配列までの範囲であり得る。

【0046】

ポリペプチドに関して使用される「キメラ」という用語は、共にクローニングされ、翻訳後に単一のポリペプチド配列として作用する、異なる遺伝子から得られた2つまたはそれ以上のコード配列の発現産物を指す。キメラポリペプチドは「ハイブリッド」ポリペプチドとも呼ばれる。コード配列には、同一生物種または異なる生物種から得られた配列が含まれる。

【0047】

ポリペプチドに関して使用される「融合」という用語は、外来タンパク質断片（融合パートナー）に結合された対象タンパク質を含む、キメラタンパク質を指す。融合パートナーは、対象ポリペプチドの溶解度を上げること、ならびに宿主細胞もしくは上清またはその両方から組換え融合ポリペプチドを精製可能にする「アフィニティタグ」を提供することを含む、様々な機能が提供され得る。必要ならば、融合パートナーは、精製後または精製中に、対象タンパク質から除去しても良い。

【0048】

ポリペプチドに関して使用される「相同体」または「相同な」という用語は、2つのポリペプチドの間の高度な配列の同一性、または3次元構造間の高度の類似性、または活性部位および作用機序の間の高度の類似性を指す。好ましい態様では、相同体は、参照配列に対して、60%を超える配列の同一性、およびより好ましくは75%を超える配列の同一性、およびさらに好ましくは90%を超える配列の同一性を持つ。

【0049】

ポリペプチドに使用される場合の「実質的な同一性」という用語は、デフォルトギャップウェイトを用いたGAPまたはBESTFITプログラムなどにより、最適に整列させたときに、2つのポリペプチド配列が、少なくとも80%の配列の同一性、好ましくは少なくとも90%の配列の同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列の同一性またはそれ以上（例えば、99%の配列の同一性）を持つことを意味する。好ましくは、同一でない残基の位置は、保存的アミノ酸置換によって相違する。

【0050】

ポリペプチドに関して用いられる「変種 (variant)」または「変異 (mutant)」という用語は、互いに1つまたは複数のアミノ酸が異なるアミノ酸配列、通常は関連するポリペプチドを指す。変種は、置換されたアミノ酸が類似した構造または化学的性質を持つ、「保存的な」変化を持つ可能性がある。1つの種類の保存的アミノ酸置換は、同様な側鎖を持つ残基の互換性を指す。例えば、脂肪族の側鎖を持つアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族の水酸化側鎖を持つアミノ酸群は、セリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を持つアミノ酸群はアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を持つアミノ酸群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を持つアミノ酸群はリジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；ならびに硫黄含有側鎖を持つアミノ酸はシステインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換の群は：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミンである。より頻度は少ないが、変種は「非保存的」変化（例えば、トリプトファンによるグリシンの置換）を持つ場合がある。同様な小さな変化には、アミノ酸の欠失もしくは挿入（付加）、またはその両方が含まれることがある。生物活性を失わずにどのアミノ酸がいくつ置換、挿入、または欠失できるかを決定するためのガイドは、当技術分野で周知のコンピュータプログラム、例えば、DNASarソフトウェアを用いると分かる。変種は、機能アッセイ法で検定できる。好ましい変種は、10%未満、好ましくは5%未満、さらに好ましくは2%未満の変化（置換、欠失など）を持つ。

【0051】

ポリペプチドに関して使用される「ドメイン」という用語は、独特の構造および/また

10

20

30

40

50

は機能的特徴を持つポリペプチドの小区分を指す；通常は、この特徴は多様なポリペプチドにわたって類似している。小区分は、通常は隣接したアミノ酸を含むが、協調して働くアミノ酸、または折畳みまたは他の立体配置のために近接するアミノ酸も含む可能性がある。

【0052】

「遺伝子」という用語は、RNA、またはポリペプチドもしくはその前駆体（例えば、プロインスリン）を産生するために必要なコード配列を含む核酸（例えば、DNAまたはRNA）配列を指す。機能的なポリペプチドは、ポリペプチドの所望の活性または機能的性質（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達等）が保持されるかぎり、コード配列の任意の部分または全長のコード配列によってコードされ得る。遺伝子に関して使用される「一部」という用語は、その遺伝子の断片を指す。断片のサイズは、数ヌクレオチドから全遺伝子配列より1ヌクレオチド少ない配列までの範囲であり得る。したがって、「遺伝子の少なくとも一部を含むヌクレオチド」は、遺伝子の断片、または遺伝子全体を含む可能性がある。

10

【0053】

「遺伝子」という用語は、構造遺伝子のコード領域も含み、コード領域の5'末端および3'末端の両方から約1 kbの距離で隣接している配列も含むので、遺伝子は全長mRNAの長さに対応する。コード領域の5'側に存在し、かつmRNA上に存在する配列は、5'側非翻訳領域と呼ばれる。コード領域の3'側または下流に存在し、かつmRNA上に存在する配列は、3'側非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNAおよびゲノム型の両方を含む。ゲノム型または遺伝子クローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と呼ばれる非翻訳配列が割り込んだコード領域を含む。イントロンは、核RNA（hnRNA）に転写される、遺伝子中の部分である；イントロンは、エンハンサーのような調節要素を含む可能性がある。イントロンは、核転写物または1次転写物から除去または「スプライスアウト」される；したがって、イントロンはメッセンジャーRNA（mRNA）転写物には存在しない。mRNAは、翻訳の際に、新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列または順序を指定する役割を果たす。

20

【0054】

イントロン以外に、遺伝子のゲノム型はRNA転写物中に存在する配列の5'末端および3'末端の両方に存在する配列も含む可能性がある。これらの配列は「隣接」配列または領域と呼ばれる（これらの隣接配列は、mRNA転写物上に存在する非翻訳配列の5'側または3'側に存在する）。5'側翻訳領域は、遺伝子の転写を制御したり影響を与えたりするプロモーターおよびエンハンサーのような特定の調節配列を含む可能性がある。3'側隣接領域は、転写の終結、転写御切断、およびポリアダニル化を指示する配列を含む可能性がある。

30

【0055】

特に、「アトラスチン遺伝子」とは、全長アトラスチンヌクレオチド配列（例えば、配列番号：1に示す配列）を指す。しかし、この用語は、アトラスチン配列の断片、ならびに全長アトラスチンヌクレオチド配列を持つ他のドメインも含むことが意図される。さらに「アトラスチンヌクレオチド配列」または「アトラスチンポリヌクレオチド配列」という用語は、DNA、cDNA、およびRNA（例えば、mRNA）配列を含む。

40

【0056】

遺伝子に関して用いられる「異種」という用語は、天然の環境中に存在しない（ヒトの手によって改変された）要素をコードする遺伝子を指す。例えば、異種遺伝子は、1つの種から得られ、別の種に導入された遺伝子を含む。異種遺伝子は、ある生物には天然に存在するが何らかの改変（例えば、変異、複数コピーの添加、非天然プロモーターまたはエンハンサー配列への連結等）を受けた遺伝子も含む。異種遺伝子は、遺伝子のcDNA型を含む遺伝子配列を含む；cDNA配列はセンス（mRNAを産生する）またはアンチセンス（mRNA転写物に相補的なアンチセンスRNA転写物を産生する）のいずれかの方向で発現させてもよい。異種遺伝子の配列は、異種遺伝子によってコードされるタンパク質の遺伝子もしくは染色体中の遺伝子配列に天然には伴わないプロモーターのような調節要素を含むヌクレオ

50

チド配列に通常は連結されている、または天然には存在しない染色体の部分に伴う（例えば、遺伝子が通常発現されない遺伝子座から発現した遺伝子）という点で、異種遺伝子は内在性遺伝子と区別される。

【0057】

「対象ヌクレオチド配列」または「対象核酸配列」という用語は、当業者によって、何らかの理由（例えば、疾病の治療、質の改善等）でそれを操作することが望ましいと考えられる任意のヌクレオチド配列（例えば、RNAまたはDNA）を指す。そのようなヌクレオチド配列には、構造遺伝子（例えば、レポーター遺伝子、選択マーカー遺伝子、発癌遺伝子、薬剤耐性遺伝子、増殖因子等）のコード配列、およびmRNAまたはタンパク質産物をコードしない非コード調節配列（例えば、プロモーター配列、ポリアデニル化配列、終結配列、エンハンサー配列等）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0058】

遺伝子またはヌクレオチドもしくは核酸配列に関して使われる「構造」という用語は、最終的な発現産物がタンパク質（酵素または構造タンパク質）、rRNA、sRNA、tRNA等である、遺伝子またはヌクレオチドもしくは核酸配列を指す。

【0059】

「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド」または「核酸」という用語は、2つまたはそれ以上、好ましくは3つ以上、および通常は10以上のデオキシヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む分子を指す。正確なサイズは、多くの要素に依存し、これはオリゴヌクレオチドの最終的な機能または使用法に依存する。オリゴヌクレオチドは、化学合成、DNA複製、逆転写、またはその組み合わせを含む、任意の方法で作製できる。

20

【0060】

「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を持つオリゴヌクレオチド」または特定のポリペプチド「をコードする核酸配列」という用語は、遺伝子のコード領域を含む核酸配列、すなわち、遺伝子産物をコードする核酸配列を指す。コード領域は、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAの形で存在し得る。DNA型で存在する場合には、オリゴヌクレオチドは、一本鎖（センス鎖）または二本鎖であり得る。エンハンサー/プロモーター、スプライス連結部、ポリアデニル化シグナル等のような適当な制御要素は、必要ならば遺伝子のコード領域の近くに置き、1次RNA転写物の適切な転写開始および/または正しいプロセッシングが行われるようにできる。または、本発明の発現ベクターに利用されるコード領域は、内在性エンハンサー/プロモーター、スプライス結合部、介在配列、ポリアデニル化シグナル等、または内在性および外来の両方の制御要素の組み合わせを含む可能性がある。

30

【0061】

核酸分子に関して使用される「組換え」という用語は、分子生物学的手法によって連結された核酸の部分を含む核酸分子を指す。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される「組換え」という用語は、組換え核酸分子を用いて発現されたタンパク質分子を指す。

【0062】

「相補的な」および「相補性」という用語は、塩基対の規則によって結びつけられたポリヌクレオチド（ヌクレオチド配列）を指す。例えば、「A-G-T」という配列は、「T-C-A」という配列と相補的である。相補性は、核酸塩基の一部のみが塩基対の規則にしたがって合う「部分的」である場合がある。または核酸の間に「完全な」または「全体の」相補性がある場合もある。核酸の鎖の間の相補性の度合いは、核酸の鎖のハイブリダイゼーションの効率および強度に大きな影響を与える。これは、増幅反応、および核酸の間の結合に依存する検出方法で、特に重要である。

40

【0063】

核酸に関して使用される「相同性」という用語は、相補性の度合いを指す。部分的相同性または完全な相同性（同一性）があり得る。「配列の同一性」は、2つまたはそれ以上の核酸またはタンパク質の間の関係の尺度であり、比較した全長に対するパーセンテージ

50

として表される。同一性の計算は、各々のより大きな配列において同じ相対位置にある、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸を考慮して行われる。同一性の計算は、「GAP」(Genetic Computer Group, Madison, Wis)および「ALIGN」(DNASar, Madison, Wis)のようなコンピュータプログラム中に含まれるアルゴリズムによって実行できる。部分的に相補的な配列は、完全に相補的な配列が標的核酸にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害（またはこれと競合）する配列であり、「実質的に相同」という機能的用語が用いられる。完全に相補的な配列の標的配列へのハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジェンシーの条件で、ハイブリダイゼーションアッセイ法（サザンまたはノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて調べられる。実質的に相同な配列またはプローブは、低ストリンジェンシーの条件下で、完全に相補的な配列の標的への結合（ハイブリダイゼーション）と競合し、阻害する。これは、低ストリンジェンシーで非特異的結合が許されることを意味するものではない；低ストリンジェンシーの条件では、2つの配列の互いへの結合が、特異的な（選択的な）相互作用である必要がある。非特異的結合の欠如は、部分的な相補性さえも持たない（例えば、約30%未満の同一性）第2の標的を使用することによって検定できる；非特異的な結合がない場合、プローブは第2の非相補的な標的にはハイブリダイズしない。

【0064】

2つまたはそれ以上のポリヌクレオチドの間の配列の関係を記述するために、以下の用語が用いられる：「基準配列」、「配列の同一性」、「配列の同一性のパーセンテージ」、および「実質的同一性」。「基準配列」は、配列の比較の基準として使用される配列である；基準配列は、例えば、配列の一覧中に与えられた全長cDNA配列の部分のような、より大きな配列のサブセットであったり、完全な遺伝子配列を含む可能性がある。一般に、基準配列は、長さが少なくとも20ヌクレオチド、しばしば長さが少なくとも25ヌクレオチド、そして長さが少なくとも50ヌクレオチドであることが多い。2つのポリヌクレオチドは、各々(1) 2つのポリヌクレオチドの間で類似した配列を含み（ポリヌクレオチド配列全体の一部）、かつ、(2) さらに2つのポリヌクレオチドの間で異なる配列を含む可能性があるので、2つ（またはそれ以上）のポリヌクレオチドの間の配列の比較は、通常、「比較ウィンドウ」の2つのポリヌクレオチドの配列を比較し、局所領域の配列の類似性を同定および比較する。本明細書で使用される「比較ウィンドウ」は、少なくとも20の連続したヌクレオチド位置の概念的部分をさし、ここにおいて、ポリヌクレオチド配列は少なくとも20の連続したヌクレオチドの基準配列と比較されるが、ここで、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチドの部分は、2つの配列の最適な整列のために、基準配列（付加または欠失を含まない）と比較して20%以下の付加または欠失（ギャップ）を含む可能性がある。比較ウィンドウの整列のための配列の最適な整列は、SmithおよびWatermanの局所相同性アルゴリズム（SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)）、NeedlemanおよびWunschの相同性整列アルゴリズム（NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)）、PearsonおよびLipmanの類似性検索法（PearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988)）、これらのアルゴリズムのコンピュータ化した実行（Wisconsin Genetics Software Package リリース 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.のGAP, BESTFIT, FASTA, およびTFASTA）、または精査によって実施でき、種々の方法によって作製された最高の整列（比較ウィンドウ全体で最高の相同性の割合が得られる）が選択される。「配列の同一性」という用語は、2つのポリヌクレオチド配列が、比較ウィンドウ全体にわたって、同一である（ヌクレオチドごとに）ことを意味する。「配列の同一性のパーセンテージ」という用語は、比較ウィンドウにわたって最適に整列した2つの配列を比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、U、またはI）が両方の配列に出現する位置の数を決定し、一致した位置の数を出し、一致した位置の数を比較ウィンドウの位置の総数（ウィンドウサイズ）で割り、その結果を100倍して配列の同一性のパーセンテージを出す。本明細書で使用される「実質的に同一」という用語は、ポリヌクレオチドの特徴を意味し、少なくとも20ヌクレオチドの比較ウィンドウ、しばしば少なくとも25～50ヌクレオチドのウィンドウにわたって、基準配列と比較し

10

20

30

40

50

て、ポリヌクレオチドが少なくとも85パーセントの配列の同一性、好ましくは少なくとも90～95パーセントの配列の同一性、より一般的には少なくとも99パーセントの配列の同一性を持つことを意味するが、ここで配列の同一性のパーセンテージは、基準配列を比較ウィンドウ全体にわたって基準配列の20パーセント以下の欠失または付加を含む可能性のあるポリヌクレオチド配列と比較して、計算される。基準配列は、例えば、本発明で請求する組成物の全長配列の部分のような、より大きな配列のサブセットであっても良い。

【0065】

cDNAまたはゲノムクローンのような二本鎖核酸配列に関して使用される「実質的に相同」という用語は、上述のように低いから高ストリンジエンシーの条件下で、二本鎖核酸配列の片方または両方の鎖にハイブリダイズできる任意のプローブを指す。

10

【0066】

一本鎖核酸配列に関して使用される「実質的に相同」という用語は、上述のように低いから高ストリンジエンシーの条件下で、一本鎖核酸配列にハイブリダイズできる（すなわちこれに相補的な）任意のプローブを指す。

【0067】

「ハイブリダイゼーション」という用語は、相補的な核酸のペア形成を指す。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強さ（核酸間の結合の強さ）は、核酸間の相補性の度合い、条件のストリンジエンシー、形成したハイブリッドの T_m 、および核酸内のG:C比のような要素に影響される。それ自体の構造内に相補的な核酸のペア形成を含む単一分子は、「自己ハイブリダイズした」と呼ばれる。

20

【0068】

「 T_m 」という用語は、核酸の「融点」を指す。融点は、二本鎖核酸分子の群の半分が、一本鎖に解離する温度である。核酸の T_m を計算する式は、当技術分野で周知である。標準的な参考書に示される通り、核酸が1 M NaClの水溶液中にある場合、 T_m 値の単純な見積もりは、 $T_m = 81.5 + 0.41(\% G + C)$ で計算される（例えば、AndersonおよびYoung「定量的フィルターハイブリダイゼーション(Quantitative Filter Hybridization)」、「核酸ハイブリダイゼーション(Nucleic Acid Hybridization)」(1985)を参照されたい)。他の参考書には、 T_m の計算のために構造および配列の特性を考慮した、より洗練された計算が含まれている。

【0069】

30

「ストリンジエンシー」とは、核酸ハイブリダイゼーションが行われる温度、イオン強度、および有機溶媒のような他の化合物の存在の条件を指す。「高ストリンジエンシー」の条件では、相補的な塩基配列を高頻度を持つ核酸断片間でのみ、核酸塩基対が形成される。したがって、遺伝的に異なる生物に由来する核酸では、相補的配列の頻度が通常はより低いため、「低」ストリンジエンシーの条件がしばしば必要とされる。

【0070】

核酸のハイブリダイゼーションに関して使用される「低ストリンジエンシーの条件」とは、長さが約500ヌクレオチドのプローブが用いられたときに、5X SSPE (43.8 g/l NaCl、6.9 g/l NaH_2PO_4 (H_2O および1.85 g/l EDTA、NaOHでpHを7.4に調整)、0.1% SDS、5Xデンハルト試薬[(50Xデンハルトは500 mlあたり以下を含む：5 g フィコール(タイプ400、Pharmacia)、5 g BSA (フラクションV; Sigma))、および100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAの溶液中で42ECにて結合またはハイブリダイゼーション後、42ECにて5X SSPE、0.1% SDSを含む溶液で洗浄する条件と同等な条件である。

40

【0071】

核酸のハイブリダイゼーションに関して使用される「中程度のストリンジエンシー」という用語は、長さが約500ヌクレオチドのプローブが用いられたときに、5X SSPE (43.8 g/l NaCl、6.9 g/l NaH_2PO_4 (H_2O および1.85 g/l EDTA、NaOHでpHを7.4に調整)、0.5% SDS、5Xデンハルト試薬、および100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAの溶液中で42ECにて結合またはハイブリダイゼーション後、42ECにて1.0X SSPE、1.0% SDSを含む溶液で洗浄する条件と同等な条件である。

50

【0072】

核酸のハイブリダイゼーションに関して使用される「高ストリンジェンシー」という用語は、長さが約500ヌクレオチドのプロープが用いられたときに、5X SSPE (43.8 g/l NaCl, 6.9 g/l NaH_2PO_4 (H_2O および1.85 g/l EDTA、NaOHでpHを7.4に調整)、0.5% SDS、5Xデンハルト試薬、および100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAの溶液中で42ECにて結合またはハイブリダイゼーション後、42ECにて0.1X SSPE、1.0% SDSを含む溶液で洗浄する条件と同等な条件である。

【0073】

低ストリンジェンシーの条件を構成するために、様々な同等の条件が使用できることは周知である；プロープの長さおよび性質（DNA、RNA、塩基組成）、および標的の性質（DNA、RNA、塩基組成、溶液中か固定されているか等）、および塩および他の成分（例えば、ホルムアミド、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコールの有無）の濃度のような要素が考慮され、上述の条件とは異なるが同等な低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を生成するように、ハイブリダイゼーション溶液を変化させることができる。また、高ストリンジェンシーの条件下で、ハイブリダイゼーションを促進する条件も周知である（例えば、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄段階の温度を上げる、ハイブリダイゼーション溶液中にホルムアミドを使用する等）。

【0074】

遺伝子に関して用いられる「野生型」という用語は、天然に存在する供給源から単離された遺伝子の特性を持つ遺伝子を指す。遺伝子産物に関して用いられる「野生型」という用語は、天然に存在する供給源から単離された遺伝子産物の特性を持つ遺伝子産物を指す。ある物質に関して「天然に存在する」ということは、物質が天然に見つかる事実を指す。例えば、天然の供給源から単離できる生物（ウイルスを含む）中に存在し、実験室中でヒトによって意図的に修飾されていないポリペプチドまたはポリペプチド配列は、天然に存在する。野生型遺伝子は、母集団中に最も高頻度で観察され、したがって、その遺伝子の「正常」または「野生型」と任意に呼ばれる遺伝子である。対症的に、遺伝子または遺伝子産物に関して用いられる「修飾された」または「変異体 (mutant)」は、それぞれ、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較したときに、配列および/または機能的特性の修飾（改変した特性）を示す遺伝子または遺伝子産物である。天然に存在する変異体も単離され得る；これらは野生型遺伝子または遺伝子産物と比較したときに、改変された特徴を持つという事実で同定される。

【0075】

したがって、ヌクレオチド配列に関して用いられる「変種」または「変異」とは、通常は、関連した核酸配列で、互いに1つまたは複数のヌクレオチドが異なる核酸配列を指す。「差異 (variation)」は、2つの異なるヌクレオチド配列の間の相違である；通常、1つの配列が基準配列である。

【0076】

「多型性遺伝子座」とは、母集団中に存在する遺伝子座で、母集団のメンバーの間で変異を示すものを示す（最も一般的なアレルの頻度が0.95未満）。したがって、「多型性」は、母集団に2つまたはそれ以上の変種が存在することを指す。「単一ヌクレオチド多型」（またはSNP）は、少なくとも2つの異なるヌクレオチドのうちの1つによって占められる可能性のある、単一塩基の遺伝子座を指す。逆に、「単一型遺伝子座」は、母集団のメンバー間で変異がほとんどまたは全く見られない遺伝子座を指す（通常、母集団の遺伝子プール中で最も一般的なアレルの頻度が、0.95を超える遺伝子座）。

【0077】

「フレームシフト変異」とは、通常は、単一のヌクレオチド（または2つもしくは4つのヌクレオチド）の挿入または欠失に起因して、タンパク質をコードする構造DNA配列の正しい読み枠に変化が起きることを指す。変化した読み枠のために、通常は、翻訳されるアミノ酸配列が変化するか、切断される。

【0078】

10

20

30

40

50

「スプライス変異」とは、正しいRNAスプライシングに影響を与える遺伝子発現に影響を与える任意の変異を指す。スプライス変異は、スプライス部位を変化させるイントロン-エクソンの境界における変異によるものである可能性がある。

【0079】

「検出アッセイ法」という用語は、配列または変種核酸配列（例えばアトラスチン遺伝子のような特定の遺伝子のアレルにおける変異または多型など）の有無の検出、または特定のタンパク質（例えば、アトラスチン）もしくは特定のタンパク質の構造もしくは活性もしくは効果（例えば、アトラスチンGTPアーゼ活性）の有無の検出、または特定のタンパク質の変種の有無の検出のための、アッセイ法を指す。

【0080】

「アンチセンス」という用語は、二本鎖DNAのセンス鎖におけるデオキシリボヌクレオチド残基の配列と比較して、デオキシリボヌクレオチド残基の配列が逆の5'側から3'側方向になっているデオキシリボヌクレオチド配列を指す。二本鎖DNAの「センス鎖」は、天然の状態にある細胞によって、「センスmRNA」に転写される、二本鎖DNA中の鎖を指す。したがって、「アンチセンス」配列は、二本鎖DNAの非コード鎖と同じ配列を持つ配列である。「アンチセンスRNA」という用語は、標的一次転写物またはmRNAの全体または一部に相補的なRNA転写物で、その一次転写物またはmRNAのプロセッシング、輸送、および/または翻訳に干渉することによって、標的遺伝子の発現を阻止する物を指す。アンチセンスRNAの相補性は、特異的な遺伝子転写物の任意の部分、すなわち、5'側非コード配列、3'側非コード配列、イントロン、またはコード配列でよい。さらに、本明細書では、アンチセンスRNAは、アンチセンスRNAが遺伝子発現を阻止する有効性を増加するリボザイム配列の領域を含む可能性がある。「リボザイム」とは、触媒RNAを指し、配列特異的エンドリボヌクレアーゼを含む。「アンチセンス阻害」とは、標的タンパク質の発現を予防する能力のあるアンチセンスRNA転写物の産生を指す。

【0081】

「増幅」は、鋳型特異性を伴う核酸複製の特別な場合である。非特異的鋳型複製（すなわち、鋳型に依存するが、特定の鋳型に依存するわけではない複製）とは対照的である。本明細書では、鋳型特異性は、複製の忠実度（適切なポリヌクレオチド配列の合成）およびヌクレオチド（リボ-、またはデオキシリボ-）特異性とは区別される。鋳型特異性は、しばしば「標的」特異性とも呼ばれる。標的配列は、他の核酸の中からえり分けられるという意味で、「標的」である。増幅技術は、主にこのえり分けのために設計されてきた。

【0082】

大部分の増幅技術において、鋳型特異性は、酵素の選択によってなされてきた。増幅酵素は、使用される条件下で、核酸の雑多な混合物中で、特定の配列の核酸のみを処理する。例えば、Q β レプリカーゼの場合では、MDV-1 RNAがレプリカーゼの特異的な鋳型である（Kacianら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:3038 (1972)）。他の核酸は、この増幅酵素によって複製されない。同様に、T7 RNAポリメラーゼの場合は、この増幅酵素は、自分自身のプロモーターにストリンジェントな特異性を持つ（Chamberlainら、Nature, 228:27 (1970)）。T4 DNAリガーゼの場合は、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基質と鋳型の間に連結部でミスマッチがあると、2つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを連結しない（WuおよびWallace, Genomics, 4:560 (1989)）。最後に、TaqおよびPfuポリメラーゼは、高温で機能する能力があるために、プライマーで規定され、結合した配列に対して高度の特異性を示す；高温では、プライマーが標的配列とハイブリダイズするが、非標的配列とはハイブリダイズしない熱力学的条件が生じる（H.A. Erlich編、「PCRテクノロジー(PCR Technology)」、Stockton Press (1989)）。

【0083】

「増幅可能な核酸」という用語は、任意の増幅法によって増幅できる核酸を指す。「増幅可能な核酸」は、通常「試料鋳型」を含むと考えられる。

【0084】

「試料鋳型」という用語は、「標的」（以下に定義）の存在を解析する試料から得られ

10

20

30

40

50

る核酸を指す。反対に、「バックグラウンド鋳型」は、試料中に存在する可能性がある場合もない場合もある、試料鋳型以外の核酸を指す。バックグラウンド鋳型は、故意でない場合が多い。キャリアオーバーの結果であったり、試料から精製して除去しようとした核酸混在物の存在のためである場合がある。例えば、検出すべき生物の核酸以外の核酸が、被験試料中にバックグラウンドとして存在する場合がある。

【0085】

「プライマー」という用語は、精製された制限消化物で天然に存在するか、合成により産生されるオリゴヌクレオチドであって、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下に置かれたときに（すなわち、ヌクレオチドとDNAポリメラーゼのような誘導剤の存在下で、適当な温度およびpHにおいて）、合成の開始点として作用する能力のあるものを指す。プライマーは、好ましくは増幅で最大の効率を得るために一本鎖であるが、二本鎖でも良い。二本鎖の場合には、プライマーは伸長産物の調製に使用する前に、まず2本の鎖を分けるための処理をする。好ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、誘導剤の存在下で伸長産物の合成を開始するために十分な長さを持つ必要がある。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの由来、および使用法を含む多くの要素に依存する。

【0086】

「プローブ」という用語は、精製された制限消化物のように天然に存在するか、合成、組換え、またはPCR増幅によって産生されるオリゴヌクレオチド（ヌクレオチドの配列）であって、関心対象の別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする能力のあるものを指す。プローブは一本鎖または二本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、および単離に有用である。本発明で使用する任意のプローブは、任意の「レポーター分子」で標識され、酵素（例えば、ELISAおよび酵素に基づく組織化学アッセイ法）、蛍光、放射活性、および発光系を含むがこれらに限定されない任意の検出系で検出可能だと考えられる。本発明は特定の検出系または標識に限定されない。

【0087】

ポリメラーゼ連鎖反応に関して使用される「標的」という用語は、ポリメラーゼ連鎖反応に使用されるプライマーが結合する核酸領域を指す。したがって、「標的」は他の核酸配列から探され、えり分けられる。「セグメント」は、標的配列内の核酸の領域と定義される。

【0088】

「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）という用語は、クローニングまたは精製をせずに、ゲノムDNAの混合物中から標的配列のセグメントの濃度を上昇させるための方法を記述した、K.B. Mullis、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、および4,965,188号の方法を指す。標的配列のこの増幅過程では、所望の標的配列を含むDNA混合物に大過剰量の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを添加し、DNAポリメラーゼの存在下で正確な一連の熱サイクルを行なう。2つのプライマーは、二本鎖の標的配列の各々の鎖に相補的である。増幅を行なうために、混合物を変性させ、標的分子内の相補的配列にプライマーをアニールさせる。アニリングの後、プライマーをポリメラーゼで伸長し、新しい相補鎖の対を形成させる。変性、プライマーのアニリング、およびポリメラーゼ伸長の段階を何度も繰り返し（すなわち、変性、アニリング、および伸長が1つの「サイクル」を形成する；いくつもの「サイクル」があり得る）、所望の標的配列の増幅されたセグメントを高濃度で得ることができる。所望の標的配列の増幅されたセグメントの長さは、プライマー同士の相対的な位置によって決まるため、長さは制御可能なパラメーターである。この過程は繰り返す局面があるために、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」（以下「PCR」）と呼ばれる。標的配列の所望の増幅されたセグメントは混合物中の主要な配列（濃度において）となるので、これは「PCR増幅した」と呼ばれる。

【0089】

PCRでは、ゲノムDNA中の特異的な標的配列の単一コピーを、いくつもの異なる方法（例えば、標識プローブとのハイブリダイゼーション；ビオチン化プライマーの取り込み後、

10

20

30

40

50

アビジン-酵素結合体の検出；dCTPまたはcATPのような³²P標識デオキシヌクレオチド3リン酸の増幅セグメントへの取り込み）によって検出可能なレベルにまで増幅することができる。ゲノムDNAの他にも、適当なプライマー分子のセットを用いると、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列が増幅できる。特に、PCR過程によって増幅されたセグメント自身は、その後のPCR増幅の効率良い鋳型になる。

【0090】

「PCR産物」、「PCR断片」、および「増幅産物」という用語は、変性、アニーリング、および伸長というPCR段階が2回またはそれ以上完了した後で得られる化合物の混合物を指す。これらの用語には、1つまたは複数の標的配列の1つまたは複数のセグメントの増幅がある場合も含まれる。

10

【0091】

「増幅試薬」という用語は、プライマー、核酸鋳型、および増幅酵素以外の、増幅に必要な試薬（デオキシリボヌクレオチド3リン酸、緩衝液等）を指す。通常は、増幅試薬と他の反応成分は、反応容器（試験管、マイクロウェル等）に入れられる。

【0092】

「逆転写酵素」または「RT-PCR」という用語は、開始材料がmRNAであるタイプのPCRを指す。開始mRNAは、逆転写酵素を用いて、相補的なDNAまたは「cDNA」に変換される。その後、cDNAが「PCR」反応の「鋳型」として使用される。

【0093】

「遺伝子発現」という用語は、遺伝子中にコードされた遺伝情報を、遺伝子の「転写」を通してRNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA）に変換し（RNAポリメラーゼの酵素活性による）、そしてmRNAの「翻訳」によってタンパク質に変換するプロセスを指す。遺伝子発現は、過程中的の多くの段階で調節され得る。「上方制御」または「活性化」とは遺伝子発現産物（RNAまたはタンパク質）の産生を上昇させる調節を指し、「下方制御」または「抑制」とは産生を低下させる調節を指す。上方制御または下方制御に関与する分子（例えば、転写因子）は、しばしばそれぞれ「活性化因子」および「抑制因子」と呼ばれる。

20

【0094】

「機能的な組み合わせ」、「機能的順序」および「機能的に連結」という用語は、ある遺伝子の転写および/または所望のタンパク質分子の合成を指示する能力のある核酸分子が産生されるような、核酸配列の連結を指す。この用語は、機能的なタンパク質が産生されるような、アミノ酸配列の連結も指す。

30

【0095】

「調節要素」という用語は、核酸配列の発現のある局面を制御する遺伝要素を指す。例えば、プロモーターは、機能的に連結したコード領域の転写の開始を促進する調節要素である。他の調節要素は、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、終結シグナル等である。

【0096】

真核生物の転写制御シグナルは、「プロモーター」および「エンハンサー」要素を含む。プロモーターおよびエンハンサーは、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用するDNA配列の短い並びから構成される（Maniatisら、Science 236:1237, 1987）。プロモーターおよびエンハンサー要素は、酵母、昆虫、哺乳類、および植物細胞を含む様々な真核生物源から単離されてきた。プロモーターおよびエンハンサー要素は、ウイルスからも単離されており、プロモーターのような類似した制御要素は、原核生物にも見られる。特定のプロモーターおよびエンハンサーの選択は、対象タンパク質を発現するために使用する細胞に依存する。広い宿主範囲を持つ真核生物プロモーターおよびエンハンサーもあるが、限られたタイプの細胞サブセットで機能するものもある（総説はVossら、Trends Biochem. Sci., 11:287, 1986; およびManiatisら、上記1987を参照されたい）。

40

【0097】

「プロモーター要素」、「プロモーター」、または「プロモーター配列」という用語は

50

、DNAポリマーのコード領域の5'末端（先行する）に存在するDNA配列を指す。天然に知られている大部分のプロモーターの位置は、転写領域に先行する。プロモーターはスイッチの役割を果たし、遺伝子の発現を活性化する。遺伝子が活性化されると、転写されるか、転写に参加すると言われている。転写には、遺伝子から作られるmRNAが必要である。したがって、プロモーターは転写調節要素として作用し、また遺伝子のmRNAへの転写の開始部位も提供する。

【0098】

「調節領域」という用語は、プロモーターのすぐ下流に存在し、遺伝子の翻訳開始部位の直前で終わる、遺伝子の5'側の、転写はされるが翻訳されない領域を指す。

【0099】

「プロモーター領域」という用語は、DNAポリマーのコード領域のすぐ上流の領域を指し、通常は約500 bpと4 kbの間の長さで、好ましくは約1~1.5 kbの長さである。

【0100】

プロモーターは組織特異的または細胞特異的の場合がある。プロモーターに関して使われる「組織特異的」という用語は、特定のタイプの組織に対して対象ヌクレオチド配列の選択的発現を指示する能力があるが、異なるタイプの組織においては同じ対象ヌクレオチド配列の発現は相対的に欠如するような、プロモーターを指す。プロモーターの組織特異性は、例えば、レポーター遺伝子をプロモーター配列に機能的に連結してレポーター構築物を作製し、このレポーター構築物が、結果として得られるトランスジェニックの全ての組織に組み込まれるようにゲノムにレポーター構築物を導入して、トランスフェニックの異なる組織におけるこのレポーター遺伝子の発現を検出（例えば、mRNA、タンパク質、またはレポーター遺伝子にコードされるタンパク質の活性を検出）することによって、評価できる。他の組織におけるレポーター遺伝子の発現レベルに対して、1つまたは複数の組織においてレポーター遺伝子の発現レベルが高いことが検出されれば、プロモーターは、高い発現レベルが検出された組織に対して、特異的であることを示す。プロモーターに関して使われる「細胞タイプ特異的」という用語は、特定のタイプの細胞において対象ヌクレオチド配列の選択的発現を指示する能力があるが、同じ組織内の異なるタイプの組織において同じ対象ヌクレオチド配列の発現は相対的に欠如するような、プロモーターを指す。プロモーターに関して使われる「細胞タイプ特異的」という用語は、単一の組織内のある領域において対象ヌクレオチド配列の選択的発現を促進する能力のあるプロモーターも意味する。プロモーターの細胞タイプ特異性は、当技術分野で周知の方法、例えば、免疫組織化学染色を用いて評価できる。簡単に述べると、組織切片をパラフィンに包埋し、発現がプロモーターによって制御されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド産物に特異的な一次抗体を、パラフィン切片に反応させる。一次抗体に特異的な標識の付いた（例えば、ペルオキシダーゼ結合）二次抗体を切片組織に反応させ、特異的な結合を顕微鏡で検出する（例えば、アビジン/ビオチンを用いる）。

【0101】

プロモーターは構成性または誘導性でよい。プロモーターに関して用いられる「構成性」という用語は、プロモーターが刺激（例えば、熱ショック、化学物質、光等）がなくても機能的に連結した核酸配列の転写を指示できることを意味する。通常は、構成性プロモーターは、実質的に任意の細胞および任意の組織において、トランスジーンの発現を指示する能力がある。

【0102】

反対に「誘導性」プロモーターは、刺激（例えば、熱ショック、化学物質、光等）の存在下で機能的に連結した核酸配列の転写レベルを指示する能力を持ち、このレベルは刺激がない場合の機能的に連結した核酸配列の転写レベルとは異なるようなプロモーターである。

【0103】

「調節要素」という用語は、核酸配列の発現のある局面を制御する遺伝要素を指す。例えば、プロモーターは、機能的に連結したコード領域の転写の開始を促進する調節要素で

10

20

30

40

50

ある。他の調節要素は、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、終結シグナル等である。

【0104】

エンハンサーおよび/またはプロモーターは、「内在性」または「外来」または「異種」であり得る。「内在性」エンハンサーまたはプロモーターは、ゲノムにおいて遺伝子と天然で結合しているものである。「外来」または「異種」のエンハンサーまたはプロモーターは、遺伝子の転写が、連結したエンハンサーまたはプロモーターに指示されるように、遺伝子操作（分子生物学的手法）によって、遺伝子の近位に置かれたものである。例えば、第1の遺伝子と機能的な組み合わせにある内在性プロモーターを単離し、除去し、第2の遺伝子と機能的な組み合わせに置き、それによって第2の遺伝子と機能的な組み合わせにある「異種プロモーター」ができる。そのような様々な組み合わせが考えられる（例えば、第1および第2の遺伝子は、同じ種、または異なる種由来でよい）。

10

【0105】

核酸配列の相対的位置に関して使用される「天然で連結した」または「天然の位置にある」という用語は、核酸配列が天然で、その相対的位置に存在することを意味する。

【0106】

発現ベクター上に「スプライシングシグナル」が存在すると、しばしば真核宿主細胞において組換え転写物の発現レベルが高まる。スプライシングシグナルは、一次RNA転写物からのイントロンの除去を仲介し、スプライスドナーおよびアクセプター部位を含む（Sambrookら、「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)、pp16.7~16.8）。一般的に用いられるスプライスドナーおよびアクセプター部位は、SV40の16S RNAから得られたスプライス結合部である。

20

【0107】

真核細胞における組換えDNA配列の効率的な発現には、得られた転写物の効率的な終結とポリアデニル化を指示するシグナルの発現が必要である。転写終結シグナルは、一般的にポリアデニル化シグナルの下流に見つかり、長さ数100ヌクレオチドである。本明細書で使用される「ポリ(A)部位」または「ポリ(A)配列」とは、新生RNA転写物の終結およびポリアデニル化の両方を指示するDNA配列を指す。ポリ(A)テールを持たない転写物は不安定で、素早く分解されるので、組換え転写物の効率的なポリアデニル化が望ましい。発現ベクターで使用されるポリ(A)シグナルは「異種」または「内在性」であり得る。内在性ポリ(A)シグナルは、ゲノムにおいて遺伝子のコード領域の3'末端に天然に見つかるものである。異種ポリ(A)シグナルは、1つの遺伝子から単離され、別の遺伝子の3'側に置かれたものである。一般的に使用される異種ポリ(A)シグナルは、SV40ポリ(A)シグナルである。SV40ポリ(A)シグナルは、237 bpのBamHI/BclI制限断片上に存在し、終結およびポリアデニル化の両方を指示する（Sambrook、上記、16.6~16.7）。

30

【0108】

「ベクター」という用語は、1つホ細胞から別の細胞へDNA部分を運搬する核酸分子を指す。「媒体」という用語はしばしば「ベクター」と互換的に使用される。

【0109】

「発現ベクター」または「発現カセット」という用語は、所望のコード配列と、特定の宿主生物において、機能的に連結したコード配列の発現に必要な適当な核酸配列を含む、組換えDNA分子を指す。原核生物において発現に必要な核酸配列には、しばしば他の配列とともに、通常、プロモーター、オペレーター（選択的）、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、および終結およびポリアデニル化シグナルを利用することが周知である。

40

【0110】

「トランスフェクション」という用語は、細胞に外来DNAを導入することを指す。トランスフェクションは、リン酸カルシウム-DNA共沈澱、DEAE-デキストランを介するトランスフェクション、ポリブレンを介するトランスフェクション、ガラスビーズ、電気穿孔法

50

、マイクロインジェクション、リポソーム融合、リポフェクション、プロトプラスト融合、ウイルス感染、バイオリスティック（粒子照射）等を含む、様々な手法によって実施できる。

【0111】

「安定なトランスフェクション」または「安定的にトランスフェクトした」という用語は、外来DNAがトランスフェクトされた細胞のゲノムに導入され、組み込まれることを指す。「安定なトランスフェクタント」という用語は、ゲノムDNA中に外来DNAが安定的に組み込まれた細胞を指す。

【0112】

「一過性のトランスフェクション」または「一過性にトランスフェクトされた」という用語は、外来DNAが細胞に導入されたが、トランスフェクトされた細胞のゲノムには組み込まれなかったことを指す。外来DNAは数日間、トランスフェクトされた細胞の核に存在する。この間に、外来DNAは、染色体中の内在性遺伝子の発現を支配する調節制御を受ける。「一過性のトランスフェクタント」という用語は、外来DNAを取り込んだが、このDNAを組み込んではいない細胞を指す。

10

【0113】

「リン酸カルシウム共沈殿」という用語は、核酸の細胞への導入の手法を指す。細胞による核酸の取り込みは、核酸がリン酸カルシウム-核酸共沈殿物として存在するときに、増強する。Grahamおよびvan der Eb (Grahamおよびvan der Eb, Virol., 52:456 (1973))の元の技術は、特定の種類の細胞のために条件を最適化するために、いくつかのグループが改変してきた。これらの改変は当技術分野で周知である。

20

【0114】

「照射する (bombarding)」、「照射 (bombardment)」、および「バイオリスティック照射」という用語は、標的生体試料（例えば、細胞、組織等）に対して粒子を加速し、標的生体試料中の細胞の細胞膜に傷をつけ、および/または標的生体試料に粒子を入れる過程を指す。バイオリスティック照射の方法は当技術分野で周知であり（例えば、内容が参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,584,807号）、市販されている（例えば、ヘリウムガス駆動マイクロプロジェクトイル加速器 (PDS-1999/He, BioRad)）。

【0115】

「トランスジーン」という用語は、トランスフェクションの過程によって生物に入れられた外来遺伝子を指す。「外来遺伝子」という用語は、実験的操作によって生物のゲノムに導入された任意の核酸（例えば、遺伝子配列）を指し、導入された遺伝子が天然に存在する遺伝子と同じ位置に無いかぎり、その生物中に見られる遺伝子配列を含む可能性がある。

30

【0116】

宿主細胞または生物に関して使用される「トランスジェニック」という用語は、宿主細胞中、または生物の1つまたは複数の細胞中に、少なくとも1つの異種または外来遺伝子を含む、宿主細胞または生物を指す。

【0117】

「宿主細胞」という用語は、異種遺伝子を複製および/または転写および/または翻訳する能力のある任意の細胞を指す。したがって、「宿主細胞」は、インビトロであるかインビボであるかには関係なく、任意の真核または原核細胞を指す（例えば、大腸菌のような細菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞、および昆虫細胞）。例えば、宿主細胞はトランスジェニック動物中に存在する場合がある。

40

【0118】

「形質転換体」または「形質転換細胞」という用語は、初代形質転換細胞、および継代の数には無関係にその細胞に由来する培養細胞を含む。意図的または意図しない変異のために、全ての子孫のDNAの中身は全く同一とは限らない。元々形質転換された細胞についてスクリーニングされたのと同じ機能を持つ変異子孫は、形質転換体の定義に含まれる。

【0119】

50

「選択可能マーカー」という用語は、選択可能マーカーが発現した細胞に抗生物質または薬剤への耐性を与える活性を持つ酵素をコードする遺伝子、または検出できる形質（例えば、発光または蛍光）の発現を与える遺伝子を指す。選択可能マーカーは「正」または「負」の可能性がある。正の選択可能マーカーの例には、G418およびカナマイシンに対する耐性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（NPTII）遺伝子、ならびに抗生物質ヒグロマイシンに対する耐性を与える細菌ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（hyg）が含まれる。負の選択可能マーカーは、適当な選択培地中で培養すると、その発現が細胞毒になる酵素活性をコードする。例えば、HSV-tk遺伝子は、負の選択可能マーカーとして一般的に使用される。ガンシクロビルまたはアシクロビルの存在下で培養された細胞中でHSV-tk遺伝子が発現すると、細胞毒となる；したがって、ガンシクロビルまたはアシクロビルを含む選択培地中で細胞を培養すると、機能的なHSV TK酵素を発現する能力を持つ細胞を除いた選択ができる。

10

【0120】

「レポーター遺伝子」という用語は、アッセイ可能なタンパク質をコードする遺伝子を指す。レポーター遺伝子の例には、ルシフェラーゼ（例えば、全てが参照として本明細書に組み入れられるdeWetら、Mol. Cell. Biol. 7:725 (1987)および米国特許第6,074,859号；5,976,796号；5,674,713号；および5,618,682号を参照されたい）、緑色蛍光タンパク質（例えば、GenBankアクセッション番号U43284；いくつかのGFP変種がCLONTECH Laboratories, Palo Alto, CAから市販されている）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、βガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、および西洋ワサビペルオキシダーゼが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0121】

「過剰発現」という用語は、トランスジェニック生物における、正常または非形質転換生物における産生レベルを超えた、遺伝子産物の産生を指す。「共抑制」という用語は、内在性遺伝子に実質的な相同性を持つ外来遺伝子の発現によって、外来および内在性遺伝子の両方の発現が抑制されることを指す。本明細書では、「変化したレベル」という用語は、正常または非形質転換生物における量または割合とは異なる、トランスジェニック動物における遺伝子産物の産生を指す。

【0122】

「サザンブロット解析」および「サザンブロット」および「サザン」は、アガロースまたはアクリルアミドゲル上でのDNAの解析を指し、DNAをサイズによって分離または断片化し、その後、ニトロセルロースまたはナイロン膜のような固相支持体にゲルからDNAを移動させる。その後、固定したDNAを標識プローブに暴露し、使用したプローブに相補的なDNA種を検出する。DNAは、電気泳動の前に制限酵素で切断してもよい。電気泳動後、固相支持体への移動の前または移動中に、DNAを部分的に脱プリンおよび変性させてもよい。サザンブロットは、分子生物学者の標準的な道具である（J. Sambrookら、(1989)「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」Cold Spring Harbor Press, NY, pp9.31~9.58）。

30

【0123】

「ノーザンブロット解析」および「ノーザンブロット」および「ノーザン」という用語は、サイズによってRNAを分画するためにアガロースゲル上でRNAを電気泳動し、その後ゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜のような固相支持体上にRNAを移動させることによる、RNAの解析を指す。固定化したRNAは、その後、標識プローブを用いて、使用したプローブに相補的なRNA種を検出する。ノーザンブロットは、分子生物学者の標準的な道具である（J. Sambrookら、(1989)上記、pp7.39~7.52）。

40

【0124】

「ウェスタンブロット解析」および「ウェスタンブロット」および「ウェスタン」という用語は、ニトロセルロースまたは膜のような支持体上に固定化されたタンパク質（またはポリペプチド）の解析を指す。少なくとも1つのタンパク質を含む混合物をまずアクリルアミドゲル上で分離し、分離したタンパク質をニトロセルロースまたはナイロン膜のよ

50

うな固相支持体上にゲルから移動させる。固定化されたタンパク質を、関心のある少なくとも1つの抗原に対する反応性を持つ少なくとも1つの抗体に暴露する。結合した抗体は、放射性標識抗体の利用を含む、様々な方法によって検出できる。

【0125】

「抗原決定基」という用語は、抗原の一部で特定の抗体と接触する部分（エピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物が免疫されると、タンパク質の多くの領域が、特定の領域またはタンパク質の3次元構造に特異的に結合する抗体の産生を誘導する。これらの領域または構造は、抗原決定基と呼ばれる。抗原決定基は、抗体への結合に関して、完全な抗原（免疫応答を誘発するために使用された「免疫原」）と競合する可能性がある。

10

【0126】

「単離されたオリゴヌクレオチド」のように、核酸に関して使用される「単離された」という用語は、その天然の起源において通常会合している少なくとも1つの混在核酸から、同定および分離されている、核酸配列を指す。単離された核酸は、天然とは異なる形または状況で見られる。反対に、DNAおよびRNAのような非単離核酸は、天然で存在する状態で見られる。非単離核酸の例には：宿主細胞の染色体上で隣接した遺伝子の付近に見られる特定のDNA配列（例えば、遺伝子）；複数のタンパク質をコードする数多くの他のmRNAと細胞中で混在している、特定のタンパク質をコードする特異的mRNA配列のような、RNA配列がある。しかしながら、特定のタンパク質をコードする単離核酸には、例えば、天然の細胞とは異なる染色体位置に核酸が存在する、または天然とは異なる核酸配列が隣接している場合の、通常そのタンパク質を発現する細胞における核酸が含まれる。単離された核酸またはオリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖の形で存在する場合がある。単離された核酸またはオリゴヌクレオチドがタンパク質の発現に利用される場合は、オリゴヌクレオチドは、最低限、センスまたはコード鎖を含むが（オリゴヌクレオチドは一本鎖でもよい）、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含む場合もある（オリゴヌクレオチドは二本鎖でもよい）。

20

【0127】

「精製された」という用語は、天然の環境から除去、単離、または分離された、核酸またはアミノ酸配列のいずれかの分子を指す。したがって「単離された核酸配列」は、精製された核酸配列である可能性がある。「実質的に精製された」分子は、それが天然で会合している他の成分が、少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、およびより好ましくは少なくとも90%除去されている。本明細書では、「精製された」および「精製する」という用語は、試料からの混在物質の除去も指す。混在タンパク質を除去すると、試料中にある対象ポリペプチドの割合が上昇する。別の例では、植物、細菌、酵母、または哺乳類宿主細胞中で組換えポリペプチドを発現し、宿主細胞タンパク質を除去することによってポリペプチドを精製する；それにより、試料中にある組換えポリペプチドの割合が上昇する。

30

【0128】

特定のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド「を含む組成物」という用語は、広く、特定のポリヌクレオチド配列またはポリペプチドを含む任意の組成物を指す。組成物は水溶液を含む場合がある。アトラスチンをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号：2）またはその断片を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。この場合、アトラスチンをコードするポリヌクレオチド配列は、通常、塩（例えば、NaCl）、界面活性剤（例えば、SDS）、および他の成分（例えば、デンハルト溶液、粉乳、サケ精子DNA等）を含む水溶液中で使用される。

40

【0129】

「被験化合物」という用語は、疾病、疾患、病気、もしくは体の機能異常を治療もしくは予防する、または試料の生理的もしくは細胞の状態を変化させるために使用できる、任意の化学物質、医薬品、薬物等を指す。被験化合物は、既知および潜在的な治療用化合物の両方を含む。被験化合物は、本発明のスクリーニング法を用いたスクリーニングによ

50

て、治療薬であると決定できる。「既知の治療用化合物」は、そのような治療または予防において有効であることが示された（例えば、動物試験またはヒトへの過去の投与経験による）治療用化合物を指す。

【0130】

本明細書では、アッセイに関して使用される「応答」という用語は、検出可能なシグナルの生成を指す（例えば、レポータータンパク質の蓄積、イオン濃度の上昇、検出可能な化学産物の蓄積）。

【0131】

「試料」という用語は、広い意味で使用される。1つには、動物細胞または組織を指す。別の意味では、任意の起源から得られた検体または培養物、ならびに生体試料および環境試料を指す。生体試料は、植物または動物（ヒトを含む）から得られ、液体、固体、組織、および気体を含む。環境試料は、表面物質、土壌、水、および産業試料のような環境材料を含む。これらの例は、本発明に適用される試料の種類を制限すると見なすことはできない。

【0132】

発明の一般的説明

遺伝性痙性対麻痺または遺伝性痙性不全対麻痺は、脚のゆっくりと徐々に進行する衰弱および痙縮（硬直）を特徴とする、遺伝性の変性性脊髄疾患の一群に用いる名前である。症状に最初に気付くのは、早期の小児期であることも、成人の任意の年齢であることもある。最初の症状には、バランス障害、脚の衰弱および硬直、筋肉の痙攣、ならびに歩行時のかかと引きずりが含まれることがある。この疾患のいくつかの型では、膀胱の症状（失禁など）が出現したり、衰弱と硬直が体の他の部分にも広がる場合もある。進行速度および症状の重症度は、同じ家族のメンバー間でも大きく異なる。家族によっては発現促進現象がおり、世代を経るごとに疾患の発症が早く、重症度が増す場合がある。HSPでは下肢の運動性が完全に失われることはまれであるが、杖、歩行器、または車イスが必要になる可能性がある。患者によっては、症状は一生進行し続ける。初期の小児期に発症し、数年間悪化し、思春期後に進行が止まる場合もある。

【0133】

現在、HSPの診断は一般に、他の疾患の除外および家族歴の観察による。しかし、いくつかの遺伝子座が見つかっており、さらに同定が近いものもある。本発明のアトラスチン遺伝子は、この疾患にその変異が伴う、新規の遺伝子である。

【0134】

HSPは脊髄内の皮質脊髄路（上位運動ニューロンとも呼ばれる）の末端の変性を引き起こす。これらの神経は、脳の運動皮質から始まり、脊髄で終わる。これらは脊髄神経（下位運動ニューロンまたは前角細胞とも呼ばれる）にシナプス接合（結合）するが、これは脊髄から開始し、手足に到達する。脚に供給される神経と接合する皮質脊髄路は腰で結合するため、頸部で結合する、腕に供給される神経と接合する皮質脊髄路よりも、はるかに長い。最も長い神経（脚に向かう）の末端の変性の方が、腕に向かう神経よりもはるかに多い。一般に、腕に向かう神経にいくらかの変性があっても、HSP患者の大部分は、手や腕に何も症状を示さない。

【0135】

単純に表現すると、「神経」はミエリン鞘として知られた覆いによって囲まれた軸索（中央の芯）からなる。これは、電線が絶縁体で覆われているのと似ている。ミエリンは絶縁体であり、神経がインパルスをより速く伝えるのに役立つ。多発性硬化症のような、HSPと似た症状の疾患では、神経の脱髄が関与している。本発明は特定の理論には限定されないが、HSPの大部分の症例では、しばしばミエリンの損失はほとんどまたは全く無く、主な問題は異常なミエリンではなく、長い軸索の末端の異常だと考えられる。

【0136】

現在、遺伝性痙性対麻痺に関連する約15の遺伝子座があるが、その中で遺伝子が同定されているものはいくつかしかない。以下のリストは、既知の遺伝子座のいくつかと、ゲノ

10

20

30

40

50

ムデータベースにおける関連するリンクである。

【0137】

常染色体優性：最も頻度の高い遺伝子座は、染色体2p（スパスチン遺伝子）（SPG4）である。他の遺伝子座には、染色体2q（SPG13）、染色体14q（SPG3A）、染色体15q（SPG6）、染色体8q（SPG8）、染色体10q（SPG9）、染色体12q（SPG10）、および染色体19q（SPG12）が含まれる。Xq28（SPG 1）上のL1細胞接着分子（L1CAM）、およびXq22（SPG2）上のプロテオリピドタンパク質の遺伝子に、2つのX連鎖変異が同定されている。劣性変異SPG5Aは、第8染色体上にマッピングされた。最近、パラプレジン遺伝子（SPG7）が、SPG5Bも含む第16染色体上にマッピングされた。第15染色体はSPG11を含む。本発明は、HSPと関連するアトラスチン遺伝子、およびこの疾患の診断および治療に有用な3つの変異を同定する。

10

【0138】

好ましい態様の詳細な説明

一般に、本明細書で使用される名称、ならびに以下に記述される細胞培養、分子遺伝学、および核酸化学とハイブリダイゼーションの実験手法は、当技術分野で周知で、広く使用されている。核酸組換え法、ポリヌクレオチド合成、および微生物の培養と形質転換（例えば、電気穿孔法、リポフェクション）には、標準的な手法が使用される。一般に、酵素反応および精製段階は、製造元の仕様にしたがって実施される。技術および手法は、一般に当技術分野の通常の方法および様々な一般的参考文献（一般に、Sambrookら、「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)、および「分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）」(1996), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.を参照されたい）にしたがって実行される。

20

【0139】

オリゴヌクレオチドはApplied BioSystemsオリゴヌクレオチド合成機（詳細はSinhaら、Nucleic Acids Res. 12:4539 (1984)を参照されたい）を用いて、製造元の仕様にしたがって合成できる。相補的オリゴヌクレオチドは、NaCl (200 mM)を含む10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)の溶液中で、90°Cに加熱した後、室温までゆっくりと冷却することによって、アニーリングする。結合および代謝回転アッセイでは、二本鎖DNAを非変性ポリアクリルアミド (15% w/v) ゲルから精製する。二本鎖DNAに対応するバンドを切り出し、EDTA (1 mM)を含む0.30 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)に一晩浸す。その後、上清をフェノール/クロロホルム(1/1 v/v)で抽出し、エタノール沈澱させる。 $[g\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いた処理によって、DNA基質の5'-OH基を放射性標識する。塩および取り込まれなかったヌクレオチドは、セファデックスG (Sephadex G) カラム上のクロマトグラフィーによって除去する。

30

【0140】

本発明は、アトラスチンの機能およびアトラスチンの結合を阻害または増強する薬剤の能力を検出するアッセイ法を考慮するが、ここでそのようなアンタゴニストまたはアゴニストおよび結合パートナーを同定するために、大きな薬剤バンク（例えば、化合物ライブラリー、ペプチドライブラリー等）と共に、ハイスループットスクリーニングの形式が用いられる。そのようなアトラスチンアンタゴニストおよびアゴニストおよび結合パートナーは、多様な神経および麻痺性疾患の潜在的な治療薬および診断または予後診断の道具として、さらに開発できる。

40

【0141】

本発明の態様では、アトラスチン遺伝子、ならびにペプチド、ペプチド断片、抗体、発現ベクター、およびトランスジェニック動物のような遺伝子の誘導産物は、遺伝性痙性対麻痺（HSP）ファミリーに属する一連の疾患および関連疾患の診断および治療に有用である。

【0142】

他の好ましい態様では、アトラスチン遺伝子、ペプチドまたはその断片をインビトロ細胞系で使用して、相同体のような他の類似した阻害剤ペプチドを同定することができる。

50

また、アトラスチンペプチド断片は、アトラスチンに結合するペプチドまたは他の化合物のスクリーニングにも使用できる。

【0143】

また別の好ましい態様では、アトラスチン遺伝子、ペプチド、またはその断片は、アトラスチン変異を持つ個体の同定のためのスクリーニングアッセイ法の開発に使用できる。現在の診断方法から大きく改善されるそのようなアッセイ法は、この疾病の診断を簡単に正確にするだろう。

【0144】

診断アッセイ法および本発明の他の利用

好ましい態様では、本発明はHSPおよび関連疾患の病因の重要な要素であるタンパク質アトラスチンをコードするDNAを提供する。

10

【0145】

別の態様では、本発明は細胞への導入のための発現ベクターの一部として、アトラスチンポリペプチドおよびアトラスチン断片をコードする核酸を提供する。本発明は、アトラスチンまたはアトラスチン断片と相互作用する細胞内または細胞外分子の同定方法、ならびにそのような細胞内または細胞外標的へのアトラスチンおよび/または断片の結合を阻害する外来物質（薬剤）の同定方法を提供する。

【0146】

請求されるポリペプチドアトラスチンおよびそのアトラスチン断片は、HSPおよび関連疾患の診断、予後診断、または治療において有用な、薬剤または薬剤のリード化合物のスクリーニングアッセイにおいて、特に有用である。そのような1つのアッセイでは、1) アトラスチン（またはその断片）および2) アトラスチン結合基質を、3) 潜在的薬物候補の存在下および非存在下で、混合する。混合物は、アトラスチン結合基質がアトラスチン（またはその断片）に結合できる条件下で作製し、そのような結合の有無を解析する。そのような薬剤候補の存在で、そのような結合に差があれば、その薬剤はアトラスチン（またはその断片）のアトラスチン結合基質への結合を変化させる能力を持つことを示す。本発明のアッセイ法は、潜在的薬剤候補を同定するために、そのような結合を阻害する能力を持つと思われる化合物（例えば、化合物ライブラリー、ペプチドライブラリー等）の容易なハイスループットスクリーニングを提供する。

20

【0147】

無細胞法および細胞法を含むアトラスチンおよびアトラスチン変異スクリーニング法は、本発明の実施に使用できる。本発明の範囲内の細胞スクリーニング法は、一過性の発現ベクターまたは安定な形質転換を含み得る。当業者には、周知の原理にしたがって、様々なアトラスチンおよびアトラスチン変異スクリーニングプロトコルが設計できる。アトラスチンおよびアトラスチン相互作用パートナーの可溶性型は、無細胞アトラスチン阻害剤スクリーニングプロトコルで利用できる。

30

【0148】

好ましくは、アトラスチン阻害剤のスクリーニングは、アトラスチンをコードする1つまたは複数のベクターで形質転換した、培養哺乳類細胞のレポーター株、および必要に応じて他のアッセイ成分を用いて、細胞系で行われる。

40

【0149】

好ましくは、アトラスチンをコードする配列は、組換えDNAベクターにクローニングし、例えば熱ショックプロモーターのような誘導性プロモーターの制御下で発現される（例えば、Wurnら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5414 (1986)を参照されたい）。アトラスチン発現の誘導後、阻害剤候補の存在による実験的処理、ならびに適当な陽性および陰性対照の存在下での細胞死を測定する。

【0150】

アトラスチンの過剰発現を用いて、患者の変異アトラスチン発現を補うことができるので、これは遺伝子療法の道具として有用な可能性がある。遺伝子療法で使用するアトラスチン遺伝子は、好ましくは外来の調節可能なプロモーターの制御下にある。外来の制御

50

可能なプロモーターとは、特定の誘導物質の濃度の上昇のような、特定の環境条件セットによって、誘導できるプロモーターである。外来の調節可能なプロモーターの例および条件には以下がある：亜鉛イオンによるメタロチオネインプロモーターの誘導（Makarovaら、Nucleic Acids Res. 22:1504-1505 (1994)、テトラサイクリンの除去によるテトラサイクリンリプレッサー-V16キメラの活性に基づく合成プロモーターの活性化（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551 (1992)）、エクジソンの添加（Christophersonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6314-6318 (1992)）、または合成プロゲステロンアンタゴニストであるミフェプリストン（Wangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8180-8184 (1994)）。

【0151】

10

抗体

本発明のアトラスチンコードDNAを用いて、当業者は抗アトラスチン抗体を産生できる。アトラスチンコードDNAを用いて、アトラスチン部分と、好ましくは単離促進化部分、すなわち、融合タンパク質を発現するために使用した宿主細胞からの抽出物において混在タンパク質から容易に単離するための部分、を含む融合タンパク質をコードするベクターを作製する。好ましい単離促進化部分は、マルトース結合タンパク質である。マルトース結合タンパク質をコードするDNAは、市販されている。アトラスチン融合タンパク質の簡便で効率良い単離のために、単離促進化部分に特異的な結合試薬を使用する。例えば、マルトース結合タンパク質部分を含む融合タンパク質の単離には、アミロースクロマトグラフィーが好ましい。単離後、当業者に周知の標準的な方法にしたがって、アトラスチン融

20

【0152】

本発明の抗アトラスチン抗体は、いくつかの用途がある。例えば、アフィニティークロマトグラフィーの媒体の調製のための試薬として使用できる。本発明の抗アトラスチン抗体が入手できたら、市販の試薬を用いて、当業者に周知の通常の方法にしたがって、アトラスチンアフィニティークロマトグラフィー媒体を調製できる。アトラスチン特異的アフィニティークロマトグラフィー媒体は、天然の供給源またはアトラスチンをコードする組換えDNAで形質転換した宿主細胞から全長アトラスチンを単離するために使用できる。本発明の抗アトラスチン抗体は、アポトーシスの生理学および細胞生物学の分析規模の実験試薬としても、有用である。例えば、抗アトラスチンモノクローナル抗体に基づく免疫組織化学手法は、後生動物の正常な形態形成発生における、アポトーシスの速度および/または分布を観察したいと考える発生学者には、有用な手段となる可能性が高い。

30

【0153】

本発明の抗アトラスチン抗体は、診断用免疫アッセイ試薬としても、HSPに関連する疾患または異常を持つと疑われる患者から得られた組織試料において、アトラスチンレベルを測定するために有用である。特定の細胞または組織におけるアトラスチンのレベルに関する情報は、HSPに関連する疾患の進行を追跡することが重要な任意の状況において、有用な診断または予後診断の指標である。診断検査のための組織試料の種類は、患者の兆候および症状、ならびに疑われる疾患または異常によって、様々である。

40

【0154】

細胞の種類に関して組織試料が高度に均一ならば、ホモジネートから得られる抽出物に対してアトラスチン免疫アッセイ法を実施することが好ましい可能性がある。または、抗アトラスチン抗体を用いた免疫組織化学アッセイ法を用いるのが好ましい場合もある。免疫組織化学アッセイ法は、組織試料が細胞の種類に関して不均一である場合に、好ましい。免疫組織化学アッセイ法は、組織の横断面において異なるアトラスチンレベルの分布、または他の様々な種類の細胞における異なるアトラスチンレベルに似関する情報を提供する。

【0155】

本発明の抗アトラスチン抗体は、当技術分野で周知の様々な診断免疫アッセイ法の形式

50

で利用できる。代表的な免疫アッセイ形式は、競合ラジオイムノアッセイ法、ELISA、ウェスタンブロット解析、および固定化した抗体を含むマイクロキャピラリー装置である。

(例えば、Daffornら、Clin. Chem. 36:1312 (1990); Liら、Anal. Biochem. 166:276 (1987); Zukら、米国特許第4,435,504号; Zukら、Clin. Chem. 31:1144 (1985); Tomら、米国特許第4,366,241号; およびClark、国際公開公報第93/03176号を参照されたい)。

【0156】

発現ベクター

本発明のアトラスチンをコードするDNAは、診断および研究目的で、アトラスチン遺伝子の転写を評価し、アトラスチンRNAのプロセッシングを観察するためのインサイチュールハイブリダイゼーション試薬として、使用できる。

10

【0157】

本発明のアトラスチンをコードするDNAの発現には、様々な宿主/発現ベクターの組み合わせが使用できる。細胞スクリーニングアッセイ法におけるアトラスチンコードDNAの発現は、好ましくは真核細胞中で、真核生物の発現制御配列の制御下で行われる。より好ましくは、真核細胞は培養哺乳類細胞である。さらに好ましくは、哺乳類細胞は、ヒト細胞である。しかし、組換えアトラスチンコードDNAの発現が、単離された組換えアトラスチンの産生のみを目的とするならば、原核細胞の宿主/発現ベクター系または真核細胞の宿主/発現系が使用できる。

【0158】

I. アトラスチンポリヌクレオチド

20

上述のように、大きなGTPアーゼのダイナミンファミリーの新規のメンバーである、アトラスチンが発見された。これは、HSPが遺伝していると思われる一連の家族を研究し、ポジショナルクローニング手法を用いて低下したVWF切断プロテアーゼ活性を担う遺伝子を、9q34の遺伝子座にマッピングして行われた。したがって、本発明は、配列番号：1、3、4、および5に記述されるものを含むがそれらに限定されない、アトラスチンおよび変種(例えば、多型性および変異体)、ならびに断片をコードする核酸を提供する。いくつかの態様では、本発明は、ハイブリダイズする能力のあるポリヌクレオチド配列が、天然に存在するアトラスチンの生物活性の少なくとも1つまたは少なくとも1つの一部を保持するかぎり、低ストリンジェンシーから高ストリンジェンシーの条件下で、配列番号：1、3、5、および7にハイブリダイズする能力のあるポリヌクレオチド配列を提供する。いくつかの態様では、天然に存在するアトラスチンの生物活性の1つまたは1つの一部を保持したタンパク質は、野生型アトラスチンに70%相同、好ましくは野生型アトラスチンに80%相同、より好ましくは野生型アトラスチンに90%相同、および最も好ましくは野生型アトラスチンに95%相同である。好ましい態様では、ハイブリダイゼーション条件は、核酸結合体の融点(T_m)に基づいており、上述に定義された「ストリンジェンシー」を与える(参照として本明細書に組み入れられるWahlら、(1987) Meth. Enzymol., 152:399-407を参照されたい)。

30

【0159】

本発明の別の態様では、別のアトラスチンアリルが提供される。好ましい態様では、アリルは多型または変異(例えば、核酸配列の変化)に起因し、一般的に変化したmRNAまたはポリペプチドを産生するが、その構造または機能は変化する場合もしない場合もある。任意の遺伝子は、0、1、または多くのアリル型を持つ。アリルを生じる一般的な変異は、通常、核酸の欠失、付加、または置換による。このような変化はそれぞれ、単独または他と組み合わせ、1つの配列に1回または複数回の頻度で、生じる可能性がある。本発明のアリルの、限定されない例としては、配列番号：1(野生型)、3、4、および5によってコードされるもの、ならびに表1および2に記述されるものがある。

40

【0160】

本発明の別の態様では、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する改変を含むがこれらに限定されない、様々な理由を目的とし、アトラスチンのコード配列を改変するために、本発明の核酸配列に操作を加えることができる。例え

50

ば、当技術分野で周知の技術（例えば、新しい制限部位の挿入、糖付加パターンの変更、コドン選択の変更のための部位特異的突然変異導入法（site-directed mutagenesis））を用いて、変異を導入することができる。

【0161】

本発明のいくつかの態様では、プロモーターおよび調節要素のような上流配列を検出するための、当技術分野で周知の様々な方法において、ヌクレオチド配列（例えば、配列番号：1、3、4、および5）を利用して、アトラスチンのポリヌクレオチド配列を伸長できる。例えば、制限部位ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を本発明に使用できる。これは、既知の遺伝子座に隣接する未知の反応を探るためにユニバーサルプライマーを用いる、直接的な方法である（Gobindaら、(1993) PCR Methods Applic., 2:318-22）。まず、リンカー配列に対するプライマー、および既知の領域に特異的なプライマーの存在下で、ゲノムDNAを増幅する。増幅された配列は、その後、同じリンカープライマー、および第1のプライマーの内部の別の特異的プライマーを用いた第2ラウンドのPCRにかける。各ラウンドのPCR産物を、適当なmRNAポリメラーゼを用いて転写し、逆転写酵素を用いて配列決定する。

【0162】

別の態様では、逆PCRを用いて、既知の領域に基づく異なるプライマーを用いて、配列の増幅または伸長を行なう（Trigliaら(1988) Nucleic Acids Res., 16:816）。プライマーは、Oligo 4.0 (National Biosciences Inc, Plymouth Minn.) または他の適当なプログラムを用いて、長さ22~30ヌクレオチド、GC含量が50%以上、および約68~72℃で標的配列にアニーリングするように、設計できる。この方法では、いくつかの制限酵素を用いて、遺伝子の既知の領域中で適当な断片を生成する。断片は、分子内連結によって環化し、PCR鋳型として使用する。さらに別の態様では、ウォーキングPCRが利用される。ウォーキングPCRは、未知の配列の検索を可能にする、標的を定めたジーンウォーキングの方法である（Parkerら、(1991) Nucleic Acids Res., 19:3055-3060）。PROMOTERFINDERキット（Clontech）は、PCR、入れ子式のプライマー、および特殊ライブラリーを用いて、ゲノムDNAの「ウォーク」を行なう。この過程では、ライブラリーのスクリーニングが不要で、イントロン/エクソンの結合部が見つけれられる。

【0163】

全長cDNAのスクリーニングのための好ましいライブラリーには、より大きなcDNAを含むようにサイズで選択した哺乳類ライブラリーが含まれる。また、ランダムプライムされたライブラリーは、5'側および上流遺伝子領域を含む配列をより多く含むという点で、好ましい。ランダムにプライムされたライブラリーは、オリゴヌクレオチドd(T)ライブラリーが全長cDNAを生成しないときに、特に有用である。哺乳類のゲノムライブラリーは、イントロンを入手したり、5'側配列を伸長するために、有用である。

【0164】

本発明の別の態様では、開示されたアトラスチン配列の変種が提供される。好ましい態様では、変種は多型性および変異（例えば、核酸配列の変化）に起因し、一般的に、変化したmRNAまたはポリペプチドを産生するが、その構造または機能は変化した場合もしない場合もある。任意の遺伝子は、0、1、または多くの変種を持つ。変種を生じる一般的な変異は、通常、核酸の欠失、付加、または置換による。このような変化はそれぞれ、単独または他と組み合わせあって、1つの配列に1回または複数回の頻度で、生じる可能性がある。

【0165】

アトラスチンのVWFまたは他の基質に対する基質特異性または選択親和性を変化させる（例えば、上昇または低下させる）ような目的で、機能（例えば、アトラスチンGTPアーゼ機能）を持つペプチドの構造を修飾することが、可能だと考えられる。そのような修飾されたペプチドは、本明細書で規定されるアトラスチンの活性を持つ、機能的に同等なペプチドと見なされる。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、置換、欠失、または付加により改変して、修飾ペプチドが産生できる。特に好ましい態様では、これらの修飾は、修飾アトラスチンのGTPアーゼ活性を有意に低下させない。すなわち、構築物「X」は、構造ではなくむしろ機能によって定義された、本発明の修飾または変種アトラスチン

類のメンバーであるかを決定するために、評価できる。好ましい態様では、変種アトラスチンポリペプチドの活性は、実施例1Bに記述される方法によって評価される。

【0166】

さらに、上述のように、アトラスチンの変種およびこれをコードするヌクレオチドも、本明細書にさらに詳しく示されるペプチドおよびDNA分子と同等であると、考えられる。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンによる置換、アスパラギン酸のグルタミン酸による置換、スレオニンのセリンによる置換、または構造的に関連したアミノ酸によるアミノ酸の同様な置換（保存的変異）のみでは、得られる分子の生物活性に大きな影響はない。したがって、本発明のいくつかの態様は、保存的置換を含んだ、本明細書に開示されるアトラスチン変種を提供する。保存的置換は、その側鎖によって関連づけられるアミノ酸ファミリー内での置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は、5つのファミリーに分類される：(1) 酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）；(2) 塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）；(3) 非極性（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）；および、(4) 非荷電極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時には合わせて芳香族アミノ酸とも分類される。同様に、アミノ酸レパートリーは、(1) 酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）；(2) 塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）；(3) 脂肪族（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン）、ただしセリンとスレオニンは選択的に、脂肪族ヒドロキシルとして別に分類され得る；(4) 芳香族（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）；(5) アミド（アスパラギン、グルタミン）；および(6) 硫黄含有（システインおよびメチオニン）と分類され得る（例えば、Stryer編、「生化学(Biochemistry)」、p 17-21、第2版、WH Freeman and Col, 1981）。ペプチドのアミノ酸配列を変化させて機能的なポリペプチドが得られるかどうかは、変種ペプチドが、野生型タンパク質と同様な様式で機能する能力を評価することによって、容易に決定できる。複数の置換を持つペプチドも、同様にして、容易に検定できる。

【0167】

より頻度は少ないが、変種は「非保存的」変化（例えば、グリシンのトリプトファンによる置換）を含む。類似した小さな変異には、アミノ酸欠失または挿入、またはその両方も含まれる。生物活性を失わずに、どのアミノ酸残基が置換、挿入、または欠失できるかの決定の手引きは、コンピュータプログラムを用いて見つけられる（例えば、LASERGENE ソフトウェア、DNASTAR Inc., Madison, Wis.）。

【0168】

以下にさらに詳しく説明するように、変種は、以下にさらに詳しく記述する、定方向進化のような方法または変種のコンビナトリアルライブラリーを産生する他の技術により産生できる。本発明のさらに別の態様では、本発明のヌクレオチド配列は、アトラスチンコード配列に、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、局在性、分泌、および/または発現を修飾する改変を含むがこれらに限定されない改変を加えるために、操作を加えられる。そのような変異は、当技術分野で周知の技術を用いて導入できる（例えば、新しい制限部位の挿入、糖付加パターンの改変、コドン選択の変更等のための部位特異的突然変異導入法）。

【0169】

II. アトラスチンポリペプチド

別の態様では、本発明はアトラスチンポリペプチドおよび断片を提供する。アトラスチンポリペプチド（例えば、配列番号：2）の限定しない例は、図2に示されている。本発明の他の態様は、これらのアトラスチンタンパク質の融合タンパク質または機能的同等物を提供する。さらに別の態様では、本発明はアトラスチンポリペプチドの変種、相同体、および変異体を提供する。本発明のいくつかの態様では、ポリペプチドは天然から精製された産物であり、別の態様では、化学合成手順の産物であり、さらに別の態様では、原核生物または真核生物宿主を用いた組換え技術によって産生される（例えば、細菌、酵母、高

等植物、昆虫、および哺乳類の培養細胞)。いくつかの態様では、組換え産生手順で利用される宿主によって、本発明のポリペプチドは糖付加が起きたり、起きない場合がある。他の態様では、本発明のポリペプチドは、最初のメチオニンアミノ酸残基も含む場合がある。

【0170】

本発明の1つの態様では、遺伝コードの本来の縮重のため、実質的に同一または機能的に同等なアミノ酸配列をコードする、配列番号：2のポリヌクレオチド配列以外のDNA配列を、アトラスチンのクローニングおよび発現に使用できる。一般に、そのようなポリヌクレオチド配列は、上述のように、高度から中程度のストリンジェンシー条件下で配列番号：1にハイブリダイズする。当業者の理解するように、天然に存在しないコドンを持つアトラスチンコードヌクレオチド配列を産生すると、有利な場合がある。したがって、いくつかの好ましい態様では、例えば、アトラスチン発現の速度を上昇させるため、または、天然に存在する配列から産生される転写物より長い半減期を持つなどの、望ましい性質を持つ組換えRNA転写物を産生するために、特定の原核または真核生物宿主の好むコドンが選択される (Murrayら、(1989) Nucl. Acids Res. 17)。

【0171】

A. アトラスチン産生のためのベクター

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術によってポリペプチドを産生するために利用できる。したがって、例えば、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドの発現のための様々な発現ベクターの任意のものに入れることができる。本発明のいくつかの態様では、ベクターには、染色体、非染色体、および合成DNAの配列 (例えば、SV40、細菌プラスミド、ファージDNAの誘導體；バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、およびワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルスのようなウイルスDNA) が含まれるが、これらに限定されない。宿主中で複製可能で生存可能なかぎり、任意のベクターが使用できると考えられる。

【0172】

特に、本発明のいくつかの態様は、広く上記に説明されている (例えば、配列番号：1、3、4、および5) 1つまたは複数の配列を含む組換え構築物を提供する。本発明のいくつかの態様では、構築物は、中に本発明の配列が順方向または逆方向で挿入された、プラスミドまたはウイルスベクターのような、ベクターを含む。別の態様では、異種構造配列 (例えば、配列番号：1) は、翻訳開始および終結配列を用いて適当な段階で組み立てられる。本発明の好ましい態様では、様々な手法のうち任意のものを用いて、適当なDNA配列をDNAに挿入する。一般に、DNA配列は、当技術分野で周知の手法により、適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入する。

【0173】

当業者には多数の適当なベクターが周知であり、市販されている。そのようなベクターには、1) 細菌：pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pBSKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene)；ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)；2) 真核生物：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、PXT1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia)；および 3) バキュロウイルス：pBacおよびpMbac (Stratagene)が含まれるがこれらに限定されない。宿主中で複製可能で生存可能なかぎり、任意の他のプラスミドまたはベクターが使用できる。本発明のいくつかの好ましい態様では、哺乳類発現ベクターは、複製開始点、適当なプロモーターおよびエンハンサー、および任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびアクセプター部位、転写終結配列、および5'側隣接非転写配列を含む。他の態様では、必要な非転写遺伝要素を提供するために、SV40スプライスおよびポリアデニル化部位に由来するDNA配列が使用できる。

【0174】

本発明の特定の態様では、発現ベクター中のDNA配列は、mRNA合成を指示するために、

適当な発現制御配列（プロモーター）に機能的に連結される。本発明で有用なプロモーターは、LTRまたはSV40プロモーター、大腸菌lacまたはtrp、ファージλのP_LおよびP_R、T3およびT7プロモーター、およびサイトメガロウイルス（CMV）前初期、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ、およびマウスメタロチオネイン-Iプロモーター、および原核細胞または真核細胞またはそのウイルスにおいて遺伝子発現を制御することが既知の他のプロモーターを含むが、これらに限定されない。本発明の他の態様では、組換え発現ベクターには、複製開始点および宿主細胞の形質転換を可能にする選択可能マーカー（例えば、真核生物培養細胞では、ジヒドロ葉酸リダクターゼもしくはネオマイシン耐性、または大腸菌ではテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性）が含まれる。

【0175】

本発明の一部の態様では、本発明のポリペプチドをコードするDNAの高等真核生物による転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって、増加する。エンハンサーは、DNAのシス作用性の要素で、通常10~300 bpで、プロモーターに作用して転写を増加させる。本発明に有用なエンハンサーには、複製開始点bp 100~270の後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれるが、これらに限定されない。

【0176】

他の態様では、発現ベクターは、翻訳開始および転写終結のための、リボソーム結合部位も含む。本発明のさらに別の態様では、ベクターは発現増幅のための適当な配列も含む。

【0177】

B. アトラスチンの産生のための宿主細胞

別の態様では、本発明は上述の構築物を含む宿主細胞を提供する。本発明のいくつかの態様では、宿主細胞は、高等真核細胞（例えば、哺乳類または昆虫細胞）である。本発明の別の態様では、宿主細胞は下等真核細胞（例えば、酵母細胞）である。本発明のさらに別の態様では、宿主細胞は原核細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。宿主細胞の特定の例には、大腸菌、鼠チフス菌（*Salmonella typhimurium*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、および緑膿菌（*Pseudomonas*）、放線菌（*Streptomyces*）、およびブドウ球菌（*Staphylococcus*）属内の様々な種、ならびにサッカロミセス・セレビジエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シズサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、ショウジョウバエ（*Drosophila*）S2細胞、ハスモンヨトウ（*Spodoptera*）Sf9細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、サル腎線維芽細胞COS-7株（Gluzman, Cell 23:175 (1981)）、C127、3T3、293、293T、HeLa、およびBHK細胞株、T-1（タバコ細胞培養株）、根分泌性（Rhizosecretion）の根細胞および培養根（Glebaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5973-5977 (1999)）が含まれるがこれらに限定されない。

【0178】

宿主細胞中の構築物は、組換え配列によってコードされる遺伝子産物を産生するために、通常の方法で使用できる。いくつかの態様では、宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランを介するトランスフェクション、電気穿孔法（例えば、Davisら(1986)「分子生物学の基礎方法(Basic Methods in Molecular Biology)」参照）で実施できる。または、本発明のいくつかの態様では、本発明のポリペプチドを通常のペプチド合成機によって合成で産生できる。

【0179】

タンパク質は、哺乳類細胞、酵母、細菌、または適当なプロモーターの制御下にある他の細胞中で発現できる。本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いて、そのようなタンパク質を産生するために、無細胞翻訳系も利用できる。原核生物および真核生物宿主と用いる適当なクローニングおよび発現ベクターは、Sambrookら(1989)、「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、Cold Spring Harbor, NYに記述されている。

【0180】

本発明のいくつかの態様では、適切な宿主株を形質転換し、適当な細胞密度まで宿主株を増殖させた後、適当な手段によって（例えば、温度変化または化学的誘導）、選択されたプロモーターを誘導し、さらに細胞を培養する。本発明の別の態様では、細胞は、遠心により採取し、物理的または化学的方法により破壊し、得られた粗抽出物をさらなる精製のために保存する。本発明のさらに別の態様では、タンパク質の発現に使用された微生物細胞は、凍結乾燥サイクル、音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む、任意の通常の方法によって破壊できる。

【0181】

C. アトラスチンの精製

本発明は、組換え細胞培養からアトラスチンを回収し精製するための方法も提供するが、これには、硫酸またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イ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、ヒ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が含まれるが、これらに限定されない。本発明の別の態様では、成熟したタンパク質の構造を完成させる際に、必要に応じてタンパク質の折り畳み段階が使用できる。本発明のさらに別の態様では、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を最終精製段階に使用できる。

【0182】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列にインフレームで融合したコード配列（例えば、配列番号：1、3、4、および5）を持つ、ポリヌクレオチドを提供する。マーカー配列の限定しない例には、ベクター、好ましくはpQE-9ベクターが提供し得るヘキサヒスチジンタグがあり、これは細菌宿主の場合にマーカーに融合したポリペプチドの精製を提供する。または、例えばマーカー配列は、哺乳類宿主（例えば、COS-7細胞）が使用されるときには、ヘマグルチニン(HA)タグでもよい。HAタグはインフルエンザのヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応する（Wilsonら、(1984) Cell, 37:767）。

【0183】

D. アトラスチンの断片およびドメイン

さらに、本発明はアトラスチンの断片（切断変異体、例えば、配列番号：1、3、4、および5の一部）を提供する。別の態様では、本発明はアトラスチンのドメイン（例えば、GTPアーゼドメイン）を提供する。本発明のいくつかの態様では、アトラスチンタンパク質の一部の発現が望まれるときに、発現する所望の配列を含むオリゴヌクレオチド断片に開始コドン(ATG)を付加する必要がある場合がある。N末端のメチオニンは、酵素メチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)を用いて酵素的に切断できることは、当技術分野で周知である。MAPは大腸菌（Ben-Bassatら（1987）J. Bacteriol., 169:751）および鼠チフス菌からクローニングされており、そのインビトロ活性は組換えタンパク質で示されている（Millerら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2718）。したがって、必要ならば、N末端のメチオニンの除去は、MAPを産生する宿主中（例えば、大腸菌またはCM89またはS. セレビシエ）でそのような組換えポリペプチドを発現することによりインビボで行なうか、あるいは精製されたMAPを使用してインビトロで行なうことができる。

【0184】

E. アトラスチンを含む融合タンパク質

本発明はアトラスチンの全体または一部を含む融合タンパク質も提供する。したがって、本発明のいくつかの態様では、ポリペプチドのコード配列は、異なるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む融合遺伝子の一部として、含まれ得る。このタイプの発現系は、アトラスチンタンパク質の免疫原性断片を産生するのが望ましい場合に、使用できると考えられる。本発明のいくつかの態様では、アトラスチンポリペプチドの一部の免疫原性担体タンパク質として、ロタウイルスのVP6キャプシドタンパク質が、モノマー型またはウイルス粒子の形で、使用される。本発明の他の態様では、抗体を作製するアトラ

スチンの部分に対応する核酸配列を、後期ワクシニアウイルス構造タンパク質のコード配列を含む融合遺伝子構築物に取り込み、ビリオンの一部としてアトラスチンの部分を含む融合タンパク質を発現する、組換えウイルスのセットを産生できる。B型肝炎ウイルス表面抗原融合タンパク質を用いた免疫原性融合タンパク質の使用によって、組換えB型肝炎ビリオンもこの役割で使用できることが示された。同様に、本発明の他の態様では、ポリペプチド抗原のセットの免疫原性を増大するために、アトラスチンの一部およびポリオウイルスキャプシドタンパク質を含む融合タンパク質をコードする、キメラ構築物が作製される（例えば、欧州特許公報第025949号；およびEvansら(1989) *Nature* 339:385; Huangら(1988) *J. Virol.*, 62:3855; およびSchliengerら(1992) *J. Virol.*, 66:2を参照されたい）。

10

【0185】

本発明のさらに別の態様では、ペプチドに基づく免疫のために、複数抗原ペプチド系が使用される。この系では、アトラスチンの所望の部分、分岐リジンオリゴマーのコアへのペプチドの有機化学合成から直接に入手する（例えば、Posnettら(1988) *J. Biol. Chem.*, 263:1719; およびNardelliら(1992) *J. Immunol.*, 148:914を参照されたい）。本発明の別の態様では、アトラスチンタンパク質の抗原決定基は、細菌細胞によっても発現および提示される。

【0186】

免疫原性を増大するために融合タンパク質を使用するのに加えて、融合タンパク質は、本発明のアトラスチンタンパク質のようなタンパク質の発現も促進することが、広く理解されている。したがって、本発明のいくつかの態様では、アトラスチンはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST融合タンパク質）として作製される。そのようなGST融合タンパク質は、グルタチオン誘導化基質の使用などにより、アトラスチンの精製を容易にする（Ausabelら、(1992)編、「分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）」John Wiley & Sons, N.Y.を参照されたい）。本発明の別の態様では、アトラスチンの所望の部分のN末端に、ポリ(His)/エンテロキナーゼ切断部位配列のような、精製リーダー配列をコードする融合タンパク質は、 Ni^{+2} 金属樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる発現されたアトラスチン融合タンパク質の精製を可能にする。本発明のさらに別の態様では、精製リーダー配列は、エンテロキナーゼによる処理により、その後除去できる（Hochuliら、(1987) *J. Chromatogr.*, 411:177; およびJanknechtら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972を参照されたい）。

20

30

【0187】

融合遺伝子を作製する技術も周知である。基本的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の結合は、連結のための平滑末端または付着末端、適当な末端を提供する制限酵素消化、必要に応じて粘着末端の充填、望ましくない結合を避けるためのアルカリ性ホスファターゼ処理、および酵素による連結を利用して、通常の技術にしたが行なう。本発明の別の態様では、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含めた通常の技術によって合成できる。または、本発明の別の態様では、遺伝子断片のPCR増幅は、後にアニーリングしてキメラ遺伝子配列を生成できるような、2つの連続する遺伝子断片の間に相補的なオーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて、実行できる（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*、上記）。

40

【0188】

F. アトラスチンの変種

本発明のまた別の態様は、アトラスチンの変異または変種を提供する。治療もしくは予防の有効性、または安定性（例えば、エキスピボの貯蔵寿命、および/またはインビボのタンパク質分解への抵抗性）を増強するなどの目的のために、アトラスチン活性を持つペプチドの構造を修飾することが可能である。そのような修飾ペプチドは、本明細書に定義される対象アトラスチンタンパク質の活性を持つペプチドの、機能的同等物と見なされる。アミノ酸置換、欠失、または付加等によりアミノ酸配列が改変された、修飾ペプチドが産生できる。

50

【0189】

さらに、上述のように、対象アトラスチンタンパク質の変種（例えば、変異体または多型性配列）およびそれらをコードするヌクレオチドも、さらに詳細に述べられるペプチドおよびDNA分子と同等であると考えられる。例えば、上述のように、本発明は保存的および非保存的アミノ酸置換を含む変異および変種タンパク質を含む。

【0190】

本発明はさらに、本アトラスチンタンパク質のコンビナトリアル変異体、および切断変異体のセットの作製方法を考慮し、インビボまたはインビトロでの変異変種の検出に機能する潜在的な変種配列（変異体または多型性配列）を同定するために、特に有用である。そのようなコンビナトリアルライブラリーのスクリーニングの目的は、例えば、治療薬として作用できる新規のアトラスチン変種を作製することである。

10

【0191】

したがって、本発明のいくつかの態様では、改変された基質特異性または選択性を提供するために、本発明の方法によってアトラスチン変種を操作する。本発明の別の態様では、天然に存在するアトラスチンと比較して、選択的な効力を持つ、コンビナトリアルに由来する変種が作製される。そのようなタンパク質は、組換えDNA構築物から発現されると、遺伝子療法プロトコールで使用できる。

【0192】

本発明のさらに別の態様では、対応する野生型タンパク質とは劇的に異なった細胞内半減期を持つアトラスチン変種が提供される。例えば、改変されたタンパク質は、タンパク質分解性の分解、またはアトラスチンの破壊もしくは不活化に至る他の細胞過程に対して、より安定または不安定にできる。そのような変種およびそれらをコードする遺伝子は、タンパク質の半減期を改変することによって、アトラスチン発現の位置を変化させるために使用できる。例えば、半減期が短ければ、より一過性のアトラスチンの生物効果が生じ、誘導性発現系の一部である場合には、細胞内でのアトラスチンレベルをより厳密に制御できる。また、半減期が長ければ、生物効果が長く続き、治療薬として有用である。上述のように、そのようなタンパク質、および特にその組換え核酸構築物は、遺伝子療法プロトコールで使用できる。

20

【0193】

本発明のコンビナトリアル変異作製手法のいくつかの態様では、好ましくは最高のホモロジーが得られるように、アトラスチン相同体、変種、または他の関連タンパク質の集団のアミノ酸配列を整列させる。そのような変種集団は、例えば、1つまたは複数の種由来のアトラスチン相同体、または同一の種由来であるが変異または多型性のために異なるアトラスチン変種を含み得る。整列した配列の各位置に出現するアミノ酸を選択して、コンビナトリアル配列の縮重したセットを作製する。

30

【0194】

本発明の好ましい態様では、コンビナトリアルアトラスチンライブラリーは、潜在的なアトラスチンタンパク質配列の少なくとも一部を各々が含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の、縮重したライブラリーによって作製される。例えば、潜在的アトラスチン配列の縮重したセットが、個々のポリペプチドとして、または内部にアトラスチン配列のセットを含むより大きな融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイ）、発現可能なように、合成オリゴヌクレオチドを酵素的に連結して遺伝子配列にする。

40

【0195】

縮重したオリゴヌクレオチド配列から、潜在的なアトラスチン相同体および変種のライブラリーを作製するためには多くの方法がある。いくつかの態様では、縮重した遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成機で行い、合成遺伝子を適当な遺伝子に連結して発現する。遺伝子の縮重したセットの目的は、1つの混合物で、潜在的アトラスチン配列の所望のセットをコードする配列を全て提供することである。縮重したオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である（例えば、Narang (1983) Tetrahedron Lett., 39:39; Itakur

50

aら(1981) Recombinant DNA, Walton編、Proceedings of the 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules, Elsevier, Amsterdam, pp273-289; Itakuraら(1984) Annu. Rev. Biochem., 53:323; Itakuraら(1984) Science 198:1056; Ikeら(1983) Nucl. Acid Res., 11:477を参照されたい)。そのような技術は、他のタンパク質の定方向進化で利用されてきた (Scottら(1980) Science 249:386; Robertsら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2429; Devlinら(1990) Science 249:404; Cwirlaら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378; ならびに米国特許第5,223,409号、5,198,346号、および5,096,815号; この各々は参照として本明細書に組み入れられる)。

【0196】

アトラスチン核酸 (例えば、配列番号: 1、3、4、および5、ならびにその断片および変種) は、定方向進化の開始核酸として利用できると考えられる。これらの技術は、GTPアーゼ活性の上昇または低下といった、望ましい性質を持つアトラスチン変種を開発するために利用できる。

【0197】

いくつかの態様では、無作為的突然変異導入 (コード配列に無作為突然変異を導入するためにエラープローンPCRを利用する) によって人工的進化が行われる。この方法では、変異の頻度を精密に調整する必要がある。一般的規則として、有益な変異はまれであるが、不利な変異は多い。これは、不利な変異と有益な変異の組み合わせが、しばしば不活性な酵素を生じるためである。標的遺伝子の塩基置換の理想的な数は、通常1.5と5の間である (MooreおよびArnold (1996) Nat. Biotech., 14, 458; Leungら(1989) Technique, 1:11; EckertおよびKunkel (1991) PCR Methods Appl., 1:17-24; CaldwellおよびJoyce (1992) PCR Methods Appl., 2:28; ならびにZhaoおよびArnold (1997) Nuc. Acids Res., 25:1307)。変異導入後、望ましい活性について得られたクローンを選択する (例えば、アトラスチン活性のスクリーニング)。望ましい活性を持つ酵素を開発するためには、しばしば、追加の変異導入および選択のラウンドを行なう必要がある。有用な変異のみが、次の変異導入に持ち越されることに注意する必要がある。

【0198】

本発明の他の態様では、本発明のポリヌクレオチドは遺伝子シャフリングまたはセクショナルPCR手順で使用される (例えば、Smith (1994) Nature, 370:324; 米国特許第5,837,458号、5,830,721号、5,811,238号、5,733,731号; これらは全て参照として本明細書に組み入れられる)。遺伝子シャフリングは、いくつかの変異DNAを無作為に断片化し、PCRによって全長分子に再構築するものである。様々な遺伝子シャフリング手順の例には、DNase処理後の構築、付着伸長プロセス(STEP)、およびランダムプライミングインビトロ組換えが含まれるが、これらに限定されない。DNaseを介する方法では、陽性変異体のプールから単離されたDNAセグメントをDNaseIによって無作為な断片に切断し、プライマーを添加せずにPCRラウンドを複数回行なう。PCRのサイクルが進むと、無作為断片の長さは未切断セグメントの長さに近づき、異なるクローンに存在した変異が混合され、得られた配列のいくつかに蓄積していく。選択およびシャフリングを複数サイクル行なうと、いくつかの酵素の機能の増強ができた (Stemmer (1994) Nature, 370:398; Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747; Cramerら(1996) Nat. Biotech., 14:315; Zhangら、(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504; およびCramerら(1997) Nat. Biotech., 15:436)。定方向進化によって産生された変種は、実施例1Bに記述される方法によってアトラスチン活性のスクリーニングができる。

【0199】

点変異によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物のスクリーニング、および特定の性質を持った遺伝子産物のためのcDNAライブラリーのスクリーニングには、当技術分野で様々な技術が周知である。そのような技術は、コンビナトリアル突然変異導入、またはアトラスチン相同体または変種の組換えによって作製された遺伝子ライブラリーの、迅速なスクリーニングに、一般的に適用できる。大きな遺伝子ライブラリーのスクリーニングのために最も広く使われている技術は、通常、遺伝子ライブラリーを複製可

能な発現ベクターにクローニングし、得られたベクターライブラリーで適当な細胞を形質転換し、そして所望の活性を検出することで、産物が検出された遺伝子をコードするベクターが比較的容易に単離できる条件下において、コンビナトリアル遺伝子を発現する段階を含む。

【0200】

G. アトラスチンの化学合成

本発明の別の態様では、当技術分野で周知の化学的方法を用いて（例えば、Caruthersら(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 7:215; CreaおよびHorn (1980) Nucl. Acids Res., 9:2331; MatteucciおよびCaruthers (1980) Tetrahedron Lett., 21:719; ならびにChowおよびKempe (1981) Nucl. Acids Res., 9:2807を参照されたい）アトラスチンのコード配列の全体または部分を合成する。本発明の別の態様では、アトラスチンアミノ酸配列の全体またはその一部のいずれかを合成するために、化学的方法を用いて、タンパク質自身を産生する。例えば、固相法によってペプチドを合成し、樹脂から切断し、調製用高速液体クロマトグラフィーによって精製する（例えば、Creighton (1983) 「タンパク質の構造および分子の原理 (Proteins Structures And Molecular Principles)」, W H Freeman and Co, New York N.Y.を参照されたい）。本発明の別の態様では、アミノ酸分析または配列決定によって、合成ペプチドの組成を確認する（例えば、Creighton、上記、を参照されたい）。

【0201】

直接のペプチド合成は、様々な固相法（Robergeら(1995) Science 269:202）を用いて実施でき、例えば、製造元の提供する説明書にしたがってABI 431Aペプチド合成機(Perkin Elmer)を用いて、自動合成もできる。また、アトラスチンのアミノ酸配列またはその任意の部分は、直接合成時に改変する、および/または化学的方法を用いて他の配列と組み合わせることで、変種ポリペプチドを産生することができる。

【0202】

III. アトラスチンアリの検出

A. アトラスチンアリル

いくつかの態様では、本発明はHSPに対する感受性に相関したアトラスチンのアリル（例えば、配列番号：3、4、および5に示される変異を含むがこれらに限らない）を含む。天然に存在するヒトアトラスチンアリルを解析すると、HSPに対する感受性が増加した患者が、変異アトラスチンアリルを持つことが分かった。

【0203】

本発明は、特定の作用機序に限定されない。実際、本発明の実施には機構の作用機序の理解は不要である。しかし、アトラスチンは、正常なGTPアーゼシグナル伝達に関与すると考えられる。HSPにおいては、機能の低下したまたは非機能的なアトラスチンは、神経のシグナル伝達の低下を誘導し、またHSPを担う直接の機構であると考えられる。

【0204】

しかし、本発明は本出願に記述された変異に限定されない。望ましくない表現型（例えば、アトラスチンGTPアーゼ活性レベルの変化、またはHSPの存在または感受性）を誘導する任意の変異は、本発明の範囲内である。例えば、いくつかの態様では、本発明はアトラスチンの1つまたは複数のヌクレオチドの変化を含むアリルを提供する。

【0205】

B. 変異アリルの検出

したがって、本発明は、患者がHSPを発症するような変種アトラスチンアリルを持つかどうかを決定する方法を提供する。別の態様では、本発明は1つまたは複数のアトラスチン変種アリルの有無に基づいて、HSP疾患に対して上昇したリスクの、予後診断を提供するための方法を提供する。好ましい態様では、変異は、アトラスチンレベルの低下またはアトラスチンの機能性の低下を誘導する変異である。

【0206】

変種（例えば、変異または多型性）核酸配列の解析には、いくつかの方法がある。多型

性または変異を検出するアッセイ法は、いくつかのカテゴリーに分類され、これには、直接の配列決定アッセイ法、断片の多型性アッセイ法、ハイブリダイゼーションアッセイ法、およびコンピュータベースのデータ解析が含まれるが、これらに限定されない。これらのアッセイ法の複数の変法を実施するための、プロトコールおよび市販のキットもしくはサービスがある。いくつかの態様では、アッセイ法は組み合わせまたは混成で行われる（例えば、いくつかのアッセイ法の異なる試薬または技術を組み合わせて1つのアッセイ法にする）。以下のアッセイ法は、本発明で有用である。

【0207】

1. 直接の配列決定アッセイ法

本発明のいくつかの態様では、直接の配列決定技術を用いて変種配列を検出する。これらのアッセイ法では、まず適当な方法を用いて、被験者からDNA試料を単離する。いくつかの態様では、対象領域を適当なベクターにクローニングし、宿主細胞中（例えば、細菌）で増殖させて増幅する。別の態様では、PCRを用いて対象の領域のDNAを増幅する。

【0208】

増幅後、対象領域（対象のSNPまたは変異を含む領域）のDNAを、放射性マーカースクレオチドを用いた手作業での配列決定、または自動シーケンシングを含むがこれらに限定されない任意の適当な方法を用いて、配列決定する。配列決定の結果は、任意の適当な方法を用いて表示する。配列を調べ、特定のSNPまたは変異の有無を決定する。

【0209】

2. PCRアッセイ法

本発明のいくつかの態様では、PCRに基づくアッセイ法を用いて変種配列を検出する。いくつかの態様では、PCRアッセイ法は、アトラスチンの変異または野生型アリル（多型性または変異の領域）のみにしかハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドプライマーの使用を含む。プライマーの両方のセットを用いて、試料DNAを増幅する。変異プライマーのみでPCR産物が得られれば、患者は変異アトラスチンアリルを持つ。野生型プライマーのみでPCR産物が得られれば、患者は野生型のアトラスチンアリルを持つ。

【0210】

3. 断片長多型性アッセイ法

本発明のいくつかの態様では、断片長多型性アッセイ法を用いて変種配列を検出する。断片長多型性アッセイ法では、酵素を用いて（例えば、制限酵素、またはCLEAVASE I (Third Wave Technologies, Madison, WI) 酵素）、一連の位置でのDNAの切断に基づいて、独特なDNAバンドパターンが形成される。SNPまたは変異を含む試料のDNA断片は、野生型のバンドパターンとは異なるはずである。

【0211】

a. RFLPアッセイ法

本発明のいくつかの態様では、制限断片長多型性アッセイ法（RFLP）を用いて、変種配列を検出する。まず、PCRを用いて対象領域を単離する。その後、特定の多型性について独特な長さの断片を生成することが既知の制限酵素を用いて、PCR産物を切断する。制限酵素消化したPCR産物は、アガロースゲル電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイド染色によって可視化する。断片の長さは、分子量マーカーならびに野生型および変異対照から得られる断片と比較する。

【0212】

b. CFLPアッセイ法

別の態様では、CLEAVASE断片長多型性アッセイ法（CFLP; Third Wave Technologies, Madison, WI; 各々が参照として本明細書に組入れられる、米国特許第5,843,654号; 5,843,669号; 5,719,208号および5,888,780号を参照されたい）を用いて変種配列を検出する。このアッセイ法は、一本鎖DNAがそれ自身で折り畳むとき、DNA分子の正確な配列により非常に独特の高次元構造を取るという所見に基づく。これらの二次構造には、DNAの部分的に二本鎖になった領域が関与しているため、一本鎖領域は、二本鎖DNAヘアピンに隣接する。CLEAVASE I 酵素は、構造特異的な、熱安定性のヌクレアーゼで、これらの一本鎖領

10

20

30

40

50

域と二本鎖領域の間の結合部を切断する。

【0213】

まず、例えばPCRを用いて対象領域を単離する。その後、加熱してDNA鎖を分離する。次に、反応液を冷却して、鎖内の二次構造を形成させる。そしてCLEAVASE I 酵素でこのPCR産物を処理し、特定のSNPまたは変異に独特な一連の断片を生成する。CLEAVASE酵素処理したPCR産物を分離し、検出し（例えば、アガロースゲル電気泳動）、可視化する（例えば、エチジウムブロマイド染色）。断片の長さを、分子量マーカーならびに野生型および変異対照から生成した断片と比較する。

【0214】

4. ハイブリダイゼーションアッセイ法

10

本発明の好ましい態様では、ハイブリダイゼーションアッセイ法により変種配列を検出する。ハイブリダイゼーションアッセイ法では、試料のDNAが相補的DNA分子（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ）にハイブリダイズする能力に基づいて、特定のSNPまたは変異の有無を決定する。様々なハイブリダイゼーションおよび検出技術を使用したハイブリダイゼーションアッセイ法がある。以下に、いくつかのアッセイ法を説明する。

【0215】

a ハイブリダイゼーションの直接の検出

いくつかの態様では、対象配列（例えば、SNPまたは変異）へのプローブのハイブリダイゼーションは、結合したプローブを可視化することによって、直接検出する（例えば、ノーザンまたはサザンアッセイ法；例えば、Ausabelら（編）、(1991), 「分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）」 John Wiley & Sons, N.Y. を参照されたい）。これらのアッセイ法では、被験者からゲノムDNA（サザン）またはRNA（ノーザン）を単離する。その後、ゲノムを低頻度で切断し、測定するマーカーの近くでは切断しない一連の制限酵素によって、DNAまたはRNAを切断する。その後、DNAまたはRNAを分離し（例えば、アガロースゲル上）、メンブレンに移動させる。検出するSNPまたは変異に特異的な標識された（例えば、放射性ヌクレオチドの取り込みによる）プローブを、低い、中間、または高ストリンジエンシーの条件で、メンブレンに接触させる。未結合プローブを除去し、標識プローブを可視化することによって、結合の有無を検出する。

20

【0216】

b. 「DNAチップ」アッセイ法を用いたハイブリダイゼーションの検出

30

本発明のいくつかの態様では、DNAチップハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて、変種配列を検出する。このアッセイ法では、一連のオリゴヌクレオチドプローブを固相支持体に貼り付ける。オリゴヌクレオチドは、特定のSNPまたは変異に特有であるように設計されている。対象DNA試料をDNA「チップ」に接触させ、ハイブリダイゼーションを検出する。

【0217】

いくつかの態様では、DNAチップアッセイ法はGeneChipアッセイ法である（Affymetrix, Santa Clara, CA；例えば、各々が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第6,045,996号；5,925,525号、および5,858,659号を参照されたい）。GeneChipアッセイ法は、「チップ」に貼り付けられた、微小化した高密度のオリゴヌクレオチドプローブアレイを用いる。プローブアレイは、アフィメトリックス（Affymetrix）の光方向（light-directed）化学合成過程によって製造されるが、これは固相化学合成法と、半導体業界で用いられるフォトリソグラフィ加工技術を組み合わせたものである。一連のフォトリソグラフィーマスクを用いてチップの暴露部位を規定し、その後、特異的な化学合成段階を行ない、アレイの予め決められた位置に各プローブの入った、高密度のオリゴヌクレオチドアレイが作製される。大きなガラスウェーハ上で、複数のプローブアレイが同時に合成される。その後、ウェーハを裁断し、各プローブアレイを射出成型プラスチックカートリッジに実装する。プラスチックカートリッジは、これを環境から守り、ハイブリダイゼーションのチャンバーとなる。

40

【0218】

50

解析する核酸を単離し、PCRで増幅し、蛍光レポーター基で標識する。次に標識されたDNAを分注システムを用いてアレイとインキュベートする。その後、アレイをスキャナーに入れ、ハイブリダイゼーションパターンを検出する。ハイブリダイゼーションデータは、プローブアレイに結合した標的に取り込み済の、蛍光レポーター基から発する光として、収集される。一般に、標的に完全に一致したプローブは、ミスマッチのあるものよりも強いシグナルを発する。アレイ上の各プローブの配列および位置は既知であるので、相補性によって、プローブアレイにかけられた標的核酸の同定ができる。

【0219】

別の態様では、電子的に捕獲したプローブを含むDNAマイクロチップ（Nanogen, San Diego, CA）を利用する（例えば、各々が参照として本明細書に組み入れられる米国特許第6,017,696号；6,068,818号；および6,051,380号を参照されたい）。マイクロエレクトロニクスを利用したナノジェン（Nanogen）の技術は、半導体マイクロチップ上の指定された試験部位へ、および試験部位から、荷電した分子を活発に移動および濃縮できる。特定のSNPまたは変異に特有なDNA捕獲プローブは、マイクロチップ上の特異的な部位に置かれるか、または「向け（address）」られる。DNAは強く負に荷電しているので、正の電荷の部分に電子的に移動できる。

【0220】

まず、マイクロチップ上の試験部位または試験列を、正の電荷で電子的に活性化する。次に、マイクロチップにDNAプローブを含む溶液を添加する。負に荷電したプローブは、正に荷電した部位に素早く移動し、そこで濃縮され、マイクロチップ上の部位に化学的に結合する。その後、マイクロチップを洗浄し、特異的に結合したDNAプローブが完成するまで、異なるDNAプローブの別の溶液を添加する。

【0221】

その後、どのDNA捕獲プローブが、被験試料中（例えば、PCR増幅した対象遺伝子）の相補的なDNAとハイブリダイズするかを決定することにより、標的DNA分子の存在を解析する。電子電荷は、マイクロチップ上の1つまたは複数の部位に標的分子を移動したり濃縮するためにも使用できる。各試験部位における試料DNAの電子的濃縮は、相補的な捕獲プローブとの被験DNAの迅速なハイブリダイゼーションを促進する（ハイブリダイゼーションは数分で起きる可能性がある）。各部位から未結合または非特異的に結合したDNAを除去するために、部位の極性または電荷を負に逆転させることにより、未結合または非特異的に結合したDNAを、捕獲プローブから離し、溶液中へ戻す。結合の検出には、レーザーに基づく蛍光スキャナーを用いる。

【0222】

また別の態様では、表面張力の差による平らな表面（チップ）上の液体の分離に基づくアレイ技術（ProtoGene, Palo Alto, CA）を使用する（例えば、各々が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第6,001,311号；5,985,551号；および5,474,796号を参照されたい）。プロトジェン（Protogene）の技術は、化学的コーティングによって与えられた、表面張力の差によって、平らな面上で液体を分離できるという事実に基づく。分離されると、オリゴヌクレオチドプローブは、試薬のインクジェットプリントによって、チップ上で直接に合成される。表面張力によって規定された反応部位を持つアレイは、4つの標準DNA塩基の1つずつに対応する4つの圧電ノズルのセット下で、X/Y移動ステージ上にマウントする。移動ステージは、アレイの各列に沿って移動し、各々の反応部位に適当な試薬を送達する。例えば、アミダイトAは、合成段階でアミダイトAがカップリングする部位にのみ送達される。共通の試薬および洗浄は、表面全体を溢れさせ、その後回転させて除去する。

【0223】

対象のSNPまたは変異に特有のDNAプローブは、プロトジェンの技術を用いてチップに貼り付ける。その後、チップを対象のPCR増幅遺伝子と接触させる。ハイブリダイゼーション後、未結合のDNAを除去し、任意の適当な方法でハイブリダイゼーションを検出する（例えば、取り込まれた蛍光基の蛍光消光の減少（de-quenc

hing) による)。

【0224】

別の態様では、多型性の検出に、「ビーズアレイ」を用いる (Illumina, San Diego, CA; 各々が参照として本明細書に組み入れられる、国際公開公報第99/67641号および00/39587号を参照されたい)。イルミナ (Illumina) は、光ファイバーの束と、アレイへと自己会合するビーズとを組み合わせたビーズアレイ技術を用いる。各光ファイバーの束は、束の直径によって、数千から数100万のファイバーを含む。ビーズは、特定のSNPまたは変異の検出のために特異的なオリゴヌクレオチドでコートされている。ビーズのバッチを組み合わせ、特定のアレイに特異的なプールを形成する。アッセイ法を行なうためには、調製した被験者試料 (例えば、DNA) をビーズアレイに接触させる。任意の適当な方法でハイブリダイゼーションを検出できる。

10

【0225】

C. ハイブリダイゼーションの酵素検出

本発明のいくつかの態様では、特異的な構造の酵素切断によって、ハイブリダイゼーションを検出する (INVADERアッセイ法、Third Wave Technologies; 例えば、各々が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,846,717号; 6,090,543号; 6,001,567号; 5,985,557号; および5,994,069号を参照されたい)。INVADERアッセイ法は、重複するオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションによって形成された複合体を、構造特異的酵素を用いて切断することによって、特異的なDNAおよびRNA配列を検出する。温度を上昇させ、プローブの1つを過剰にすることにより、温度サイクリングなしに、存在する各標的配列について、複数のプローブの切断が可能になる。これらの切断されたプローブは、第2の標識プローブの切断を指示する。2次プローブオリゴヌクレオチドは、内部の色素によって消光されるフルオレセインで5'末端が標識されている可能性がある。切断されると、デクエンチされたフルオレセイン標識産物は、標準的な蛍光プレートリーダーを用いて検出できる。

20

【0226】

INVADERアッセイ法は、増幅していないゲノムDNAにおいて特異的な変異およびSNPを検出する。単離されたDNA試料に、SNP/変異または野生型配列のいずれかに特異的な第1のプローブを接触させ、ハイブリダイズさせる。その後、第1のプローブに特異的で、蛍光標識を含む第2のプローブをハイブリダイズさせ、酵素を添加する。蛍光プレートリーダーを用いて結合を検出し、被験試料のシグナルを、既知の陽性および陰性対照と比較する。

30

【0227】

いくつかの態様では、結合したプローブのハイブリダイゼーションは、TaqManアッセイ法を用いて検出する (PE Biosystems, Foster City, CA; 例えば、各々が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,962,233号および5,538,848号を参照されたい)。アッセイ法は、PCR反応中に行なう。TaqManアッセイ法は、AMPLITAQ GOLD DNAポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を利用する。特定のアリルまたは変異に特異的なプローブは、PCR反応に入れられている。プローブは5'側レポーター色素 (例えば、蛍光色素) および3'側クエンチャー色素を持つオリゴヌクレオチドからなる。PCR中に、プローブが標的に結合すれば、AMPLITAQ GOLDポリメラーゼの5'-3'核酸分解活性は、プローブを、レポーター色素とクエンチャー色素の間で切断する。クエンチャー色素からレポーター色素が分離すると、蛍光が増加する。シグナルは各PCRサイクルで蓄積し、蛍光計でモニターできる。

40

【0228】

さらに別の態様では、多様性はSNP-ITプライマー伸長アッセイ法を用いて検出する (Orchid Biosciences, Princeton, NJ; 例えば、各々が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,952,174号および5,919,626号を参照されたい)。このアッセイ法では、特異的に合成したDNAプライマーおよびDNAポリメラーゼを用いて、SNPと疑われる位置でDNA鎖を1塩基選択的に伸長して、SNPを同定する。対象領域のDNAは、増幅し、変性させる。マイクロフルイディクスと呼ばれる微小化した系を用いて、ポリメラーゼ反応を行なう。

50

SNPまたは変異位置にあると疑われるヌクレオチドに標識を添加して、検出を行なう。DNAへの標識の取り込みは、任意の適当な方法で検出できる（例えば、ヌクレオチドがビオチン標識を含むならば、蛍光標識したビオチン特異的抗体で検出する）。

【0229】

5. 質量分析アッセイ法

いくつかの態様では、変種配列の検出にMassARRAYシステム（Sequenom, San Diego, CA）を用いる（例えば、各々が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第6,043,031号；5,777,324号；および5,605,798号を参照されたい）。DNAは、通常の手法で血液試料から単離する。次に、約200塩基対の長さの、対象の変異またはSNPを含む特異的DNA領域を、PCRで増幅する。増幅された断片の1つの鎖を固相表面に結合させ、固定していない鎖を標準的な変性および洗浄によって除去する。残った固定化した一本鎖は、遺伝型特異的診断産物を産生するための、自動酵素反応の鋳型となる。

【0230】

その後、通常5〜10ナノリットルの、非常に少量の酵素産物をSpectroCHIPアレイに移し、SpectroREADER質量分析計で自動分析する。調製された診断産物と共にマトリックスを形成する吸光性の結晶を、各スポットにあらかじめ入れておく。MassARRAYシステムは、MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間）質量分析を利用する。離脱として知られる過程で、レーザー光線からのパルスがマトリックスに当たる。レーザー光線のエネルギーは、マトリックスに伝えられ、これは気化し、少量の診断産物がフライトチューブに放出される。診断産物は荷電しているので、その後チューブに電場パルスをかけると、診断産物は、フライトチューブを検出器の方へ向かって発射する。電場パルスをかけてから、診断産物が検出器に衝突するまでの時間を、飛行時間と呼ぶ。分子の質量は、飛行時間に直接相関し、小さな分子は大きな分子よりも速く飛ぶので、これは産物の分子量を非常に精密に測定する。アッセイ全体は、1000分の1秒未満で完了するため、反復したデータ収集を含めて、合計3〜5秒で試料の解析ができる。その後、SpectroTYPERソフトウェアが計算、記録、比較し、1試料につき3秒の速度で、遺伝型を報告する。

【0231】

6. 差別型抗体結合による変種解析

本発明の他の態様では、個体が、変異を含むアトラスチン遺伝子をコードするアリルを持つかどうかを決定するために、抗体（抗体産生については以下を参照されたい）を使用する。好ましい態様では、変異体（切断したタンパク質）および野生型タンパク質（配列番号：2）の区別ができる抗体を用いる。

【0232】

7. HSPのリスク解析用キット

本発明は、個体がアトラスチンの野生型アリルか変種（例えば、変異または多型性）アリルのどちらを含むかを決定するための、キットも提供する。いくつかの態様では、キットは、被験者がHSPを発症するリスクを持つかどうかを決定するのに役立つ。診断キットは、様々な方法で産生される。いくつかの態様では、キットは変異アトラスチンアリルまたはタンパク質を特異的に検出するための試薬を、少なくとも1つ含む。いくつかの好ましい態様では、キットは野生型遺伝子の単一ヌクレオチド置換によって生じたSNPを検出するための、試薬を含む。これらの好ましい態様では、試薬はSNPを含む核酸にハイブリダイズし、SNPを含まない核酸には結合しない、核酸である。別の好ましい態様では、試薬はSNPを含むDNA領域を増幅するためのプライマーである。また別の態様では、試薬は野生型または変種のアトラスチンタンパク質のいずれかに、選択的に結合する抗体である。いくつかの態様では、キットは被験者がHSPを発症するリスクを持つかどうかを決定するための説明書も含む。好ましい態様では、説明書は、被験者において変異アトラスチンアリルの有無を検出することによって、HSPの発症リスクが決定され、単一ヌクレオチド置換変異を含むアリルを持つ被験者は、HSPを発症するリスクが上昇していると、説明している。いくつかの態様では、キットは緩衝剤、核酸安定化剤、タンパク質安定化剤、およびシグナル産生系（例えば、FRETシステムのような蛍光生成系）のような補助試薬を含む

。試験キットは、任意の適当な様式の包装であって、通常は、その要素は試験を実行するための説明書とともに、必要に応じて単一の容器または様々な容器に入っている。いくつかの態様では、キットは好ましくは陽性対照試料も含む。

【0233】

8. バイオインフォマティクス

いくつかの態様では、本発明はアトラスチンの1つまたは複数の変種アリの存在に基づいて、HSPの発症リスクを持つ個体を決定する方法を提供する。いくつかの態様では、変種データの解析は、コンピュータに保存（例えば、データベース中）された情報を用いて処理される。例えば、いくつかの態様では、本発明は、マルチプラットフォームのオブジェクト指向プログラミング言語を走らせている複数のコンピュータを含む、バイオイン

10

【0234】

IV. アトラスチン抗体の産生

アトラスチンタンパク質の検出を可能にするために、抗体を作製できる。抗体は、様々な免疫原を用いて調製できる。1つの態様では、ヒトアトラスチンを認識する抗体を作製するために、免疫原はアトラスチンペプチドである。そのような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab断片、およびFab発現ライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0235】

アトラスチンに対するポリクローナル抗体の産生には、当技術分野で周知の様々な手法が使用できる。抗体の産生には、アトラスチンエピトープに対応するペプチドの注射によって、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等を含むがこれらに限定されない、様々な宿主動物を免疫できる。好ましい態様では、ペプチドは免疫原性担体（例えば、ジフテリアアトキソイド、ウシ血清アルブミン(BSA)、またはスカシガイのヘモシアニン(KLH))に結合する。宿主の種に応じて、免疫応答を増加するために、様々なアジュバントが使用でき、これにはフロイント（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、スカシガイのヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG (Bacille Calmette-Guerin)およびコリネバクテリウム・パルヴム (*Corynebacterium parvum*) のような潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0236】

アトラスチンに対するモノクローナル抗体の調製には、細胞株の連続培養による抗体分子の産生を提供する、任意の技術が本発明に使用できると考えられる（例えば、HarlowおよびLane, 「抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい）。これらには、も

ともとKohlerおよびMilsteinによって開発されたハイブリドーマ技術（KohlerおよびMilstein (1975) Nature 256:495-497）、ならびにトリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えば、Kozborら(1983) Immunol. Tod., 4:72）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら(1985) 「モノクローナル抗体と癌療法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)」, Alan R. Liss, Inc., pp77-96)が含まれるが、これらに限定されない。本発明の別の態様では、PCT/US90/02545に記述されるような技術を用いて、無菌動物においてモノクローナル抗体が産生される。また、ヒト抗体は、ヒトハイブリドーマ（Coteら(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030）により、またはインビトロでEBVウイルスでヒトB細胞を形質転換することにより、産生されると考えられる(Coleら(1985) 「モノクローナル抗体と癌療法(Monoclonal Antibodi

40

50

es and Cancer Therapy)」, Alan R. Liss, pp77-96)。

【0237】

さらに、単鎖抗体の産生に関して記述された技術（参照として本明細書に組み入れられる米国特許第4,946,778号）は、アトラスチン特異的な単鎖抗体の産生に使用できる。本発明の別の態様は、Fab発現ライブラリーの作製について記述された技術を利用して（Huseら、(1989) Science 246:1275-1281）、アトラスチンに対する所望の特異性を持つモノクローナルFab断片の、迅速で簡便な同定を可能にする。

【0238】

抗体断片を産生するために適した任意の技術が、抗体分子のイディオタイプ（抗原結合領域）を含む抗体断片の作製に使用できると考えられる。例えば、そのような断片には、抗体分子のペプシン消化で産生できるF(ab')₂断片；F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製できるFab'断片；およびパパインと還元剤で抗体分子を処理して作製できるFab断片が含まれるが、これらに限定されない。

【0239】

抗体の産生では、所望の抗体のスクリーニングは当技術分野で周知の技術により実施できると考えられる（例えば、ラジオイムノアッセイ法、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ法、免疫放射分析、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散法、インサイチューイムノアッセイ法（例えば、金コロイド、酵素または放射性同位元素標識を使用）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ法（例えば、ゲル凝集アッセイ法、赤血球凝集アッセイ法等）、補体固定アッセイ法、免疫蛍光法、プロテインAアッセイ法、および免疫電気泳動法等）。

【0240】

1つの態様では、抗体の結合は、一次抗体上の標識を検出することにより、検出する。別の態様では、一次抗体は、一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することにより検出する。別の態様では、二次抗体は標識されている。当技術分野では、イムノアッセイ法における結合を検出するための多くの方法が周知であり、本発明の範囲内である。当技術分野で周知の通り、免疫原性ペプチドは、任意の免疫プロトコールで使用された担体分子なしで、提供される必要がある。例えば、ペプチドがKLHに結合された場合には、スクリーニングアッセイ法では、BSAに結合するか、直接使用できる。

【0241】

上述の抗体は、アトラスチンの局在性および構造に関して当技術分野で周知の方法において使用し（例えば、ウェスタンブロットティング）、適当な生体試料等の中でのレベルを測定できる。抗体は、個体から得られた生体試料中のアトラスチンの検出に使用できる。生体試料は、細胞を含む、血液、血清、血漿、組織間液、尿、脳脊髄液等を含むがこれらに限定されない体液でよい。

【0242】

生体試料は、適当な戦略（例えば、ELISAまたはラジオイムノアッセイ法）および形式（例えば、マイクロウェル、ディップスティック（例えば、国際公開公報第93/03367に記載される）等）を用いて、アトラスチンの存在を直接検定できる。または、試料中のタンパク質は、サイズで分離し（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在下または非存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)）、アトラスチンの存在を免疫ブロットティング（ウェスタンブロットティング）によって検出できる。免疫ブロットティング技術は、一般にタンパク質のエピトープに対応するペプチドに対して作製された抗体の方が効果が高いので、本発明には特に適している。

【0243】

別の態様では、抗原はアトラスチンのペプチド断片である；好ましくは、断片は高い抗原性を持つ。さらに別の態様では、変種または変異アトラスチンを認識する抗体を作製するために、免疫原はアトラスチンペプチドの変種または変異体である。このような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab断片、およびFab発現ライブラリーがあるがこれらに限定されず、上述のように調製および使用される。これらの抗原は

、上述のように個体から得られた生体試料におけるアトラスチンの断片または変種または変異を検出し、したがって、HSPに対する個体の感受性を予測するために使用できる。

【0244】

例えば、いずれか1つのエクソンにおけるタンパク質に対して、ペプチド抗体を合成できる。また、コンピュータアルゴリズムおよび他の方法によって、高い「抗原性」を持つ（免疫応答を誘発する可能性が高い）という判断に基づき、ペプチド断片を選択できる；その後、選択されたペプチドを合成する。ペプチド断片をウサギに注射し、定期的にウサギの採血を行い、採血の間にペプチド抗原で追加免疫する。この血清を抗体の供給源として使用し、ペプチド注射の前の血清を陰性対照として使用する。抗体は、血清をペプチドを含むカラムに通過させて親和性で精製し、ペプチドに結合する抗体のみを精製する。精製されない状態にあるこれらの抗体の少なくとも1つは、正常な血清には存在するが患者の血清には存在しない、ほぼ正しいサイズのタンパク質を検出する。抗体は、他のペプチド断片に対しても調製される。

【0245】

V. HSPの治療方法

A. アトラスチンを用いた遺伝子療法

本発明は、アトラスチンの発現、産生、または機能を改変するための遺伝子療法に適した、方法および組成物を提供する。上述のように、本発明はアトラスチン遺伝子を提供し、異なる種からアトラスチン遺伝子を入手する方法を提供する。したがって、以下の方法は、一般に多くの種に当てはまる。いくつかの態様では、遺伝子療法は、アトラスチンの野生型アリル（変異を含まないアリル）を被験者に提供することによって行われると考えられる。そのような治療を必要とする被験者は、上述の方法で同定される。

【0246】

インビボまたはエキスビボのターゲティングおよび治療手技で広く用いられるウイルスベクターは、DNAベースのベクターおよびレトロウイルスベクターである。そのようなウイルスベクターを作製する方法は、当技術分野で周知である（例えば、(1992) MillerおよびRosman, BioTech., 7:980-990を参照されたい）。好ましくは、ウイルスベクターは複製不能、すなわち、標的細胞中で自立して複製できない。一般に、本発明の範囲内で使用される複製不能ウイルスベクターのゲノムは、感染細胞におけるウイルスの複製に必要な少なくとも1つの領域を欠く。これらの領域は、当業者に周知の任意の技術によって、除去するか（全体または一部）、非機能的にできる。これらの技術には、全体の除去、置換（他の配列による、特に挿入された核酸による）、部分削除または、必須（複製に）領域への1つまたは複数の塩基の付加が含まれる。そのような技術は、遺伝子操作技術を用いるか、変異原性物質での処理により、インビトロ（単離されたDNA上）またはインサイチューで行なえる。

【0247】

好ましくは、複製不能ウイルスは、ウイルス粒子のエンキャプシデーションに必要なゲノム配列は保持している。DNAウイルスベクターには、単純ヘルペスウイルス(HSV)、パピローマウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)等を含むがこれらに限定されない、弱毒または欠陥DNAウイルスが含まれる。欠陥ウイルスは、細胞への導入後に感染性を持たないので、ウイルス遺伝子を完全またはほぼ完全に欠如している欠陥ウイルスが好ましい。欠陥ウイルスベクターを使用すると、ベクターが細胞に感染する懸念無しに、特定の限局された領域に投与できる。したがって、特定の組織が特異的に標的となり得る。特定のウイルスの例には、欠陥ヘルペスウイルス1(HSV1)ベクター（Kaplittrら(1991) Mol. Cell. Neurosci., 2:320-330）、糖蛋白L遺伝子を欠如した欠陥ヘルペスウイルスベクター（例えば、特許公報 RD 371005 Aを参照されたい）、または他の欠陥ヘルペスウイルスベクター（例えば、国際公開公報第94/21807号；および国際公開公報第92/05263号を参照されたい）；Stratford-Perricaudetら(J. Clin. Invest., 90:626-630 (1992)；またLa salleら(1993) Science 259:988-990も参照されたい)によって記述されたベクターのような弱毒化アデノウイルスベクター；欠陥アデノ

随伴ウイルスベクター (Samulskiら(1987) J. Virol., 61:3096-3101; Samulskiら(1989) J. Virol., 63:3822-3828; およびLebkowskiら(1988) Mol. Cell Biol., 8:3988-3996) があるがこれらに限定されない。

【0248】

好ましくは、インビボ投与には、ウイルスベクターおよびトランスフェクトされた細胞の免疫失活を避けるために、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター）と共に、適当な免疫抑制治療も行なう。例えば、ウイルスベクターに対する液性または細胞性免疫応答と阻止するために、インターロイキン-12 (IL-12)、インターフェロン γ (IFN- γ)、または抗CD4抗体のような、免疫抑制性サイトカインを投与できる。また、発現する抗原の数を最低限にするように操作されたウイルスベクターを用いると都合が良い。

10

【0249】

好ましい態様では、ウイルスはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスは、真核生物のDNAウイルスで、様々な種類の細胞に、本発明の核酸を効率良く送達するために修飾できる。本発明は、ヒトおよび動物起源のアデノウイルスを考慮する（国際公開公報第94/26914号参照）。様々な血清型のアデノウイルスが存在する。本発明の範囲内で使用できる動物起源のアデノウイルスには、イヌ、ウシ、マウス（例えば、Mav1, Beardら、(1990) Virol., 75-81）、ヒツジ、ブタ、トリ、およびサル（例えば、SAV）起源の、アデノウイルスが含まれる。好ましくは、動物起源のアデノウイルスは、イヌアデノウイルスで、より好ましくはCAV2アデノウイルス（例えば、ManhattanまたはA26/61株（ATCC VR-800））である。

20

【0250】

好ましくは、本発明の複製不能アデノウイルスベクターは、ITR、エンキャプシレーション配列、および対象核酸を含む。より好ましくは、アデノウイルスベクターの少なくともE1領域は、非機能的である。E1領域の欠失は、好ましくはAd5アデノウイルスのヌクレオチド455から3329位（PvuII-BglIII断片）、または382から3466位（HinfII-Sau3A断片）に広がっている。他の領域、特にE3領域（例えば、国際公開公報第95/02697号）、E2領域（例えば、国際公開公報第94/28938号）、E4領域（例えば、国際公開公報第94/28152号、国際公開公報第94/12649号、および国際公開公報第95/02697号）、または後期遺伝子L1～L5の任意のものも、修飾されている可能性がある。

【0251】

30

好ましい態様では、アデノウイルスベクターは、E1領域に欠失を持つ（Ad 1.0）。E1欠失アデノウイルスの例は、欧州特許第185,573号に開示されており、その内容は参照として本明細書に組み入れられる。別の好ましい態様では、アデノウイルスはE1およびE4領域に欠失を持つ（Ad 3.0）。E1/E4欠失アデノウイルスの例は、国際公開公報第95/02697号および国際公開公報第96/22378号に開示されている。さらに別の好ましい態様では、アデノウイルスベクターは、E1領域に欠失があり、ここにE4領域および核酸配列が挿入されている。

【0252】

本発明に係る複製不能組換えアデノウイルスは、当技術分野で周知の任意の方法を用いて調製できる（例えば、Leveroら(1991) Gene 101:195；欧州特許第185 573号；およびGraham (1984) EMBO J., 3:2917を参照されたい）。特に、これらはアデノウイルスと、とりわけ対象DNAを持つプラスミドとの間の、相同組換えによって調製できる。相同組換えは、アデノウイルスとプラスミドを適当な細胞株にコトランスフェクションしてから実施できる。利用する細胞株は、好ましくは、(i) 使用する要素によって形質転換でき、および(ii) 組換えのリスクを避けるために、好ましくは組み込まれた形で、複製不能アデノウイルスのゲノムの一部を補完できる配列を含む。使用できる細胞株の例は、ゲノム中にAd5アデノウイルスのゲノムの左側の部分（12%）が組み込まれているヒト胚腎細胞株293（Grahamら(1977) J. Gen. Virol., 36:59）、ならびに、国際公開公報第94/26914号および国際公開公報第95/02697号に記述されるように、E1およびE4機能を補完できる細胞株である。組換えアデノウイルスは、当業者に周知の標準的な分子生物学的技術を用いて、回

40

50

収および精製する。

【0253】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は比較的小さなDNAウイルスで、感染した細胞のゲノムに、安定に部位特異的に組み込まれることができる。細胞の増殖、形態、または分化に影響を与えることなく、広範囲の細胞に感染でき、またヒトの病理に関与しているとは考えられない。AAVゲノムは、クローニング、配列決定、および解析されている。約4700塩基の長さで、両端に約145塩基の逆方向反復配列(ITR)を持つが、これはウイルスの複製開始点となる。ゲノムの残りの部分はエンカプシレーション機能を持つ2つの必須領域：ウイルス複製とウイルス遺伝子の発現に関与しているrepを含むゲノムの左側部分；およびウイルスのキャプシドタンパク質をコードするcap遺伝子を含むゲノムの右側部分に分けられる。

10

【0254】

インビトロおよびインビボにおける遺伝子移入のためのAAV由来ベクターの利用法は、記述されている(例えば、各々が参照として本明細書に組入れられる、国際公開公報第91/18088号；国際公開公報第93/09239号；米国特許第4,797,368号；米国特許第5,139,941号；および欧州特許第488 528号を参照されたい)。これらの出版物は、repおよび/またはcap遺伝子が削除され、対象遺伝子で置換された様々なAAV由来構築物、ならびにインビトロ(培養細胞中へ)またはインビボ(直接生物体中へ)の対象遺伝子の移入のための、構築物の利用を記述する。本明細書にかかる複製不能組換えAAVは、2つのAAV逆方向反復配列(ITR)に挟まれた対象核酸配列を含むプラスミドと、AAVエンカプシレーション遺伝子(repおよびcap遺伝子)を含むプラスミドとを、ヒトヘルパーウイルス(例えばアデノウイルス)が感染した細胞株にコトランスフェクションすることによって、調製できる。産生されたAAV組換え体は、標準的な技術によって精製できる。

20

【0255】

別の態様では、レトロウイルスに遺伝子を導入できる(各々が参照として本明細書に組入れられる、米国特許第5,399,346号、4,650,764号、4,980,289号、および5,124,263号；Mannら(1983) Cell 33:153；Markowitzら(1988) J. Virol., 62:1120；PCT/US95/14575；欧州特許第453242号；欧州特許第178220号；Bernsteinら、(1985) Genet. Eng., 7:235；McCormick, (1985) BioTechnol., 3:689；国際公開公報第95/07358号；およびKuoら(1993):845)。レトロウイルスは、分裂する細胞に感染する、組込み型ウイルスである。レトロウイルスゲノムは、2つのLTR、エンカプシレーション配列、および3つのコード領域(gag、pol、およびenv)を含む。一般に、組換えレトロウイルスベクターでは、gag、pol、およびenv遺伝子は全体または部分的に削除され、関心のある異種核酸配列で置換されている。これらのベクターは、HIV、MoMuLV(「マウスモロニー白血病ウイルス」)、MSV(「マウスモロニー肉腫ウイルス」)、HaSV(「ハーベイ肉腫ウイルス」)；SNV(「脾臓壊死ウイルス」)；RSV(「ラウス肉腫ウイルス」)、およびフレンドウイルスのような様々なタイプのレトロウイルスから作製できる。欠陥レトロウイルスベクターは、国際公開公報第95/02697号にも開示されている。

30

【0256】

一般に、核酸配列を含む組換えレトロウイルスを作製するために、LTR、エンカプシレーション配列、およびコード配列を含むプラスミドを作製する。この構築物を用いて、パッケージング細胞株をトランスフェクトするが、この細胞株は、プラスミドの持たないレトロウイルス機能を、トランスで供給することができる。したがって一般に、パッケージング細胞株は、gag、pol、およびenv遺伝子を発現できる。そのようなパッケージング細胞株は、先行技術で記述されており、特に細胞株PA317(参照として本明細書に組み入れられる米国特許第4,861,719号)、PsiCRIP細胞株(国際公開公報第90/02806を参照されたい)、およびGP+envAm-12細胞株(国際公開公報第89/07150号を参照されたい)がある。さらに、組換えレトロウイルスベクターは、転写活性を抑制するためにLTR内に修飾、およびgag遺伝子の一部を含むことのある広範なエンカプシレーション配列(Benderら(1987) Virol., 61:1639)を含む可能性がある。組換えレトロウイルスベクターは、当業

40

50

者に周知の標準的な技術によって精製できる。

【0257】

または、リポフェクションにより、インビボでベクターを導入することができる。過去10年、インビトロで核酸の被包およびトランスフェクションのために、リポソームの使用が増加してきた。リポソームを介するトランスフェクションに伴う困難および危険を制限するために設計された、合成陽イオン性脂質を用いて、マーカーをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリポソームが調製できる (Felgnerら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417; また、Mackeyら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 85:8027-8031; Ulmerら(1993) Science 259:1745-1748も参照されたい)。陽イオン性脂質を利用すると、負に荷電した核酸の被包を促進し、負に荷電した細胞膜との融合も促進する可能性がある (FelgnerおよびRingold (1989) Science 337:387-388)。核酸の移入に特に有用な脂質化合物および組成物は、参照として本明細書に組み入れられる、国際公開公報第95/18863号および国際公開公報第96/17823号、ならびに米国特許第5,459,127号に記述されている。

10

【0258】

インビボで核酸のトランスフェクションを容易にするために、陽イオン性オリゴヌクレオチド (例えば、国際公開公報第95/21931号)、DNA結合タンパク質由来のペプチド (例えば、国際公開公報第96/25508号)、または陽イオン性ポリマー (例えば、国際公開公報第95/21931号) のような、他の分子も有用である。

【0259】

20

インビボで、裸のDNAプラスミドとして、ベクターを導入することも可能である。裸のDNAを調製し哺乳類の筋肉組織に導入する方法は、共に参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,580,859号および5,589,466号に開示されている。

【0260】

遺伝子療法のためのDNAベクターは、トランスフェクション、電気穿孔法、マイクロインジェクション、トランスダクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈澱、遺伝子銃の使用、またはDNAベクタートランスポーターの使用 (例えば、Wuら、(1992) J. Biol. Chem., 267:963; WuおよびWu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621; およびWilliamsら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726を参照されたい) を含むがこれらに限定されない、当技術分野で周知の方法によって、所望の宿主細胞に導入できる。また受容体を介したDNA送達手法も (Curielら 1992) Hum. Gene Ther., 3:147; およびWuおよびWu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429) 使用できる。

30

【0261】

B. アトラスチンポリペプチドの投与

本発明はHSPを罹患する患者にアトラスチンを投与するために適した、方法および組成物も提供する。上述のように、本発明はアトラスチンおよびその断片、変異体、変種、および融合体をコードするヌクレオチド、ならびにコードされたポリペプチドを産生する方法を提供する。以下の方法は、一般に多くの種に当てはまる。

【0262】

いくつかの態様では、本発明は精製されたアトラスチンペプチドを含む組成物を提供し; 別の態様では、本発明は、すべてアトラスチンの生物活性を持つ、精製されたアトラスチンポリペプチド断片、変異体、変種、または融合体を提供する。断片、変異体、変種、または融合体は、必要に応じて、HSPの治療法としての性能を改善するために、アトラスチンの特性を改変するために使用できる。そのような特性には、保管と投与の際の安定性、循環半減期、活性レベル、基質特異性、特定の組織への局在性、および受容体または酵素複合体のような他の分子との相互作用が含まれる。例えば、好ましくは、タンパク質は非常に長い循環半減期を持つように操作される。そのような特性は、上述のようにして導入できる。ポリペプチドは上述のようにして産生できる。組成物は、既述のようにして、調製できる。

40

【0263】

50

別の態様では、本発明はHSPを持つ患者の治療法を提供するが、これには治療に有効量のアトラスチンを投与して、疾患の症状を軽減することが含まれる。医学の分野で周知のように、1人の患者への投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与する特定の化合物、性別、投与の時間および経路、健康状態、および同時に投与される他の薬剤との相互作用を含む多くの要素に依存する。任意の投与方法が予測されるが、以下にさらに説明するように、好ましくはポリペプチドは静注投与される。

【0264】

VI. アトラスチンを用いた薬剤スクリーニング

本発明は、例えば、アトラスチンGTPアーゼ活性および関連する症状（例えば、HSP）を改変できる薬剤のスクリーニングのための標的として、アトラスチンを用いるための、方法および組成物を提供する。例えば、アトラスチンのGTPアーゼ活性を誘導または阻害する薬剤は、アトラスチンを標的とするか、アトラスチン遺伝子発現を調節する化合物をスクリーニングすることにより、同定できる。本発明は、特定の作用機序には限定されない。実際、本発明の実施には機構の作用機序の理解は不要である。

【0265】

1つのスクリーニング方法では、アトラスチンの存在下で、アトラスチンGTPアーゼ活性のアッセイに化合物を添加し、GTPアーゼ活性レベルに対する化合物の効果を決定することにより、候補化合物がGTPアーゼ活性を改変する能力について評価する。

【0266】

別の技術では、上述のようにして作製したアトラスチン抗体を利用する。アトラスチンペプチドに特異的に結合する能力のある抗体は、アトラスチンと1つまたは複数の抗原決定基を共有する任意のペプチドの存在を検出するために使用できる。そのようなペプチドは、上述のようにして、プロテアーゼ活性を評価できる。

【0267】

本発明は、化合物のスクリーニングのための、多くの他の方法を考慮する。上述の例は、利用できる技術の範囲を説明するためのものに過ぎない。当業者は、他の多くのスクリーニング方法が使用できることを理解するだろう。

【0268】

特に、本発明は化合物の活性のスクリーニング、および特にコンビナトリアルライブラリー（例えば、 10^4 個以上の化合物を含むライブラリー）から得られた化合物のハイスループットスクリーニングのための、アトラスチンおよびその変種でトランスフェクトされた細胞株の利用を考慮する。本発明の細胞株は、様々なスクリーニング法で使用できる。いくつかの態様では、細胞は、転写/翻訳レベルで細胞応答をモニターする、レポーター遺伝子アッセイ法で使用できる。別の態様では、細胞は、外部刺激に対する細胞の全体的な増殖/非増殖応答をモニターするための、細胞増殖アッセイ法で使用できる。

【0269】

細胞はレポーター遺伝子アッセイ法に役立つ。レポーター遺伝子アッセイ法では、レポーター遺伝子のコード配列へスプライスされた、標的遺伝子（標的疾患の生物学的発現および機能を制御する遺伝子）の転写制御要素を含む核酸をコードするベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を利用する。したがって、標的遺伝子が活性化すると、レポーター遺伝子産物が活性化する。本発明で利用できるレポーター遺伝子の例には、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ホタルおよび細菌のルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、 β ラクタマーゼ、および緑色蛍光タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。緑色蛍光タンパク質を除いて、これらのタンパク質の産生は、特異的な基質（例えば、X-gal、およびルシフェリン）の化学発光、比色分析、または生物発光を用いて検出する。既知および未知の活性を持つ化合物の比較は、上述のようにして行うことができる。

【0270】

VII. アトラスチンヌクレオチド、ペプチドおよび抗体、ならびに類似体を含有する薬学的組成物

10

20

30

40

50

本発明はさらにアトラスチンポリヌクレオチド配列の全てまたは部分、アトラスチンポリペプチド、抗体などのアトラスチン生物活性のインヒビターまたはアンタゴニストを単独でまたは少なくとも1つの別の作用物質、例えば安定化化合物と組み合わせて含み、そして非限定例としては生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロースおよび水などのいずれかの滅菌生体適合性の薬学的担体中で投与することができる薬学的組成物を提供する。

【0271】

本発明の方法はアトラスチンGTPアーゼ活性の増加または減少を特徴とする疾患の治療または生理学的状態の変化における用途を見出している。本発明はアトラスチンのペプチドまたはペプチドフラグメントまたは変種を投与することによりアトラスチンGTPアーゼ活性を増加させるための方法を提供する。または、前述のスクリーニング法により見出された、アトラスチンGTPアーゼ活性を増加させるように作用する薬物を投与する。

10

【0272】

薬学的に許容される担体、例えば生理学的食塩水中でペプチドを患者に静脈投与することができる。ペプチドの細胞内分配のための標準的な方法（例えばリポソームを介する分配）を用いることができる。このような方法は当業者に公知である。本発明の処方是非経口投与、例えば静脈内、皮下、筋肉内、および腹腔内投与に有用である。ポリペプチドの治療用投与を、前記したような遺伝子治療を用いて細胞内で達成することもできる。

【0273】

医学の分野で周知であるように、いずれかの患者の投与は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間および経路、一般健康状態、ならびに同時投与されるその他の薬物との相互作用などの多くの因子に依存する。

20

【0274】

従って、本発明のいくつかの態様では、アトラスチン・ヌクレオチドおよびアトラスチンアミノ酸配列を単独で、またはその他のヌクレオチド配列、薬物、もしくはホルモンと組み合わせて、または（複数の）賦形剤もしくはその他の薬学的に許容される担体と混合された薬学的組成物で投与することができる。本発明の1つの態様では、薬学的に許容される担体は薬学的に不活性である。本発明の別の態様では、アトラスチンポリヌクレオチド配列またはアトラスチンアミノ酸配列を単独で個体対象に、またはHSPを患う対象に投与することができる。

【0275】

30

治療される条件に依存して、これらの薬学的組成物を処方し、そして全身的または局所的に投与することができる。処方および投与の方法を「Remington's Pharmaceutical Sciences」（Mack Publishing Co, Easton ペンシルバニア州）の最新版に見出すことができる。適当な経路には、例えば経口または経粘膜投与；および筋肉内、皮下、髄内、鞘内、脳質内、静脈内、腹腔内、または鼻内投与などの非経口分配を含めることができる。

【0276】

注射用には、本発明の薬学的組成物を水溶液に、好ましくは生理学的に適合するバッファー、例えばハanks溶液、リンガー溶液、または生理学的に緩衝された生理食塩水で処方することができる。組織または細胞投与のためには、特定のバリヤを浸透するのに適当な浸透剤を処方に用いる。このような浸透剤は一般に当技術分野において公知である。

40

【0277】

その他の態様では、本発明の薬学的組成物を経口投与に適した用量で、当技術分野において公知の薬学的に許容される担体を用いて処方することができる。このような担体により、治療される患者が経口または鼻で摂取するための錠剤、丸剤、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として薬学的組成物を処方することが可能になる。

【0278】

本発明で使用するのに適した薬学的組成物には、活性成分を意図する目的を達成するのに有効な量で含有する組成物などがある。例えば有効量のアトラスチンは、HSPを患わない正常な個体に適合するアトラスチンGTPアーゼ活性に至る量でよい。有効量の決定は、特に本明細書で提供する開示に鑑みて、十分に当業者の能力内である。

50

【0279】

活性成分に加えて、これらの薬学的組成物は、薬学的に使用することができる、活性化化合物を調製物に加工するのを促す賦形剤および補助剤を含む適当な薬学的に許容される担体を含有することができる。経口投与用に処方された調製物は錠剤、糖衣錠、カプセル、または溶液の形態でよい。

【0280】

本発明の薬学的組成物をそれ自体が公知である様式で（例えば慣用される混合、溶解、顆粒化、糖衣作製、粉末化、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥方法により）製造することができる。

【0281】

非経口投与用の薬学的処方には水可溶性形態の活性化化合物の水溶液などがある。さらに、活性化化合物の懸濁液を適当な油状注射用懸濁液として調製することができる。適当な凍結乾燥溶媒または媒質には脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチルもしくはトリグリセリド、またはリポソームなどがある。水性注射用懸濁液は懸濁液の粘性を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含有することができる。選択的には、高度に濃縮された溶液の調製を可能にするために、懸濁液は適当な安定剤、または化合物の溶解性を増加させる作用物質を含有することもできる。

【0282】

適当な補助剤を添加した後、活性化化合物を固体賦形剤と組み合わせ、選択的には得られた混合物を粉砕し、そして顆粒の混合物を加工し、望む場合は錠剤または糖衣錠コアを得ることにより、経口使用のための薬学的調製物を得ることができる。適当な賦形剤は炭水化物またはタンパク質充填剤、例えばラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールなどの糖；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ等のデンプン；セルロース例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム；ならびにアラビアゴムおよびトラガントなどのゴム；ならびにタンパク質、例えばゼラチンおよびコラーゲンである。望む場合、崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加することができる。

【0283】

適当なコーティング、例えば濃縮糖溶液を用いた糖衣錠コアが提供され、これはアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール・ゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含有することもできる。製品識別のため、または活性化化合物の量（すなわち投与量）を特徴付けるために染料または色素を錠剤または糖衣錠コーティングに添加することができる。

【0284】

経口的に用いることができる薬学的調製物にはゼラチンで作られたプッシュ・フィット・カプセル、ならびにゼラチンおよびコーティング、例えばグリセロールまたはソルビトールで作られたソフトな、密閉カプセルなどがある。プッシュ・フィット・カプセルは充填剤または結合剤、例えばラクトースまたはデンプン、滑沢剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、および選択的に安定剤と混合した活性成分を含有することができる。ソフトカプセルでは、活性化化合物を適当な液体、例えば脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールに、安定剤を伴って、または伴わずに溶解または懸濁することができる。

【0285】

薬学的に許容される担体中に処方された本発明の化合物を含む組成物を調製し、適当な容器に入れ、そして指示された症状の治療のためのラベルを付けることができる。アトラスチンのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列のためにラベルに指示された症状にはアポトーシスに関連する症状の治療を含めることができる。

【0286】

薬学的組成物を塩として提供することができ、そしてそれを多くの酸、非限定例としては塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を用いて形成することができる。塩は水性または対応する遊離塩基の形態であるその他のプロトン性溶媒でさらに可溶化される傾向がある。別の場合で、好ましい調製物は、使用前にバッファと組み合わせた、1mMから50mM ヒスチジン、0.1%から2%スクロース、2%から%マンニトール (pH4.5から5.5の範囲) 中の凍結乾燥粉末でよい。

【0287】

本発明の方法で使用するいずれかの化合物のために、治療上有効な量を最初に細胞培養アッセイ法から推定することができる。次いで、好ましくは、投与量を動物モデル（特にマウスモデル）で処方して、望ましい循環濃度範囲を達成し、アトラスチンレベルを調整することができる。

10

【0288】

治療上有効量とは疾病状態の症状を改善するアトラスチンまたは変種または薬物のその量を意味する。このような化合物の毒性および治療効果を、例えばLD₅₀（集団の50%致死量）およびED₅₀（集団の50%において治療上有効な量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順により決定することができる。毒性および治療効果の間の用量比は治療指数であり、そしてLD₅₀/ED₅₀として表現することができる。大きな治療指数を呈する化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイ法およびさらなる動物実験から得られたデータを、ヒト使用のための用量範囲を策定するのに用いることができる。好ましくは、このような化合物の用量は毒性が全くないかまたはわずかしかないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にある。用いる投与形態、患者の感受性、および投与経路に依存して、この範囲内で用量を変化させる。

20

【0289】

正確な用量は、治療される患者に鑑みて個々の医師により選択される。用量および投与を調整して、十分なレベルの活性部分を提供するか、または望ましい効果を維持する。考慮に入れることができるさらなる因子には、疾病状態の感受性；年齢、体重および患者の性別；食事、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応感受性、および治療に対する耐性/応答などがある。長時間作用性薬学的組成物を3から4日毎に、毎週、または2週毎に1回投与することができ、これは特定の処方の半減期およびクリアランス速度に依存する。

30

【0290】

通常の投与量は0.1から100,000 μgまでで変化し、投与経路に依存して、全量約1gまででよい。特定の投与量および分配の方法に関する手引きは文献で提供されている（例えば米国特許第4,657,760号；第5,206,344号；または第5,225,212号（その全てが参照として本明細書に組み入れられる）参照）。当業者は、アトラスチンのインデューサーまたはエンハンサーとは異なるアトラスチンの処方を用いる。骨髄に対する投与には静脈内注射とは異なる様式での分配を必要とし得る。

【0291】

VIII. 外来性アトラスチン遺伝子ならびにその相同体、変異体および変種を発現するトランスジェニック動物

40

本発明は外来性アトラスチン遺伝子、またはその相同体、変異体、もしくは変種を含むトランスジェニック動物の作製を企図する。好ましい態様では、トランスジェニック動物は野生型動物と比較して変化した表現型を表示する。いくつかの態様では、変化した表現型は、アトラスチン発現の野生型レベルと比較して、アトラスチン遺伝子のmRNAの過剰発現である。別の態様では、変化した表現型は内因性アトラスチン発現の野生型レベルと比較して、内因性アトラスチン遺伝子のmRNAの発現の低下である。別の態様では、トランスジェニックマウスはアトラスチン遺伝子のノックアウト変異を有している。さらに別の態様では、変化した表現型はアトラスチン変異遺伝子の発現である。好ましい態様では、トランスジェニック動物はHSP疾患表現型を表示する。このような変化した表現型の存在ま

50

たは不在を分析するための方法には、ノーザンブロッティング、mRNA保護アッセイ法、RT-PCR、抗体でのタンパク質発現の検出、およびアトラスチンGTPアーゼ活性の検出などがある。

【0292】

本発明のトランスジェニック動物は薬物および治療計画スクリーニングでの使用が見出されている。いくつかの態様では、被験化合物（例えばHSPを治療するのに有用であることが推測されている薬物）および対照化合物（例えばプラセボ）をトランスジェニック動物および対照動物に投与し、そして効果を評価する。次いで疾患症状に及ぼす被験および対照化合物の効果を判定する。

【0293】

種々の方法によりトランスジェニック動物を作製することができる。いくつかの態様では、種々の発達段階の胚細胞を用いてトランスジェニック動物を生成するための導入遺伝子を導入する。胚細胞の発達の段階に依存して、異なる方法を用いる。接合子はマイクロインジェクションのための最も良好な標的である。マウスでは、雄性前核は直径およそ20 μm の大きさに達し、これによりDNA溶液の1から2ピコリットル (pl) の再現可能な注射が可能になる。遺伝子移入のための標的としての接合子の使用には、たいいていの場合、注射されたDNAが最初の切断の前に宿主ゲノムに組み込まれるという点で主要な利点がある (Brinsterら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:4438-4442 (1985))。結果的に、非ヒトトランスジェニック動物の全ての細胞が組み込まれた導入遺伝子を担持する。生殖細胞の50%が導入遺伝子を宿すので、これはまた、概して導入遺伝子の創始動物から子孫への効率のよい伝達に反映される。米国特許第4,873,191号は接合子のマイクロインジェクションのための方法を開示し；この特許の開示は参照として本明細書に組み入れられる。

【0294】

その他の態様では、レトロウイルス感染を用いて導入遺伝子をヒト以外の動物に導入する。いくつかの態様では、レトロウイルスベクターを利用して、卵母細胞の卵黄周囲腔へのレトロウイルスベクターの注射により卵母細胞をトランスフェクトする (米国特許第6,080,912号、これは参照として本明細書に組み入れられる)。その他の態様では、発達中のヒト以外の胚をインビトロで胚盤胞段階まで培養することができる。この期間中に割球をレトロウイルス感染の標的にすることができる (Janenich、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73:1260 (1976))。透明帯を除去する酵素処理により割球の有効な感染が得られる (Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、ニューヨーク州 (1986))。導入遺伝子を導入するのに用いたウイルスベクター系は典型的には導入遺伝子を担持する複製欠損レトロウイルスである (Jahnerら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:6927 (1985))。ウイルス産生細胞の単層で割球を培養することにより容易におよび効率的にトランスフェクションが得られる (Van der Putten、前記；Stewartら、EMBO J.6:383 (1987))。または、感染を後期段階で行うことができる。ウイルスまたはウイルス産生細胞を胞胚腔に注射することができる (Jahnerら、Nature 298:623 (1982))。組み込みはトランスジェニック動物を形成する細胞のサブセットにおいてのみ生じるので、たいいていの創始動物は導入遺伝子に関してモザイク状である。さらに、創始動物は、子孫では遺伝的に分離されるゲノムの異なる位置で、導入遺伝子の種々のレトロウイルス挿入を含有し得る。加えて、妊娠中期の胚の子宮内レトロウイルス感染により、たとえ効率が低くても、生殖系列に導入遺伝子を導入することも可能である (Jahnerら、前記 (1982))。当技術分野において公知のトランスジェニック動物を作製するためのレトロウイルスまたはレトロウイルスベクターを用いる別の手段は、レトロウイルス粒子またはマイトマイシンC処理したレトロウイルス産生細胞の、受精卵または早期胚の卵黄周囲腔へのマイクロインジェクションに関する (PCT国際出願、国際公開公報第90/08832号 (1990)、ならびにHaskellおよびBowen、Mol.Reprod.Dev.40:386 (1995))。

【0295】

別の態様では、導入遺伝子を胚性幹細胞に導入し、そしてトランスフェクトされた幹細胞を利用して胚を形成する。適当な条件下で移植前の胚をインビトロで培養することによ

りES細胞を得ることができる (Evansら、Nature 292:154 (1981) ; Bradleyら、Nature 309:255 (1984) ; Gosslerら、Proc.Acad.Sci.USA 83:9065 (1986) ; およびRobertsonら、Nature 322:445 (1986))。リン酸カルシウム同時沈殿、プロトプラストまたはスフェロプラスト融合、リポフェクションおよびDEAE-デキストラン媒介トランスフェクションなどの当技術分野における公知の種々の方法でDNAをトランスフェクトすることにより、導入遺伝子をES細胞に効率的に導入することができる。レトロウイルス媒介形質導入により、またはマイクロインジェクションにより導入遺伝子をES細胞に導入することもできる。このようなトランスフェクトされたES細胞は、未分化胚芽細胞段階の胚の胞胚腔への導入に続いて、その後胚をコロニー化し、そして得られるキメラ動物の生殖細胞系に寄与することができる (概説に関しては、Jaenisch、Science 240:1468 (1988) 参照)。トランスフェクトされたES細胞の胞胚腔への導入の前に、トランスフェクトされたES細胞を種々の選択プロトコールに供して、導入遺伝子がこのような選択のための手段を提供すれば、導入遺伝子を組み込んだES細胞を富化することができる。または、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、導入遺伝子が組み込まれたES細胞をスクリーニングすることができる。この技術により胞胚腔への移動の前に適当な選択条件下でトランスフェクトされたES細胞を成長させる必要性が回避される。

10

【0296】

さらに別の態様では、相同組換えをロックアウト遺伝子機能に利用するかまたは欠失変異を作製する。相同組換えの方法は米国特許第5,614,396号に記載されており、これは参照として本明細書に組み入れられる。

20

【0297】

IX. アトラスチン相互作用分子を同定するためのスクリーニング

アトラスチンに特異的に結合し、そしてアトラスチンと相互作用する低分子を探すために本発明により企図されるいくつかの異なる研究法がある。1つの研究法はアトラスチンをコードする核酸を含む発現構築物を細胞にトランスフェクトすることである。次にアトラスチンを相互作用性分子と一緒に沈殿させ、そして同定することができる。誘導プロモーターの調節下、細胞を構築物で一過性にトランスフェクトするか、または安定してトランスフェクトすることができる。その他の態様には本発明の翻訳およびペプチド精製などがある。次いで精製されたペプチドを用いて化合物:タンパク質特異的相互作用を試験することができる。加えて、翻訳された本発明に対する抗体を作製することが可能であり、これにより免疫学的アッセイ法、例えば非限定例としては、RIA、ELISAまたはウェスタンブロットの開発が可能になる。さらにトランスジェニック動物を生成することができ、これによりインビボアッセイ法を実施することが可能になる。

30

【0298】

A. インビトロアッセイ法

a. トランスフェクションアッセイ法

トランスフェクションアッセイ法により、アッセイ法の開発における自由度が非常に大きくなる。広範な種類の市販により入手可能なトランスフェクションベクターが非常に多くの細胞型で本発明のアトラスチン遺伝子を発現することが可能になる。1つの態様では、必要な場合、翻訳および転写の開始を可能にする誘導プロモーターを含む、アトラスチンをコードする核酸を含む発現構築物で細胞を一過性にトランスフェクトする。アトラスチンの発現を変調することが推測される作用物質に細胞を暴露し、そして発現のスイッチを入れ、そして測定する。本発明を発現する細胞におけるアトラスチン発現率を、変異アトラスチン遺伝子を発現する構築物でトランスフェクトした細胞および対照発現ベクター (例えば空の発現ベクター) を発現する細胞における発現率と比較する。文献で報告され、そして当業者に公知の多くのいずれかの方法により発現率を定量化することができる。

40

【0299】

別の態様では、安定してトランスフェクトされた細胞系、すなわち本発明のアトラスチン変異体を安定して発現する細胞系を開発する。誘導プロモーターの使用はこれらの形質転換を利用する。アトラスチン活性を変調することが推測される化合物に関するスクリー

50

ニングアッセイ法は、一過性トランスフェクションアッセイ法と同一の様式で行われる。安定してトランスフェクトされた細胞系の使用により、実験間の一貫性をより大きくすることが可能になり、そして実験間比較が可能になる。

【0300】

B. インビボアッセイ法

a. トランスジェニック動物アッセイ法

1つの態様では、トランスジェニック動物は標準的なプロトコール（例えばSambrookeら参照）を用いて構築される。トランスジェニック動物の作製によりアトラスチンの変異形態が疾患の生理学またはその治療を決定するための手段を提供し得る疾患の調査が可能になる。

10

【0301】

2. 類似性または相同性遺伝子変異を発現する腫瘍を同定するためのスクリーニング

1つの態様では、マイクロアッセイマイクロチップ技術を用いてスクリーニングを構築する。これにより、アトラスチン遺伝子に類似するかまたは相同である変異遺伝子が発現する細胞を同定するためのハイスループットスクリーニングの開発が可能になる。

【0302】

3. アトラスチンシグナル経路構成要素を同定するためのスクリーニング

A. インビトロアッセイ法

アトラスチン相互作用分子を同定するためにいくつかの異なる研究法がある。本発明により不活性（または活性が低下した）アトラスチンまたは構成性活性アトラスチン分子にのみ随伴され得るタンパク質の同定が可能になる。このようなタンパク質はアトラスチンの機能を制御し得る。使用できる技術は、非限定例としては、本発明の転写産物に対して作製された抗体を用いるアトラスチンの免疫沈澱である。これによりいずれかの随伴される結合タンパク質もまた沈殿される。別の方法は、一般的に認識されたプルダウンタンパク質、例えばグルタチオンS-トランスフェラーゼに連結されたアトラスチンの変異形態を含有する融合タンパク質を作製することである。次いで結合タンパク質が回避され、そして分析され得る。

20

【0303】

a. 免疫沈澱

野生型および変異アトラスチンに対する抗体を作製した後、トランスフェクトされたアトラスチンを発現する細胞を溶解し、そして次に抗体の1つと共にインキュベートする。次いで標準的な技術を用いて、結合アトラスチンを伴う抗体およびいずれかの随伴されるタンパク質をプロテインAセファロースまたはプロテインGセファロースビーズでプルダウンすることができる。

30

【0304】

b. 融合タンパク質プルダウン

免疫沈澱に類似の方法は変異および野生型アトラスチンおよびグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）の融合タンパク質を構築することである。次いでアトラスチン融合タンパク質を細胞抽出物と共にインキュベートし、そして次にグルタチオン・セファロースビーズを除去する。次いでいずれかの結合アトラスチンタンパク質を特徴付けする。

40

【0305】

B. インビボアッセイ法

a. 酵母ツーハイブリッド系

酵母ツーハイブリッド系は活性転写因子二量体を再構築することにより2つのタンパク質間の相互作用を同定する。その一方は目的の第1のタンパク質（DB-X）に融合したDNA結合ドメイン（DB）を含有し、他方は目的の第2のタンパク質（AD-Y）に融合した活性化ドメイン（AD）を含有する2つの融合タンパク質間で二量体が形成される。DB-X:AD-Y相互作用は、関連するDB結合部位を含有するプロモーターにより誘導される、染色体に組み込まれたレポーター遺伝子を活性化する機能的転写因子を再構成する。酵母ツーハイブリッド系で大きなcDNAを容易にスクリーニングすることができる。酵母cDNAライブラリーは市販

50

されている。標準的な分子生物学的技術を用いて相互作用タンパク質を単離および特徴づけすることができる。

【0306】

アトラスチン相同体を同定するためのスクリーニング

標準的な分子生物学的技術を用いてヒトまたはその他の種におけるアトラスチン相同体を同定することができる。例えば本発明は、非限定例としては、DNA-DNAハイブリダイゼーション技術（例えばサザンブロット）およびDNA-RNAハイブリダイゼーション技術（例えばノーザンブロット）などの種々の研究法を企図する。さらなる技術には、例えばアトラスチンの翻訳産物に対して作製された抗体を用いるライブラリーストックから作られたタンパク質の免疫スクリーニングなどがある。さらに、アトラスチンの公知のまたは推測される相互作用性タンパク質の免疫沈澱に続いて、アトラスチンの翻訳産物に対して作製された抗体を用いて可能な変異アトラスチン相同体を同定することができる。

10

【0307】

実施例

特定の好ましい態様および本発明の局面を説明するために以下の実施例を提供するが、本発明の範囲を限定するように意図したものではない。

【0308】

以下の実験の開示では、以下の略語が適用される。

eq（当量）；M（モル濃度）； μ M（マイクロモル濃度）；N（規定濃度）；mol（モル）；mmol（ミリモル）； μ mol（マイクロモル）；nmol（ナノモル）；g（グラム）；mg（ミリグラム）； μ g（マイクログラム）；L（リットル）；ml（ミリリットル）； μ l（マイクロリットル）；cm（センチメートル）；mm（ミリメートル）； μ m（マイクロメートル）；nm（ナノメートル）； $^{\circ}$ C（摂氏温度）；RDA（発現差解析法(representational difference analysis)）；nts（ヌクレオチド）；n（個数）；gDNA（ゲノムDNA）；cM（センチモルガン）。

20

【0309】

実施例1

遺伝子連鎖分析

この実施例はどのように個体を選択し、そしてどのように遺伝子分析を実施したかを示す。3つの常染色体優性HSP家系を評価した。公開されている診断基準（Finkら、（1996））に従ってHSPを診断した。各罹患対象は10歳以前（通常5歳以前）に徴候を発症した。これらの個体に関するHSPの出生前診断およびADHSP-T家系の骨格筋生検は以前に報告されていた。60歳以上の111人の対照対象から試料を入手し、神経学および精神医学の研修医のチームにより試験され、そして情報提供診断のスクリーニング基準（the Screening Criteria of Informative Diagnoses）を完了していた。この研究およびインフォームド・コンセントの方法はミシガン大学施設内治験審査委員会により承認された。

30

【0310】

末梢血白血球からDNAを抽出し、マイクロサテライトDNA多型を分析し、そして2点ロッドスコアを算出した。遺伝子連鎖分析のために、遺伝の常染色体優性一遺伝子様式を用い、疾患アレル頻度を0.001とし、そして遺伝子浸透度=0.90とした。婚姻している配偶者が少なすぎるので、アレル頻度を正確には算出できなかった。その代わりに、アレル頻度を同等であると仮定した。

40

【0311】

マーカーD14S976、D14S306、D14S1031、D14S301を試験することによりSPG3座位に対する遺伝子連鎖を評価した。加えて、ADHSP-S家系に関しては、コンティグNT_010050のBAC 476J6に存在する高度に多型性である3ヌクレオチド反復(CTT)₅₅に対して、SPG3座位に対する遺伝子連鎖を評価した。PCRプライマーGAG1a（5'-acttcagcctaggcgacagag-3' [配列番号:6]、NT_010050ヌクレオチド807918から807938位）；およびGAG1b（5'-aatggtagaagcttaatt-3' [配列番号:7]、NT_010050ヌクレオチド807700から807718位）をこの分析に使用した。

50

【0312】

2点ロッドスコアにより、各家系における障害はSPG3座位に連鎖した。最大2点ロッドスコア ($\theta = 0$ で) は、ADHSP-TのD14S584に関しては+5.59; ADHSP-PのD14S746に関しては+4.63; ならびにADHSP-SのD14S269に関しては+2.28およびADHSP-SのGAG1に関しては+2.70であった。

【0313】

常染色体優性HSPに関する別の座位に対する連鎖分析を、SPG4 (D2S352、D2S367、D2S2325、D2S2203、D2S2351)、SPG6 (D15S118、D15S542、D15S543、D15S128)、SPG8 (D8S266、D8S1799、D8S1138、D8S1179)、SPG11 (D12S83、D12S1691、D12S368)、SPG12 (D19S412、D19S420、D19S408、D19S881)、SPG13 (D2S2318、D2S2392) に対する連鎖を試験することにより評価した。陰性ロッドスコアが各ファミリーのこれらの別のHSP座位を有意に排除した。

10

【0314】

実施例2

SPG3候補遺伝子の同定

SPG3座位 (D14S259からD14S978) にわたるジェノスコープ (Genoscope) コンティグおよびNCBI コンティグのDNA配列は公にアクセス可能なデータベース (国立生物学的情報およびジェノスコープセンター [フランス教育省・科学技術省 (MENRT); フランス国立科学研究センター (CNRS) およびフランス科学イノベーション移転カンパニー (French Scientific Innovation and Transfer Company, FIST) により委託されている]) で利用可能である。ESTおよびcDNA配列のいくつかを各々存在注釈が付いているNCBI コンティグと共に列挙し、その他を、(オークリッジ国立研究所 (Oak Ridge National Laboratory) (Oak Ridge、テネシー州) のライフサイエンス部門のコンピューターバイオロジー・セクションからの) プログラムのPIPELINEスーツのGENESCANおよびGRAILプログラムを用いてこれらのコンティグDNA配列の分析により同定した。可能性のあるエクソンの配列およびこの様式で同定された候補遺伝子をBLAST分析により公のデータベースの配列と比較した (国立生物学的情報センター、ジェンバンク (Genbank) および全米バイオテクノロジー情報センター、ヒトゲノムシークエンシング)。可能な場合はいつでも、gDNA配列をEST (国立生物学的情報センター、発現遺伝子配列断片データベース) と比較することにより、これらの可能性のある候補遺伝子に関するイントロン・エクソン境界を決定した。GrailおよびGenescanプログラムを用いて、ESTおよびcDNAクローンを利用できない推定遺伝子に関するイントロン・エクソン境界を予測した。イントロン・プライマーを設計して (DNASTarのPrimerselect LaserGeneプログラムを用いて) 各々の候補遺伝子エクソンを増幅した。

20

30

【0315】

SPG3座位は、間隔をBAC R-586C14 (Genoscope [フランス教育省・科学技術省 (MENRT); フランス国立科学研究センター (CNRS) およびフランス科学イノベーション移転カンパニー (FIST) により委託されている]) で始まるBACコンティグにより; およびジェンバンク (Genbank) に列挙される12BACコンティグにより測ると、D14S259とD14S978の間で2.7cMにわたる (データは示していない)。我々は、個々のBACエレメントからのSTS増幅の組み合わせにより; および「仮想」PCR (BLAST分析を用いて規定のSTSのDNA配列が存在注釈の付いたコンティグ配列に含まれたかどうかを決定した (国立生物学的情報センター)) によりこれらのコンティグのSTS含量を確認した。存在注釈の付いたNCBI コンティグと共に列挙されたESTおよびcDNA配列の分析により; ならびに (オークリッジ国立研究所 (Oak Ridge、テネシー州) のライフサイエンス部門のコンピューターバイオロジー部署からの) コンティグおよび個々のBAC DNA配列のPIPELINE分析により23個の可能性のある候補遺伝子を同定した。これらの候補遺伝子のうちの13個を分析した。

40

【0316】

実施例3

SPG3候補遺伝子のシークエンシング

50

ADHSP-P家系の3人の罹患対象および1人の非罹患対象からのgDNA試料において候補遺伝子の疾患特異的変異に関する最初の分析を実施した。この最初の被験コホートの罹患対象におけるアトラスチン遺伝子変異の発見に続いて、この家系から、およびADHSP-TおよびADHSP-S家系からの利用可能な各対象ならびに111人の対照対象からのgDNA試料を分析した。DNA 50ngを各候補遺伝子エクソンのPCR増幅に使用した（表1参照）。

【0317】

セファデックスG-50カラムでPCR産物を精製し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した後、サイクルシーケンシングした。ABI PRISM 3100遺伝子分析器で、ABI PRISM dローダミンターミネーターサイクルシーケンシングレディー反応キット（dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit）（PE Applied Biosystems、米国）を用いて、製造者の指示書に従ってPCRプライマーの1つで精製したPCR産物をシーケンシングした。各エクソンの双方の鎖をシーケンシングした。シーケンシングデータをLasergeneプログラム（DNASTar）のSeqManで分析した。

【0318】

RT-PCRキット（Gibco/BRL、米国）を用いて、製造者の指示書に従ってヒト成人および胎児脳および成人肺、腎臓、心臓および肝臓（Stratagene、米国より購入）からの全RNA（1μg）で逆転写PCR（RT-PCR）を実施した。逆転写（50℃で30分間）に続いて、プライマー：

フォワード：5'-CAGGGAACCCAGCATGAAGAACTA-3' (配列番号:8)

リバース：5'-CCCCGGCAGGTGATTTTATT-3' (配列番号:9)

を用いて1本鎖cDNAをPCR増幅し（94℃で30秒間、55℃で30秒間、および72℃で30秒間を20サイクル）、アトラスチンcDNAの886から1130位にわたる244bpのDNAフラグメントを増幅した。RT-PCR産物をアガロースゲル電気泳動で可視化し、そして分子サイズ標準と比較した。

【0319】

ライトサイクラー（LightCycler）RNA増幅キットシーバークリーンI（SYBR Green I）キット（Roche、米国）を用いた定量的RT-PCRにより、製造者の指示書に従って、ヒト成人肺、腎臓、心臓、肝臓（Stratagene、米国より購入）および脳（Gibco/BRL、米国より購入）からの全RNA試料で複数のヒト組織におけるアトラスチン発現の定量分析を評価した。LightCyclerプログラムには逆転写段階（55℃で10分間）、最初の変性（95℃で30秒間）、続いて95℃で1秒間、56℃で10秒間、および72℃で12秒間の45サイクルが含まれる。製造者の指示書に従ってサイクリング過程を行った直後に最終溶融曲線分析を実施した。これらの組織間で比較を行えるように、このようにして測定したアトラスチン遺伝子発現をL32および-アクチン遺伝子発現に対して正規化した。

【0320】

この分析により、LOC51062（Genbankアクセッション番号:NM_015915）、I.M.A.G.E.コンソーシアムcDNAクローン25221（Genbankアクセッション番号AF131801）の一部と同等である仮説cDNAが示されたが、これは5'末端でさらに14bp、およびさらに3'非翻訳配列の60bpを含有する。ADHSP-P対象のLOC51062/25221エクソン配列の分析により、各罹患対象（n=13）のcDNA 25221（全長cDNAのヌクレオチド944位に相当、図2）のヌクレオチド541位で異型接合性（CおよびAの双方）が示され；一方各非罹患対象（n=6）および各対照対象（n=111）はこの位置でCのみを有し、これはコンティグNT_010035のgDNA配列ならびにLOC51062および25221のcDNA配列と合致する。別のSPG3連鎖ADHSP家系（ADHSP-T）からの試料のこの領域のシーケンシングにより、各罹患対象（n=16）におけるcDNA 25221ヌクレオチド538位（全長cDNAのヌクレオチド941位に相当、図2）での異型接合性（AおよびG、図2）が示され；この家系における各非罹患対象（n=22）および各対照対象（n=111）はAのみを有し、これはコンティグNT_010035のgDNA配列ならびにLOC51062および25221のcDNA配列と同一である。ADHSP-PおよびADHSP-T家系の3人の罹患および1人の非罹患対象の各々の残りのLOC51062/25221エクソンのシーケンシングにより、その他の疾患特異的変

10

20

30

40

50

異は何ら示されなかった。しかしながら、第3のSPG3連鎖ADHSP家系（ADHSP-S）からの試料の各LOC51062/25221エクソンのシーケンシングにより、各々の罹患対象（n=8）の（以下で論じる全長cDNAの）ヌクレオチド883位で異型接合性（CおよびT）が示されたが、この家系の各非罹患対象（n=2）および各対照対象（n=111）はこの位置でCのみを有した。この家系の罹患および非罹患対象の各々の残りのエクソンのシーケンシングにより、その他の疾患特異的変異は何ら示されなかった。

【0321】

【表1】

エクソン	プライマー	プライマー配列	PCR 産物 (bp)	PCR 条件*		
1	1f	CCCTTGGCCCTCCCTGTCT	454	C	10	
	1r	GGGGGTGCTGTTTATTTGTTT				
2	2f	GTCCCCAAAGCACTGAGGTT	465	C		
	2r	CTTGGCACTTTGAGATGATTAGC				
	2.1f	GAAAATTGGTCTGTGTAGTT	401	C		
	2.1r	AAGAGGAGGAGCCAGTGAAAA				
	3	3f	GTTATAATTTCGCCTACTCTGA	500	B	
		3r	GATGGTTGCTCCTCTGT			
4	4f	TTCTAACCAAAGCAGTCA	464	B		
	4r	ATGGCATGTGTAAGAAAT				
5	5f	TGGGCCAATAGTTCTGTT	370	A		
	5r	TCATTGTTTCATTCCCTATTGTCTC				
6	6f	TTCCTCATTTCATCTCATTCTAT	295	A		
	6r	TTGCAGGTGCTAAAGTTCTCT				
7	7f	CACCAAATGATCCAACAGA	208	A	20	
	7r	GGCACCTTAAAGTCCTCATA				
8	8f	ATACATCCAGCGCCCATAGAATC	468	A		
	8r	TTAGTAGCAGCCCTGTCGTGTCAT				
9	9f	CTCAAGATAAAAGGGGACAATAAT	465	B		
	9r	GGGAGGAAATGGGGGAGAT				
10	10f	TGAACACATAAATAGGTAAAGT	416	B		
	10r	CAGATTGGCAGACAGAGATG				
11	11f	GTTGCATGAAGGATACTGGTTT	254	A		
	11r	AATTATTTTGAGGACTTTGGTTTC				
12	12f	GTGTGCTGAATTTAGTTG	626	C		
	12r	GATAGGGGGTGGAAAGAT				
13	13f	TTCTACACATTTCATGAAACAAATACTG	607	C		
	13r	CACAATGGGGAATGAATGAAG				
14	14f	TTTATAACAGCATTTTGAAG	530	B		
	14r	ACACATTGAGGAGTTGAA				

* 使用したPCR条件には、94℃で5分間の最初の変性、次いで94℃で30秒間、55℃で30秒間、および72℃で30秒間の90サイクルなどがある。最終伸長は72℃で7分間実施した。

A:PerkinElmerのAmpTaqを使用した。全容量25μlにはDNA（50ng）、0.5μMプライマー、200μM dNTP、AmpliTaq 1単位、1.5mM MgCl₂、10mM Tris-HCl、pH8.3、50mM KCl、および0.01重量/容量%ゼラチンが含まれる。

B:KaKara（日本）のExTaqを使用した。PCRミックス25μlは、DNA 50ng、0.5μMプライマー、25mM TAPS（25℃でpH9.3）、50mM KCl、2mM MgCl₂、1mM 2-メルカプトエタノール、および200μM dNTPを含有する。

C:PCR反応ミックスはAと同一であったが、用いたPCRプログラムは以下のような60から55℃タッチダウンであった:最初の5サイクルでアニーリング温度をサイクル毎に1℃ずつ60℃から55℃まで低下させ、続いて55℃のアニーリング温度で30サイクル行った。

【0322】

実施例4

全長cDNAの入手

I.M.A.G.E. コンソーシアムcDNAクローン25221は存在注釈が付いているコンティグNT_010035のBAC 184B9に含まれる。BAC 184B9のPIPELINE分析により、cDNAクローン25221のこれらの上流でさらなる転写配列が予測された。ヒト胎児脳cDNAライブラリー（Stratagene、米国）に由来するこの上流配列のPCR増幅および配列分析により、このさらなる配列が

10

20

40

50

転写され（データは示していない）、そしてcDNA 25221の配列と直接隣接することが確認された。このcDNA配列をコンティグNT_010035のgDNA配列との比較により、さらなる5'転写配列の存在を示す、保存されたスプライス・アクセプター・モチーフが同定された。これはまたノーザンブロット分析（以下で論じる）によっても示唆され、ここでヌクレオチド886から1130bp（全長cDNAのナンバリング）を増幅することにより作製されたプローブにより、入手可能なcDNA配列（cDNAクローン25221にBAC 184B9のPIPELINE分析およびPCRおよび前述のシーケンシングにより同定されたさらなる上流隣接配列の200bpを加える）よりもおよそ200bp長い、優性2.2kb転写物が示された。5'RACEを実施することにより、このさらなる上流転写配列をクローン化およびシーケンシングした。

【0323】

5'RACEを用いて（GeneRacer Kit、Invitrogen、Carlsbad、カリフォルニア州、米国）アトラスチンcDNAの5'末端を同定した。第1鎖合成のために製造者の指示書に従って、ヒト胎児脳RNA（1μg）（Stratagene、米国から購入）およびアトラスチン特異的プライマー（5'-CTCGTTCAGATCCACCTC-3' [配列番号:10]）を用い；次いで2つのネステッド遺伝子特異的プライマー：

(5'-CCTTTTTCAGTGGCTCCTCTCTCTG-3' [配列番号:11],

5'-CTCCAGCAACAGATACAGCAACAACCTCCTT-3' [配列番号:12])

を用いて増幅し、そして（GeneRacer Advanced RACEキット、Invitrogen、米国を用いて）アトラスチンcDNAの5'末端フラグメントを、BAC 184B9で同定されたさらなるcDNA配列の5'末端に対して作られたプライマーでシーケンシングした。

【0324】

cDNAクローン25221の5'末端を5'RACEにより202bp伸長した。得られた2.2kb cDNA配列はノーザンブロット分析と密接に合致し、これは主に成人および胎児脳における2.2kb転写物を示した。ノーザンブロットを以下のように実施した：アトラスチンcDNAのヌクレオチド886から1130位の間のアトラスチンcDNAフラグメントのPCR増幅により作製した³²P標識244bpプローブに、ヒト多組織ノーザンブロット（Human 12-Lane MTN Blot、Human Brain MTN Blot II、およびHuman Fetal MTN Blot II；Clontech、米国）をハイブリダイズした。SSCおよび0.1%SDS中室温で20分間、そして次に0.1xSSCおよび0.1%SDS中65℃で30分間を2回、ノーザンブロットを洗浄した。Storm840ホスホイメジャー（Molecular Dynamics）で画像を展開し、そしてX線フィルムに暴露した。少量のわずかに大きな転写物（～2.7kb）もまた検出され、これは代替スプライシングまたは相同性転写物に対する交差ハイブリダイゼーションを表し得る。一貫して豊富なmRNAおよびスプライシングパターンが、異なる脳領域で観察された。定量RT-PCR実験により、試験した組織全てにおいて測定可能な発現が示されたが、成人脳における発現はその他の組織よりも少なくとも50倍高かった（データは示していない）。

【0325】

この新規遺伝子（「アトラスチン」と称する）の全長cDNAおよびアミノ酸配列（Genbank AY032844）を示す（図2）。アトラスチンの2.2kb cDNA配列の翻訳により、開始メチオニン、続いて558アミノ酸の単一のオープンリーディングフレームおよび停止コドンが示された。gDNAおよびcDNA配列を比較することにより、アトラスチンのコード化配列が～69kbにわたる14個のエクソンに分かれていることが示された。コンセンサス・スプライシング・ドナーおよびスプライシング・アクセプターを各エクソンに関して同定した（データは示していない）。ADHSP-PおよびADHSP-T家系における疾患特異的アトラスチン変異（各々アトラスチンcDNAヌクレオチド944および941位；図2）がアトラスチンのエクソン8に生じ、そして隣接するアミノ酸S259YおよびH258Rの変化が予測される。ADHSP-S家系の疾患特異的ミスセンス変異（R239C）はエクソン7に生じる（アトラスチンcDNAヌクレオチド883位；図2）。

【0326】

実施例5

10

20

30

40

50

アトラスチンゲノム構成の決定およびペプチド分析

コンティグNT_010035配列とcDNAクローン25221配列との間の比較により10個の完全なエクソン（番号3から11および14）および2個の部分的エクソン（番号2および12）を同定した。PIPELINE分析および5'RACE実験（前述した）によりエクソン1および完全なエクソン2、完全なエクソン12およびさらなる15bpエクソン（エクソン13）を同定し、そしてこれらのエクソンをシーケンシングにより確認した（図1および表2参照）。

【0327】

Psi-Blastのデフォルト値の複数の反復を用いてアトラスチン相同体を見出した。タンパク質予測（Predict Protein）サーバーでPHD予測アルゴリズムを用いて2次構造予測を実施した。

10

【0328】

ヒトグアニル酸結合タンパク質1（hGBP1）のX線結晶構造、PDB座標1F5Nをアトラスチンのホモロジーモデリングのための足場として用いた。hGBP1およびPsi-Blastで得られたアトラスチンのアミノ酸配列アラインメントをさらに手作業で最適化した。最適化した配列アラインメントをModeller4（ロックフェラー大学、ニューヨーク州ニューヨーク、のタンパク質構造モデル化ソフトウェアプログラム）にインポートし、そこでホモロジーモデルを組み立て、そしてエネルギーを最小化した。いくつかのループ領域を除去し、そしてModeller4で続くエネルギー最小化を実施した。プロチェック（Procheck）を用いて最終ホモロジーモデルの立体化学を分析した。

【0329】

20

実施例6

アトラスチンの特徴づけ

SPG3座位に連鎖した3人の早期発症ADHSP家系における疾患特異的アトラスチン変異の発見に続いて、SPG3座位に対する連鎖に関して予備選択しなかった10人の早期発症ADHSP家系からのDNA試料を分析した。これらのファミリーのうちの2つでは、罹患個体がADHSP-S家系で見出された同一の変異（R239C）を有した。続く遺伝子連鎖分析により、ADHSP-A家系がSPG3座位に対して連鎖したことが示された（最大2点ロッドスコアはマーカーGAG1に関して $\theta = 0$ で+2.75であった）；ADHSP-M家系は有意な遺伝子連鎖分析には小さすぎた。R239C変異を有する家系は明確には関連していないが、ハロタイプ分析により遠位の創始者効果が排除されなかった。

30

【0330】

アトラスチンアミノ酸配列（分子量～63.5kD）は3個の保存モチーフ、P-ループ（74GAF RKGKS81）、DxxG（146DTQG）、およびRD（217RD）を含有し、グアニル酸結合/GTPアーゼ活性部位を特徴とする。DxxGおよびRDモチーフの双方はhGBP1などのGTPアーゼのサブセット、およびGTPアーゼ活性部位がN/TKXDモチーフの代わりにRDループを含むマウスARL-相互作用タンパク質2（アクセッション番号NP_062691）に特異的である。スパスチンおよびパラプレギンに存在するAAAモチーフは同定しなかった（SPG4連鎖ADHSPおよびSPG7連鎖常染色体劣性HSPを各々引き起こす変異）。

【0331】

アトラスチンはヒトグアニル酸結合タンパク質1（hGBP1）に対して；およびマウスのグアニル酸結合タンパク質（ARL-相互作用タンパク質2）、キイロショウジョウバエ（*D.melanogaster*）（CG6668遺伝子産物）、および線虫（*C.elegans*）（推定グアニル酸結合タンパク質AF303255）に対して有意な相同性を示す。GTPアーゼのセプチンファミリーのヒトおよびマウスのメンバー（ヒトセプチン3 [NP_061979] およびマウスセプチン3 [神経細胞特異的、NP_036019]）もまたGTPアーゼドメインにおいて配列類似性を示した。スパスチン、パラプレギン、プロテオリピドタンパク質、またはL1CAMに対しては相同性が観察されず、その変異は別の形態のHSPを引き起こす（および概説）。

40

【0332】

これらの中で、アトラスチンはhGBP1に最も高い相同性を示す。アトラスチンの予測された2次構造はアミノ末端GTPアーゼドメイン、続いて主にヘリックスであるドメインを含

50

み、その特徴はhGBP1に匹敵する。アトラスチンとhGBP1との間の配列相同性はGTPアーゼの長さの至る所で、そしてカルボキシ末端ヘリックスドメインの途中までで最も顕著であった。アトラスチンのGTPアーゼドメインおよびヘリックスドメインの半分のホモロジーモデリングにより、アトラスチンは、GTPアーゼドメインおよびヘリックスドメインの最初の半分の双方が緊密に詰め込まれた疎水性コアを有していることが予測された。GTPアーゼドメインはヌクレオチド結合部位を伴う α/β 構造からなる。活性部位はよく整列されていて、GTPと生化学的に感受性のある接触を形成するいくつかの残基を含む。アトラスチンのP-ループ(74GAFRKGKS81)、DxxG(146DTQG)およびRDモチーフ(217RD)は類似の位置およびコンフォメーションにあり、そしてhGBP1の匹敵する残基と類似の相互作用を形成することができる。これらの観察により、アトラスチンが機能的GTPアーゼ活性部位を含有することが示唆される。

10

【0333】

HSP特異的アトラスチン変異は、保存されたGTPアーゼドメインを含有する球状のアミノ末端領域の表面に位置するが、予測されるGTPアーゼ活性部位自体には生じない。

【0334】

hGBP1に対する相同性により、アトラスチンは大きなGTPアーゼのダイナミンファミリーにグループ分けされる(概説されている)。本発明はいずれかの特定の理論に限定されるものではないが、ダイナミンは、原形質膜からのクラスリンコートされた小胞の形成、レセプター媒介エンドサイトーシス、およびトランス・ゴルジ網へのエンドソーム輸送の間、広範な種類の小胞輸送事象に本質的な役割を果たしている。これは神経伝達および神経栄養因子の作用に関して重要な関連性を有し得る。ダイナミンはシナプス小胞の迅速でそして有効なリサイクル、神経伝達に関する重要な過程、およびシナプス膜形態学の維持に必須である。加えて、ダイナミンはミトコンドリアの維持および分布に関係しており；そしてアクチンおよび微小管などの細胞骨格エレメントに随伴されることが見出されている。

20

【0335】

【表 2】

エクソン の長さ (bp)	エクソンの開始から終了*	アクセプタープライス 部位におけるイントロン配列	ドナープライス部位に おけるイントロン配列	イントロン*	イントロン の長さ (bp)
1 202	126383-126584	GTCAC	GTGAGTAGCAATGAGAACT	101312-126379	25067
2 248	101064-101311	CTGCTCTGTTCAACAG	GTATGCAGGAAGTACTTTAA	98202-101063	2862
3 135	98067-98201	TAGACTTTATCATTTTATAG	GTATGATGCTAAGTTCCTAA	97608-98066	459
4 105	97503-97607	TTTACTCTCTTGCTGTAG	GTATGAAATAAGCCATTTT	95292-97502	2211
5 51	95241-95291	AATTTATTTCTTTATCAAG	GTAAACAATATTTATTTCTT	93566-95240	1675
6 57	93509-93565	GTGTGTAATTTTTTCTAG	GTGAGCGAGTGTTAAATGAT	75822-93508	17687
7 93	75729-75821	CCTTCTTATTTATTTTATAG	GTTTGTAGATATTTAGGTG	74708-75728	1021
8 139	74569-74707	TTCAGAAATGATTTACTGCAG	GTTTGTGTCCTTTAATGAAT	68488-74568	6081
9 128	68360-68487	GGATTGCTTTTACTTGTAG	GTATCACTCTCATTTCTAGA	67245-68359	1115
10 57	67188-67244	ATCTTTTCTTTTCTTTTATAG	GTATTTATTAATGAGGAGGC	65911-67187	1277
11 72	65839-65910	ATTTGTACTTTGTCCAAAG	GTAAGAGTTAAATATTTTAA	61061-65838	4778
12 432	60629-61060	TACTTCTCTATCTGATACAG	GTAAGAACACCTTTAATTTCA	60139-60628	490
13 15	60124-60138	TAATCTGCGTTTGGCACAG	GTAAGTTAAATTTTAAAA	57906-60123	2218
14 444	57462-57905	TTTGTGATGCTTTTATTTCTAG			

* エクソンおよびイントロンの開始から終了はゲノムコンティグNT_010035を参照し、エクソンおよびイントロンの双方の配向はNT_010035のゲノム配列に相補的である。

【0336】

実施例7

アトラスチン遺伝子診断のための方法学

アトラスチンコード化配列は多くの別個のエクソンに分かれている。これらのエクソンにおける変異は痙性対麻痺を引き起こす。これらの変異の検出がアトラスチン遺伝子診断の基礎である。我々はアトラスチン遺伝子構成（イントロン・エクソン境界；表2参照）を決定している。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて各々のアトラスチン・エクソンを増幅する。次いで各エクソンを増幅し（DNAシーケンシングのために十分な量にするため）、そして次に自動DNAシーケンシングを用いてアトラスチン・エクソンのDNA配列

10

20

30

40

50

を決定する。患者のDNA配列を正常な対照対象のもの（すなわち野生型アトラスチン遺伝子、配列番号:1）と比較する。

【 0 3 3 7 】

前記から明らかであるように、本発明は遺伝性痙性対麻痺および関連する疾患の研究、診断および治療のための新規組成物および方法を企図する。

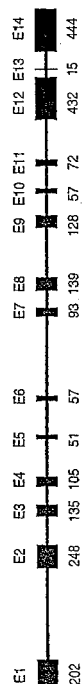
【図面の簡単な説明】

【 0 3 3 8 】

【図1】アトラスチンゲノムの構造を示す。アトラスチンをコードする配列は、~69 kbのゲノムDNAに広がり、14のエクソンに分割されている。エクソンの長さ(bp)が示されている。

【図 2】 アトラスチン cDNA（配列番号：1）およびペプチド配列（配列番号：2）を示す。

【図 1】



【図 2】

[illegible]

【配列表】

0004324472000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 M

(72)発明者 ツァオ シンピング
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ノース ペンバートン サークル ドライブ 3 2
3 4

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第00/037630 (WO, A1)
Nat.Genet., Vol.29, No.3(2001.Nov.)p.326-331
Ann.Neurol., Vol.51, No.6(2002.Jun.)p.794-795

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq