

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006 年 6 月 1 日 (01.06.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/057396 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 9/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/021842
- (22) 国際出願日: 2005 年 11 月 29 日 (29.11.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2004-343923  
2004 年 11 月 29 日 (29.11.2004) JP  
特願 2005-263898 2005 年 9 月 12 日 (12.09.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鵜殿 平一郎 (UDONO, Heiichiro) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 山野 武寿 (YAMANO, Taketoshi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF RECONSTITUTING PROTEASOME

(54) 発明の名称: プロテアソームの再構成方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of reconstituting 26S proteasome from cells or a tissue in a relatively small amount. Namely, a method of reconstituting 26S proteasome *in vitro* which comprises incubating a cell or tissue lysate in the presence of hsp70, hsp70/hsp40, hsp90 or PA28.

(57) 要約: 本発明の目的は、比較的少量の細胞や組織から 26S プロテアソームを再構成する方法を提供することである。本発明によれば、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90 又は PA28 の存在下において細胞又は組織のライセートをインキュベートすることを含む、26S プロテアソームをインビトロで再構成する方法が提供される。



WO 2006/057396 A1

## 明 細 書

### プロテアソームの再構成方法

### 技術分野

- [0001] 本発明は、26Sプロテアソームを再構成するための新規な方法、並びに当該方法により再構成された26Sプロテアソームに関するものである。より詳細には、本発明は、hsp70、hsp70/hsp40、hsp90、又はPA28などの分子シャペロンを用いた26Sプロテアソームの再構成方法、並びに当該方法により再構成された26Sプロテアソームに関するものである。

### 背景技術

- [0002] 細胞内において不要なタンパク質が分解されるメカニズムとして、ユビキチン依存性の分解経路が知られている。ユビキチンは76アミノ酸からなる小タンパク質であり、酵母からヒトまで生物界において広く保存されている。ユビキチンはC末端のグリシン残基でATP依存性にE1(ユビキチン活性化酵素)のシステイン残基と結合した後、E1からE2(ユビキチン結合酵素)に転移され、E3(ユビキチンリガーゼ)によって認識される標的タンパク質のリジン側鎖にイソペプチド結合する。標的タンパク質のリジン残基に結合したユビキチンのリジン残基にユビキチンのC末端がイソペプチド結合を繰り返すことにより、ポリユビキチン鎖が形成される。上記したようなユビキチンシステムにより標的タンパク質に付加されたポリユビキチン鎖は26Sプロテアソームによって認識され、ユビキチン化されたタンパク質は26Sプロテアソームにより分解される。
- [0003] 上記の通り、26Sプロテアソームは、細胞内蛋白の最も主要な分解酵素である。この26Sプロテアソームは $\alpha$   $\beta$   $\beta$   $\alpha$ リングからなる酵素触媒部位20Sプロテアソームとその両側に結合する19Scap分子からなる。20Sプロテアソームの各リングは7個のサブユニットからなり、従って20Sプロテアソームは $7 \times 4 = 28$ 個の分子から構成される。一方、19Scap分子は6個のATPaseサブユニットと約12個のnon-ATPaseサブユニットの合計18個の分子から構成されている。従って、26Sプロテアソームは $28 + 18 + 18 = 64$ 個もの分子が集まった巨大複合分子であり、その分子量は約2.5MDaにも及ぶ。26Sプロテアソームの生化学的に精製することは、その構造が巨大複合分子であることから簡単

ではない。

- [0004] 従来の26Sプロテアソーム精製法は、20Sプロテアソームと19S $\alpha$ 分子を別々に精製して最後に両分子を混合して作成する方法であった。あるいは、ゲル濾過とイオン交換クロマトグラフィーを用いて一度に精製を行う方法も知られている(Alexei F. Kissel<sup>ev</sup>,他、The size of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes. J.Biol.Chem. 274, 3363-3371, 1999)。これらの方法は、生化学的には十分認知されたものであるが、相当規模の細胞数( $\sim 10^{10}$ )や組織(ラット肝臓、ウサギ脾臓など)からでないと途中のロスが多いため精製が困難である。また、任意の、例えばヒトなどの少量の末梢血( $\sim 10^6$ )、臓器・組織の一部( $0.1\text{cm}^3$ )などから簡便に精製することが困難であるなどの問題点がある。従って、従来の26Sプロテアソーム精製法を使用する場合は、ごく限られた研究室等で得られた限られた種類のプロテアソームしか入手することができない。

#### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、比較的少量の細胞や組織から26Sプロテアソームを再構成する方法を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、任意の試料(例えば、少量しか入手できない試料など)から26Sプロテアソームを簡便な操作で再構成する方法を提供することを解決すべき課題とした。

#### 課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、任意の少量の細胞・組織ライセート( $\sim 10^6$ 細胞)を出発材料として使用し、分子シャペロン(hsp70,hsp40或はhsp90)の存在下においてこれらの細胞・組織ライセートをインキュベートすることによって、短時間のうちに26Sプロテアソームを再構成できることを意外にも見出した。本発明は、この知見に基づいて完成したものである。
- [0007] 即ち、本発明によれば、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28の存在下において細胞又は組織のライセートをインキュベートすることを含む、26Sプロテアソームをインビトロで再構成する方法が提供される。

[0008] 本発明の別の側面によれば、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28の存在下において細胞又は組織のライセートをインキュベートすることによって得られる、インビトロで再構成された26Sプロテアソームが提供される。

[0009] 好ましくは、細胞又は組織のライセートは、細胞又は組織に緩衝液を加えてホモジナイズした液体を遠心することにより得られる上清である。

好ましくは、ATPの存在下又は非存在下においてインキュベートを行う。

[0010] 好ましくは、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28は組み換え蛋白質である。

好ましくは、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28は、精製のためのタグで標識された組み換え蛋白質である。

好ましくは、本発明の方法は、インキュベーション後に、前記タグを利用して26Sプロテアソームを精製する工程をさらに含む。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0011] 以下、本発明について具体的に説明する。

本発明は、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28の存在下において細胞又は組織のライセートをインキュベートすることを含む、26Sプロテアソームをインビトロで再構成する方法、並びに上記方法により得られるインビトロで再構成された26Sプロテアソームに関する。

[0012] 本発明で用いる細胞又は組織としては、ヒトを含む任意の生物の組織又は器官(腎臓、肝臓、胃、小腸、大腸、心臓、脳、肺、胸腺などの任意の臓器を含む)、任意の微生物、又は任意の細胞(培養細胞を含む)を出発材料として使用することができる。より具体的には、本発明の方法では、上記材料の細胞質画分から26Sプロテアソームを再構成することができる。細胞質分画の調製は、通常の細胞質分画法によることができる。例えば、上記記載の細胞をホモジネートし、遠心分離することにより、細胞膜、核、ミトコンドリア、リソゾームおよびマイクロソームの分画を除き、その上清を細胞質分画として使用することができる。

[0013] 細胞又は組織のライセートの調製方法の一例としては、以下の実施例に記載されている通り、下記(1)～(5)の操作を挙げることができるが、これに準ずる任意の方法でもよい。

(1)細胞ペレット又は肝臓組織などのウェットボリュームを1とした時に、その4～10倍量に相当する26SバッファーA(25mM Tris-HCl(pH7.5), 2mM ATP, 1mM DTT, 0.25 M sucrose, 1%NP40, 0.5mM PMSF)を加え、ホモジェナイザーにてよくホモジェナイズする。

(2)氷上にて30分間静置する。

(3)7,000rpm 10分間遠心

(4)上清を回収、さらに15,000rpm 30分間遠心する。

(5)上清を回収

[0014] 本発明の方法では、上記のようにして得た細胞又は組織のライセートを、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28の存在下においてインキュベートする。このインキュベーションは、ATPの存在下で行ってもよいし、ATPの非存在下で行ってもよいが、より活性の高い26Sプロテアソームを得るためには、ATPの存在下で行う方が好ましい。

[0015] 本発明で用いるhsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28は何れも公知であり、例えば、以下の文献等に記載されている。

Hsp70: Soulier S,他、Developmental regulation of murine integrin  $\beta$  1 subunit- and Hsc73-encoding genes in the mammary gland: sequence of a new mouse Hsc73 cDNA. Gene 172(2), 285-289 (1996), 登録番号NCBI Accession U27129

Hsp40(Homo sapiens DnaJ): Strausberg RL 他、Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99(26), 16899-16903 (2002), 登録番号NCBI Accession BC002352

[0016] Hsp90: Yamazaki M et al. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for 90 kDa heat-shock protein from human peripheral blood lymphocytes. Nucleic Acids Res. 17(17), 7108 (1989), 登録番号NCBI Accession X15183

PA28; Jiang H他、Sequence and expression of mouse proteasome activator PA28 and the related autoantigen Ki. Immunogenetics 46(2), 93-98(1997), 登録番号NCBI Accession NM#011189

[0017] 本発明で用いるhsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28は、天然由来の蛋白質、組換え蛋白質、又は化学合成した蛋白質の何れでもよいが、調製の便宜の観点からは

組換え蛋白質が好ましい。また、本発明の方法で再構成した26Sプロテアソームの単離・精製を容易にするという観点から、本発明で使用するhsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28は、精製のためのタグで標識されていることが好ましい。精製のためのタグとしては、ヒスチジンタグ[例えば、6 x Hisタグ]、又はFlagタグなどが挙げられる。ヒスチジンタグで標識された蛋白質はNiカラムにより精製することができ、Flagタグで標識された蛋白質は抗Flag抗体で精製することができる。本発明の方法では、26Sプロテアソームの再構成の際に用いるhsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28は何れも再構成された26Sプロテアソーム中に含有されることになるため、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28に精製のためのタグを標識しておくことによって、再構成された26Sプロテアソームを精製することが容易になる。再構成された26Sプロテアソームの精製が容易であることは、本発明の利点の一つである。

- [0018] hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28の使用量は、26Sプロテアソームが再構成できる限り特に限定されないが、例えば、出発材料として $10^7$ 個の細胞ペレットを使用するような場合は、5  $\mu$ g程度使用すれば十分である。
- [0019] 26Sプロテアソームの再構成のためのインキュベーションは、適当な温度(例えば、4℃から室温、好ましくは4℃)にて数分から10時間、好ましくは1時間から5時間程度行えばよい。インキュベーションの際、混合物を震盪混和することが好ましい。
- [0020] 本発明の方法で再構成される26Sプロテアソームの酵素活性は、適当な蛍光基質(例えば、Suc-LLVY-AMC (N-スクシニル-Leu-Leu-Val-Tyr-7-アミノ-4-メチルクマリン)など)を用いて行うことができる。このSuc-LLVY-AMCは、プロテアソームにより切断されると蛍光を発するようになるので、その蛍光の強度を測定することにより、プロテアソームの酵素活性を評価することができる。
- [0021] 本発明の方法で再構成される26Sプロテアソームは、プロテアーゼとしての20Sプロテアソームとその他の制御因子とから構成されるものであり、ユビキチン化した蛋白質を認識して分解することができる。本発明の方法で再構成される26Sプロテアソームは、当該酵素の機能の解明やユビキチン化した蛋白質の分解機構の解明のために用いることができる。また、各種の疾患の診断や治療のためにも使用することができる。ある種の癌遺伝子は、ユビキチン依存性の分解経路で分解されることが報告されて

いる。従って、本発明の方法で再構成される26Sプロテアソームは、癌化のメカニズムの解明や癌の治療および診断などにも有用である。また、アルツハイマー病患者の脳内にはユビキチン化した蛋白質が異常蓄積していることから、アルツハイマー病の原因の一つとして、細胞内における蛋白質分解系の異常が示唆されている。従って、本発明の方法で再構成される26Sプロテアソームは、アルツハイマー病のメカニズムの解明やアルツハイマー病の治療および診断にも有用である。

[0022] さらにまた、上記した通りプロテアソームは各種疾患に関与していることから、プロテアソーム阻害剤はそのような疾患の治療薬となり得る可能性がある。本発明の方法で再構成される26Sプロテアソームは、プロテアソーム阻害剤のスクリーニング系において使用することもできる。

[0023] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

#### 実施例

[0024] 実施例1:hsp70,hsp70/hsp40, hsp90, PA28による26Sプロテアアソームの再構成法  
マウス正常肝臓組織10  $\mu$  lから精製を開始し、hsp70, hsp70/hsp40, hsp90, PA28により、ATP存在下又は非存在下でのバッファー条件で26Sプロテアソームをin vitroで再構成した。組み合わせから以下の合計8種類のプロテアソームを再構成した。

Hsp70-26S     ATP(-)

Hsp70-26S     ATP(+)

Hsp70/hsp40-26S     ATP(-)

Hsp70/hsp40-26S     ATP(+)

Hsp90-26S     ATP(-)

Hsp90-26S     ATP(+)

PA28-26S     ATP(-)

PA28-26S     ATP(+)

[0025] (方法)

(1)細胞ペレット又は肝臓組織などのウェットボリュームを1とした時に、その4~10倍量に相当する26SバッファーA(25mM Tris-HCl(pH7.5), 2mM ATP, 1mM DTT, 0.25

M sucrose, 1%NP40, 0.5mM PMSF)を加え、ホモジェナイザーにてよくホモジェナイズする。

(2)氷上にて30分間静置する。

(3)7,000rpm 10分間遠心

(4)上清を回収、さらに15,000rpm 30分間遠心する。

(5)上清を回収

(6)リコンビナントhsp70 (5  $\mu$ g), hsp40 (5  $\mu$ g)を加え、4℃にて3時間震盪混和する。リコンビナント蛋白はそのN末に6 x His.タグがついたものを使用した。リコンビナント蛋白の加えるべき量は、細胞数 $10^7$ 個のペレットであれば各5  $\mu$ g(hsp70, hsp40, hsp90, PA28)で十分である。

(7) (6)にNi<sup>2+</sup>-agarose (Qiagen社) ~20  $\mu$ l(ゲルボリューム)を加え、さらに1時間4℃にて震盪混和する。

(8)2,500rpm 1分間遠心。

(9)上清を捨てる。

(10) 26SバッファーB (25mM Tris-HCl(pH7.5), 2mM ATP, 1mM DTT, 0.25M sucrose, 1%NP40, 0.5mM PMSF, 25mM Imidazole)を十分量加えsuspensionした後に転倒混和10回ほど行い、再度2,500rpm 1分間遠心。この際、ボルテックスはしない。

(11) 上清を捨てる。(9)を4回繰り返す。

(12) 26SバッファーC (25mM Tris-HCl(pH7.5), 2mM ATP, 1mM DTT, 0.25M sucrose)を用いて上記(8)と(9)の操作を2回繰り返す。

(13) 26SバッファーD (25mM Tris-HCl(pH7.5), 2mM ATP, 1mM DTT, 0.25M sucrose, 0.2M Imidazole) 100  $\mu$ lでプロテアソームを溶出する。

(14) 2,500rpm 1分間遠心後、上清を回収する。この時点で、crudeの26Sプロテアソームが回収されたことになる。

(15) (14)で得られた分画の酵素活性はプロテアソームの蛍光基質(Suc-LLVY-A MC)を用いて行う。アッセイは96wellプレートを用いて以下のように行った。

[0026] (ATP非存在下でのアッセイの場合)

0.5M Tris-HCl (pH8.0) 20  $\mu$ l

Suv-LLVY-amc            1  $\mu$  l  
 Reconstituted sample   20  $\mu$  l  
DDW                      59  $\mu$  l  
                               100  $\mu$  l

[0027] (ATP存在下でのアッセイの場合)

0.5M Tris-HCl (pH8.0) 20  $\mu$  l  
 Suc-LLVY-amc            1  $\mu$  l  
 Reconstituted sample   20  $\mu$  l  
 DDW                      55  $\mu$  l  
ATP (50 mM)            4  $\mu$  l  
                               100  $\mu$  l

[0028] reconstituted 26S proteasome sample は約1  $\mu$  gの組織重量から再構成したプロテアソームである。

[0029] 図1に8種類の得られたcrude 26Sの酵素活性についての結果を示す。図1の結果から明らかなように、ATPが存在しなくともhsp70/hsp40, hsp90, PA28によりある程度活性のある26Sプロテアソームが回収される。一方、hsp70単独で再構成を行った場合の活性は低かった。即ち、hsp40の存在はATP要求性を減少させる。また、いずれの場合もATP 0.2mM存在下では最高度に活性のある26Sプロテアソームが再構成される。

[0030] 実施例2: 26SプロテアソームによるMHCクラスI抗原ペプチドの前駆ペプチドの切断  
 実施例1で再構成された26Sプロテアソームにより、MHCクラスI抗原ペプチドの前駆ペプチド(C末フランキングを付加したもの)を切断し、実際にMHCクラスI抗原ペプチドが切り出されるかについて実験を行った。用いたモデルペプチドはOVA<sub>257-269</sub> (SI INFEKL TEWTS), マラリア抗原CSP<sub>280-294</sub> (SYVPSAEQILEFVKQ), メラノーマ抗原TRP2<sub>180-193</sub> (SVYDFFVWL HYYSV)の3種類である。OVA<sub>257-264</sub>, TRP2<sub>180-188</sub> はK<sup>b</sup>に提示されるペプチドであり、CSP<sub>280-288</sub> はK<sup>d</sup>に提示される。これらの合成ペプチド各10  $\mu$  gを図1のようにして得られたプロテアソームで0,1,3,12時間切断し(最終ボリューム100  $\mu$  l)、低分子量のものをセントリコン10で回収した。反応液の組成は、実施例1における

Suc-LLVY-amcのATP存在下での加水分解活性の測定の場合と同様に行った。

[0031] OVA<sub>257-264</sub>, TRP2<sub>180-188</sub> を含んでいると思われるものはマウスEL4(H-2<sup>b</sup>)に、またCSP<sub>76-284</sub><sup>2</sup> を含んでいると思われるものはp815(H-2<sup>d</sup>)にパルスし、それぞれのペプチドに特異的な細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte;CTL)による標的細胞の傷害活性をクロム51遊離試験にて観察した。傷害活性が高く出れば、即ちMHCクラスI抗原ペプチドが多く切り出されたということになる。その結果を図2に示す。

[0032] OVA<sub>257-269</sub> はhsp90-based, PA28-basedのプロテアソーム両方でMHCクラスIIリガンドが切断されるのに対し、CSP<sub>280-294</sub><sup>18</sup> はhsp90-basedプロテアソームのみで、さらにTRP2<sub>0-193</sub><sup>18</sup> はPA28-basedのプロテアソームのみでリガンドが切り出されてくるという事実が判明した。即ち、プロテアソームの種類により産生される抗原ペプチドの種類が異なるものと解釈される。

[0033] 実施例3:in vitro 再構成してきた26Sプロテアソームの分画

in vitroで再構成した26Sプロテアソームをゲル濾過カラム(アマシャムSuperose 6)を用いて分子量に応じてさらに分画した。再構成したプロテアソームを100  $\mu$  lに濃縮し、それをAKTAFPLCシステムへインジェクションした。流速0.5ml/分で流し、1 ml/フラクションで分画した。移動相は、26SバッファーCを用いた。各フラクションのSuc-LLVY-amcの分解活性を実施例1に示した方法に従って測定した。各フラクションNO.を横軸に、その酵素活性を縦軸にプロットした。既知の精製法で得られた26Sをコントロールにしてhsp90, hsp70/hsp40で再構成したプロテアソームの大きさを検証してみた。図3にその結果を示す。実施例1で再構成されたプロテアソームの大きさは明らかに26Sプロテアソームとほぼ同じ大きさであることがわかる。ちなみに精製20Sプロテアソームは、その酵素活性がフラクション12に認められる。

[0034] 続いてフラクション7～12にどのような蛋白分子が含まれているかを調べるためにウエスタンブロットを用いて検討した。図4に示すように、酵素活性フラクション(No11～12)に一致して20Sが観察される。19Sはもちろん活性部位にも認められるが、それ以外のフラクションにも比較的幅広く見られる。大切な事は、既存の方法でマイルドにとってきた26Sプロテアソームの活性フラクションにやはりhsp90, hsp70, hsp40が認められることである。また、hsp70/hsp40で再構成したプロテアソームは既知の26Sプロテア

ソームの分子構成パターンによく似ていることがわかった。内在性のHsp90が含まれているのは以外である。Hsp90で再構成したプロテアソームの場合、活性フラクション部位にはもちろんhsp90が含まれるが、内在性hsp70/hsp40の含有量は低い。

[0035] 実施例4: 26SプロテアソームのSuc-LLVY-AMC分解活性におけるゲルダナマイシンによる抑制効果

3種類の26Sプロテアソーム(即ち、既知の方法でとった26Sプロテアソーム、hsp90で再構成した26Sプロテアソーム、及びhsp70/hsp40で再構成された26Sプロテアソーム)のSuc-LLVY-AMC分解活性におけるゲルダナマイシン(hsp90特異的阻害剤0~50  $\mu$  M)による抑制効果を検討した。その結果を図5に示す。

[0036] その結果、hsp90で再構成したプロテアソームの酵素活性はゲルダナマイシンで濃度依存的に抑制されることが明らかになった。一方、既知の26S或はhsp70/hsp40で再構成されたプロテアソームの場合はゲルダナマイシンで部分的に抑制される。ネガティブコントロールとして用いた精製20SプロテアソームのSDSによる人工的な活性はゲルダナマイシンで全く抑制されなかった。以上の結果より、従来26Sと考えられてきたものはhsp90依存性、hsp70/hsp40依存性のプロテアソームに重分類される可能性が考えられる。あるいは、hsp90依存性のものはhsp70/hsp40依存性のプロテアソームが完成する前の前段階(あるいはその逆)のものである可能性も排除できない。

[0037] 実施例5: Hsp90及びPA28  $\alpha$  によるプロテアソームのアッセンブリ促進

PA28  $\alpha^{-/-} \beta^{-/-}$  細胞のライセートにリコンビナントPA28  $\alpha$  又はhsp90を加え、30分間室温にてインキュベーションし、これを3~20%のNative-PAGEにかけ、泳動後ゲルをsuc-LLVY-amcを含む溶液に浸す。37°C、10分間インキュベーションし、360nmのUV照射により、460nmのフィルターにより加水分解活性を視覚化した(図6)。

[0038] PA28  $\alpha$  の添加により、フットボール型プロテアソームの出現と、ハブリッド型プロテアソームの形成が促進される。一方、hsp90によりシングルキャップ型26Sプロテアソームの形成が促進されるが、ゲルダナマイシン5  $\mu$  M又はEDTA 0.1mMの存在下では消失する。

[0039] 即ち、Hsp90によるプロテアソームのアッセンブリ促進は、ATP除去により、あるいはMg<sup>2+</sup>のキレート化による消失する一方、PA28  $\alpha$  によるそれは影響を受けないことが分

かった。

[0040] 実施例6:hsp90によるシングルキャップ型26Sプロテアソームのアッセンブリ促進

ヒスチジンタグの付いたリコンビナントhsp90をPA28  $\alpha^{-/-}$   $\beta^{-/-}$ 細胞のライセートに添加し、30分間室温にてインキュベーションし、これを3-15%のNative-PAGEにかける。その後、ニトロセルロース膜に転写後、抗ヒスチジンタグ抗体、抗20S  $\alpha$  2抗体、19S Rpt6抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、hsp90はシングルキャップ型26Sプロテアソームの位置に泳動し、この泳動パターンは、EDTA存在下では変化がないが、ゲルダナマイシン存在下では完全に消失した(図7)。また、hsp90により20S、19S Rpt6の量が有意に増加している。これは一番左の図の加水分解活性の増加と完全に一定する。即ち、hsp90はHsp90はシングルキャップ型26Sプロテアソームに結合して、シングルキャップ型26Sプロテアソームのアッセンブリを促進することが分かった。

[0041] 実施例7:PA28  $\alpha$  及びhsp90によるプロテアソームの再構成

PA28  $\alpha$  をATP非存在下若しくは存在下で、また、hsp90をATP存在下でマウスEL4細胞あるいはPA28  $\alpha^{-/-}$   $\beta^{-/-}$ 細胞のライセートに添加し、30分インキュベーション後にpull downを行った。SDS-PAGEに続くウエスタンブロット法にて、結合している分子の同定を行い、また、Native-PAGE後に20Sプロテアソーム及び19Scap Rpt1に対する抗体でウエスタンブロットを行い、形成されたプロテアソームの種類を特定した。その結果、ATP非存在下では、PA28  $\alpha$  はフットボール型プロテアソームを沈降し、ATP存在下ではハイブリッドプロテアソームを沈降してきたが、注目すべきはこの中に内在性hsp90が一緒に入ってくることである(図8)。一方、hsp90はATP存在下において、ハイブリッドプロテアソームを沈降するがこのときもちろん内在性PA28も一緒に沈降される(図8)。また、PA28  $\alpha^{-/-}$   $\beta^{-/-}$ 細胞のライセートからはhsp90によりシングルキャップ型26Sプロテアソームが沈降される(図8)。従って、hsp90のシングルキャップ型26Sプロテアソームへの結合にはPA28は全く関係ない。

[0042] 以上の結果から以下のことが分かった。PA28  $\alpha$  はATP非存在下ではフットボール型プロテアソームを、又ATP存在下ではハイブリッド型プロテアソームを再構成する。一方、hsp90はATP存在下でハイブリッド型プロテアソームを再構成する。もちろんPA28  $\alpha^{-/-}$   $\beta^{-/-}$ 細胞のライセートからはシングルキャップ型26Sプロテアソームを再構成す

る。

[0043] 実施例8:

図8で沈降されてきたプロテアソーム複合体のsuc-LLVY-amc(キモトリプシン様活性), Boc-LRR-amc(トリプシン様活性)に対する加水分解活性がゲルダナマイシン存在下でどのような影響を受けるのかを検討した。ATP(-)又は(+)の条件下で、EL4 又はPA28  $\alpha^{-/-}$   $\beta^{-/-}$ 細胞抽出液から、リコンビナントPA28  $\alpha$ , hsp90を用いて図9に示すようなプロテアソーム複合体を精製した。各プロテアソーム複合体を、ゲルダナマイシン(GA)25mMで30分処理したものとし、しないものを作製した。その酵素活性をSuc-LLVY-amc、Boc-LRR-amcを用いてそれぞれキモトリプシン様活性、トリプシン様活性を測定した。

[0044] その結果、ATP存在下で沈降してきたプロテアソーム(即ちhsp90を含む)のキモトリプシン様活性のみが有意に低下することが明らかになった(図9)。即ち、hsp90はハイブリッドプロテアソーム、シングルキャップ型26Sプロテアソームのキモトリプシン様活性に重要な役割を担うことが明らかになった。即ち、Hsp90を含むプロテアソームはハイブリッドプロテアソームか、シングルキャップ型26Sプロテアソームであるが、これらのキモトリプシン様活性のみがhsp90の特異的阻害剤ゲルダナマイシンで抑制されることが分かった。

[0045] 以上PA28  $\alpha$ 、hsp90によるプロテアソームの再構成過程をまとめたものを図10に示す。任意の細胞ライセートにPA28  $\alpha$  又はhsp90を加えることによりフットボール型、シングルキャップ26S、及びハイブリッドプロテアソームの再構成が可能になる。

### 産業上の利用可能性

[0046] 本発明は、任意の、極めて少量の細胞・組織の一部ライセートからリコンビナント蛋白としての分子シャペロン(hsp70,hsp40或はhsp90)を用いて26Sプロテアソームをin vitro再構成できることを可能にする。これにより、従来法よりもより簡便に細胞・組織からプロテアソームを取り出すことが可能になる。このことは個々の細胞・組織に特徴的に発現する異なる種類のプロテアソームを任意に取り出すことを可能にするものである。

### 図面の簡単な説明

[0047] [図1]図1は、hsp70,hsp70/hsp40, hsp90, 又はPA28の存在下で再構成した26Sプロテアソームの酵素活性を測定した結果を示す。

[図2]図2は、26SプロテアソームによるMHCクラスI抗原ペプチドの前駆ペプチドの切断を調べた結果を示す。 白のバー;PA28  $\alpha$ -assembled プロテアソーム 黒のバー; PA28  $\alpha$   $\Delta$  C5-assembled プロテアソーム(PA28  $\alpha$  のドミナントネガティブ) 灰色のバー;hsp90-assembledプロテアソーム 斜線のバー;合成ペプチド(あり又はなし)でパルスした標的細胞

[図3]図3は、in vitroで再構成した26Sプロテアソームをゲル濾過カラム(アマシャム Superose 6)を用いて分子量に応じて分画した結果を示す。

[図4]図4は、26Sプロテアソームをゲル濾過カラムで分画した各フラクション中の蛋白分子を調べるためのウエスタンブロットの結果を示す。

[図5]図5は、26SプロテアソームのSuc-LLVY-AMC分解活性におけるゲルダナマイシンによる抑制効果を調べた結果を示す。

[図6]図6は、Hsp90及びPA28  $\alpha$  によるプロテアソームのアッセンブリ促進を調べた結果を示す。

[図7]図7は、hsp90によるシングルキャップ型26Sプロテアソームのアッセンブリ促進を調べた結果を示す。

[図8]図8は、PA28  $\alpha$  及びhsp90によるプロテアソームの再構成を調べた結果を示す。

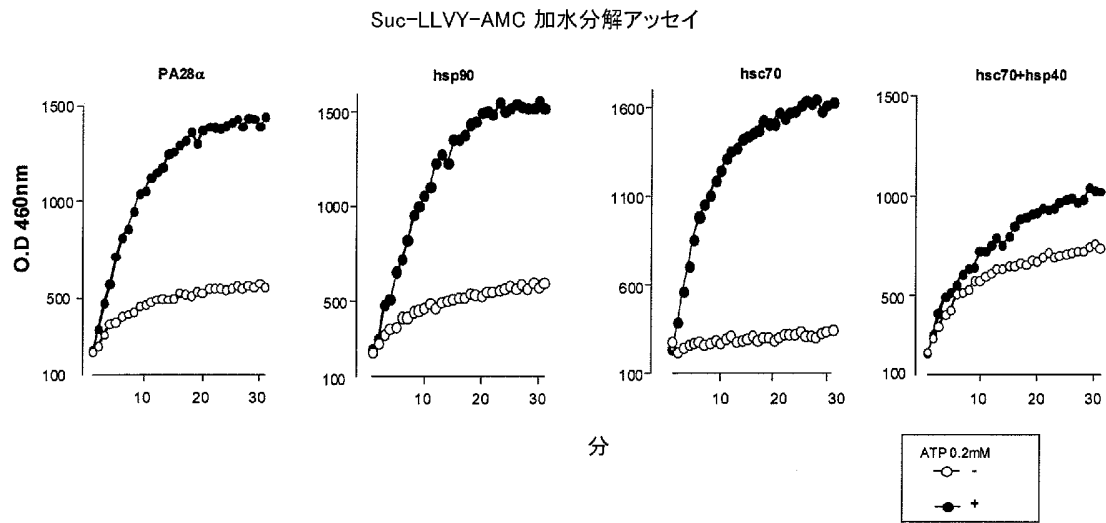
[図9]図9は、プロテアソーム複合体のsuc-LLVY-amc(キモトリプシン様活性)、Boc-LRR-amc(トリプシン様活性)に対する加水分解活性がゲルダナマイシン存在下でどのような影響を受けるのかを検討した結果を示す。

[図10]図10は、PA28  $\alpha$  及びhsp90によるプロテアソームの再構成過程を示す。

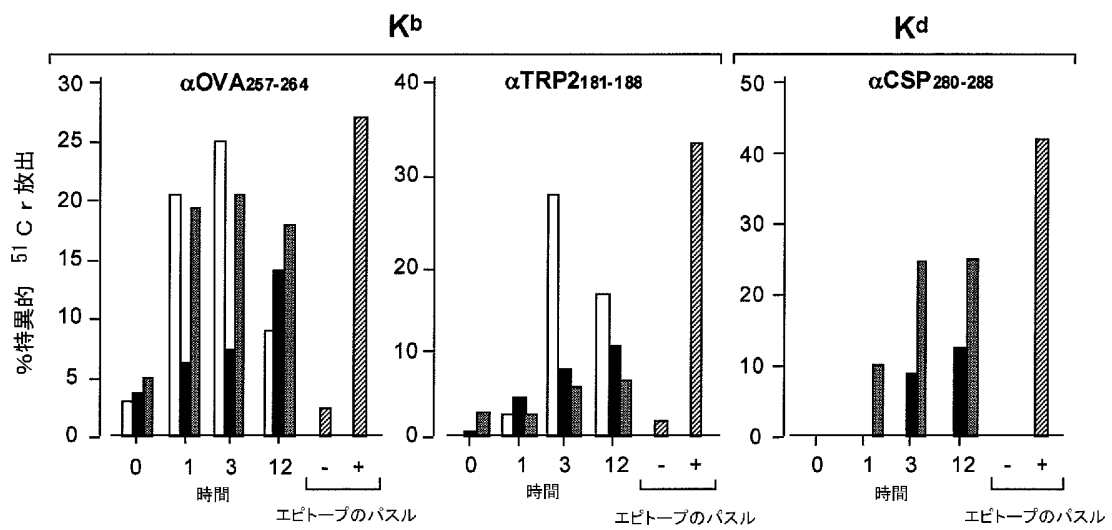
## 請求の範囲

- [1] hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28の存在下において細胞又は組織のライセートをインキュベートすることを含む、26Sプロテアソームをインビトロで再構成する方法。
- [2] 細胞又は組織のライセートが、細胞又は組織に緩衝液を加えてホモジナイズした液体を遠心することにより得られる上清である、請求項1に記載の方法。
- [3] ATPの存在下又は非存在下においてインキュベートを行う、請求項1又は2に記載の方法。
- [4] hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28が組み換え蛋白質である、請求項1から3の何れかに記載の方法。
- [5] hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28が、精製のためのタグで標識された組み換え蛋白質である、請求項1から4の何れかに記載の方法。
- [6] インキュベーション後に、前記タグを利用して26Sプロテアソームを精製する工程をさらに含む、請求項5に記載の方法。
- [7] hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28の存在下において細胞又は組織のライセートをインキュベートすることによって得られる、インビトロで再構成された26Sプロテアソーム。
- [8] 細胞又は組織のライセートが、細胞又は組織に緩衝液を加えてホモジナイズした液体を遠心することにより得られる上清である、請求項7に記載の26Sプロテアソーム。
- [9] ATPの存在下又は非存在下においてインキュベートを行う、請求項7又は8に記載の26Sプロテアソーム。
- [10] hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28が組み換え蛋白質である、請求項7から9の何れかに記載の26Sプロテアソーム。
- [11] hsp70, hsp70/hsp40, hsp90又はPA28が、精製のためのタグで標識された組み換え蛋白質である、請求項7から10の何れかに記載の26Sプロテアソーム。
- [12] インキュベーション後に、前記タグを利用して26Sプロテアソームを精製する、請求項11に記載の26Sプロテアソーム。

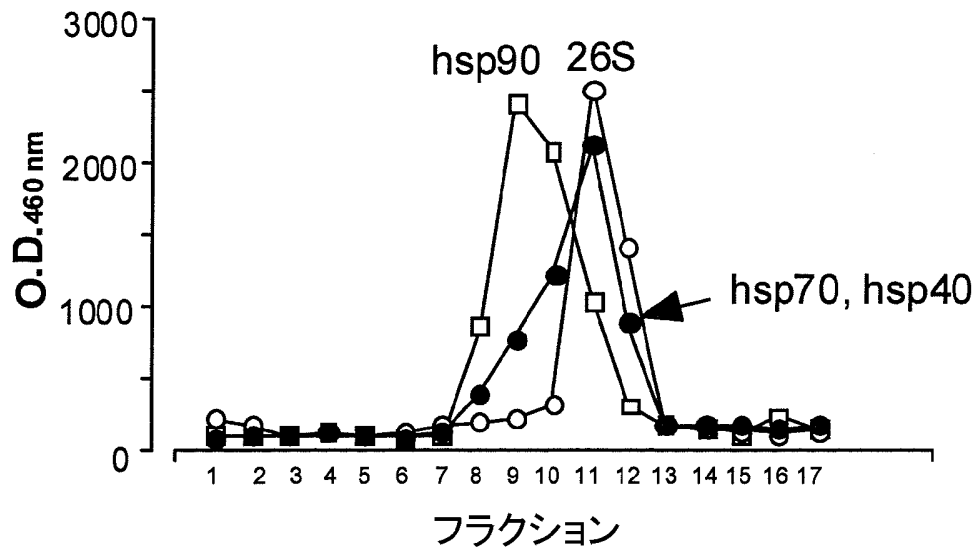
[図1]



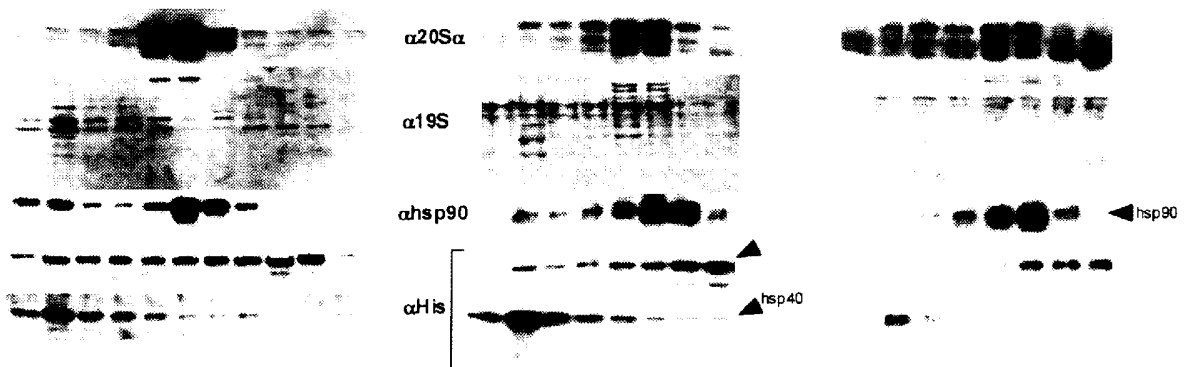
[図2]



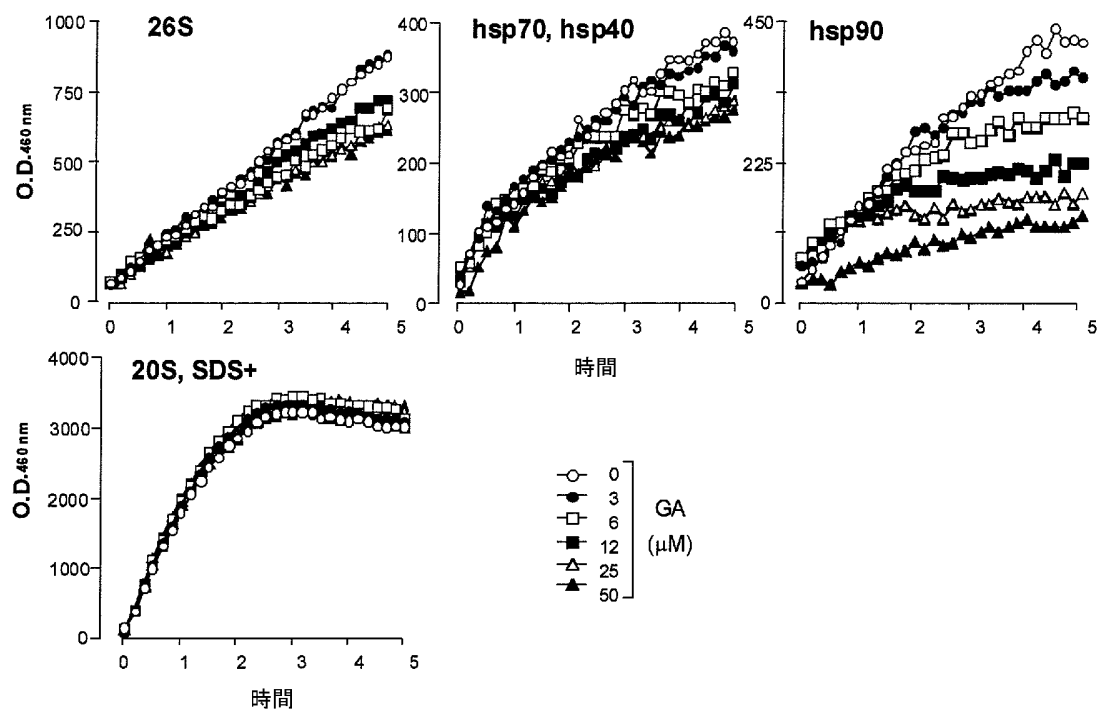
[図3]



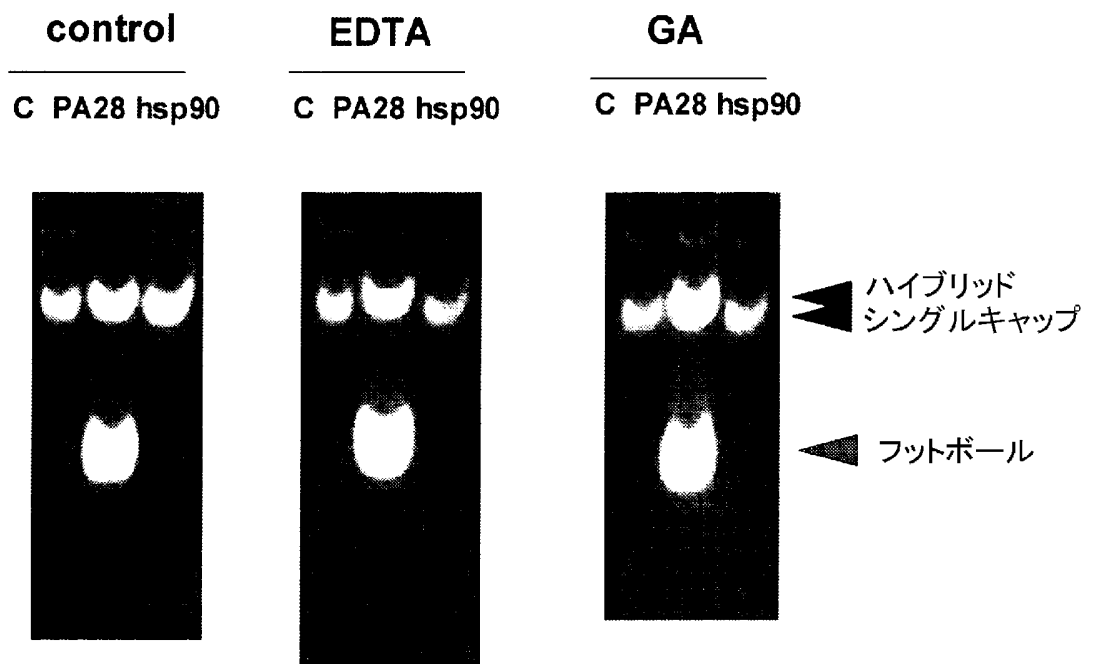
[図4]



[図5]



[図6]



[図7]

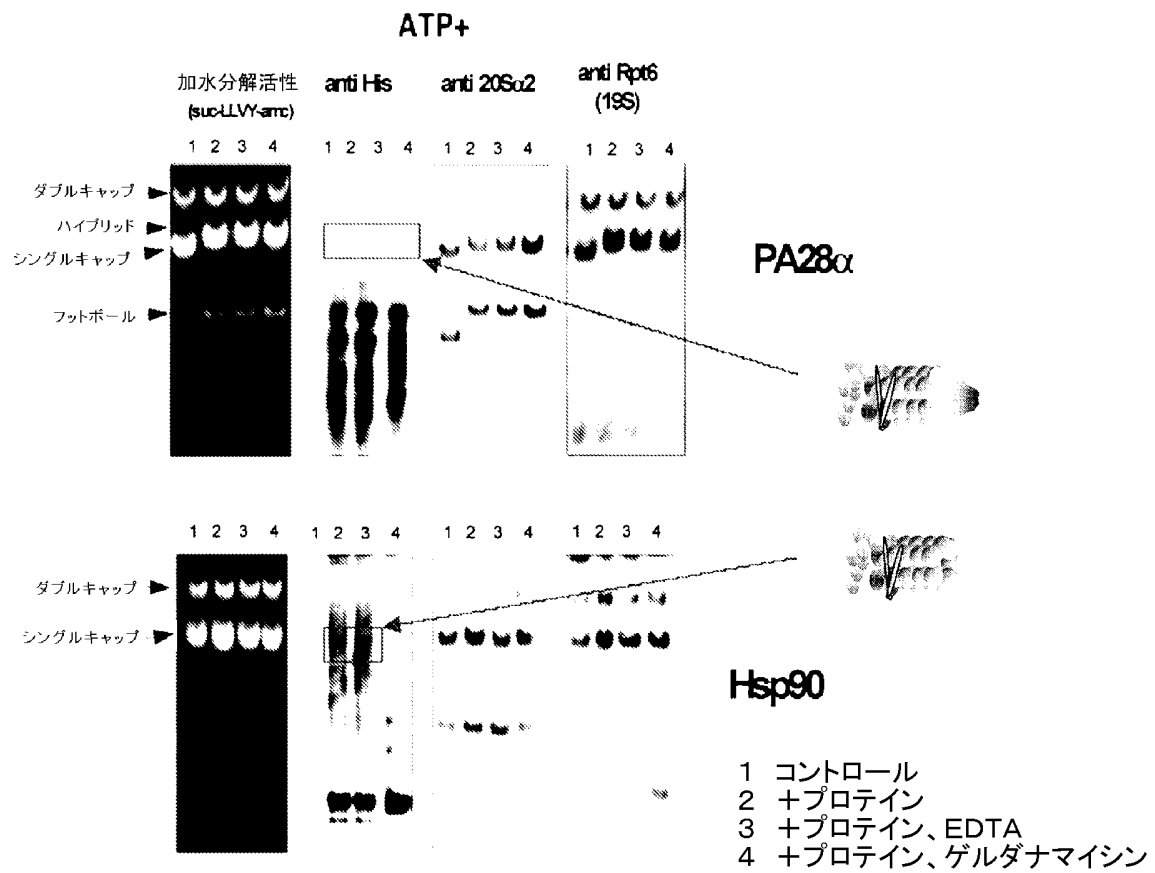
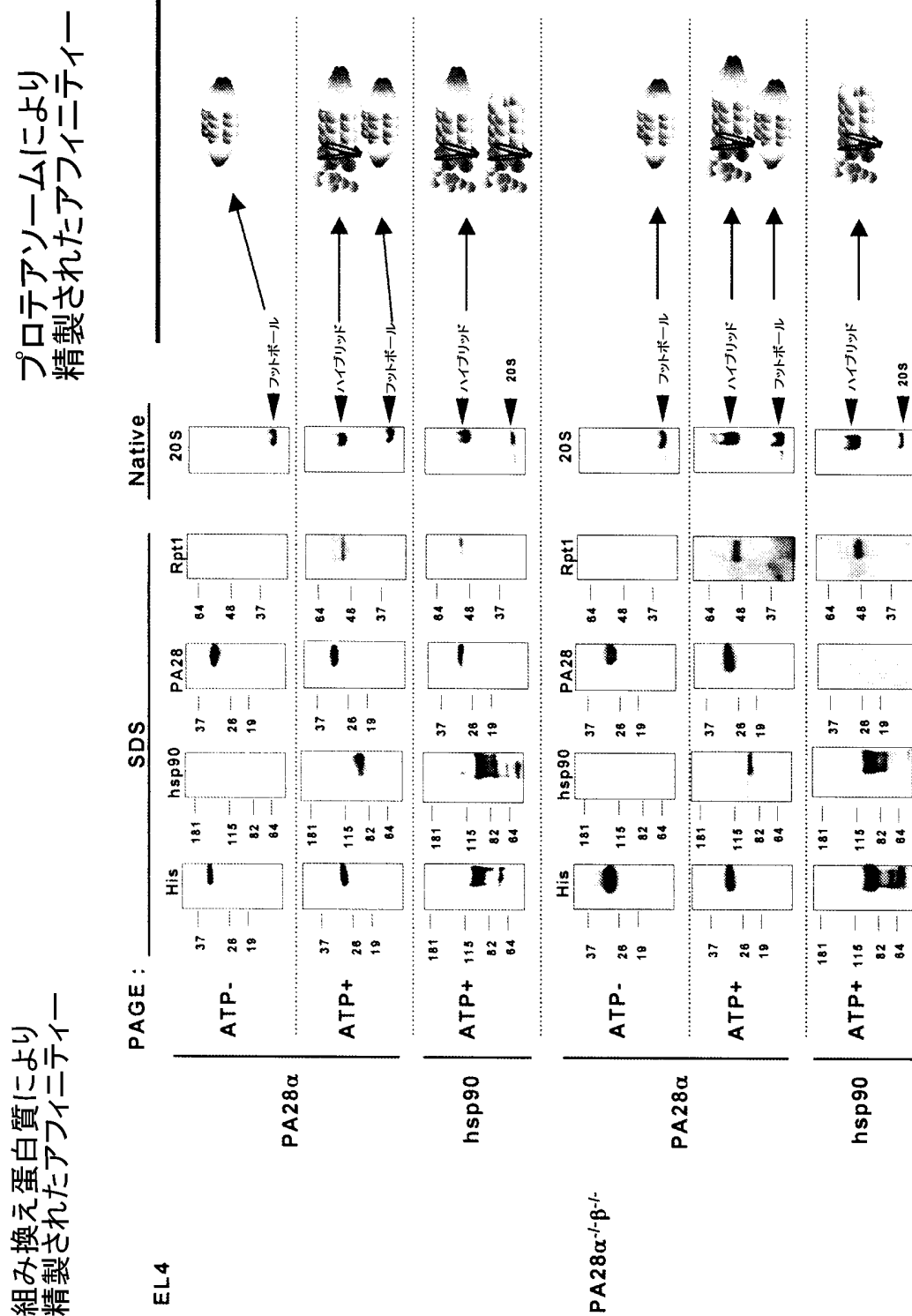
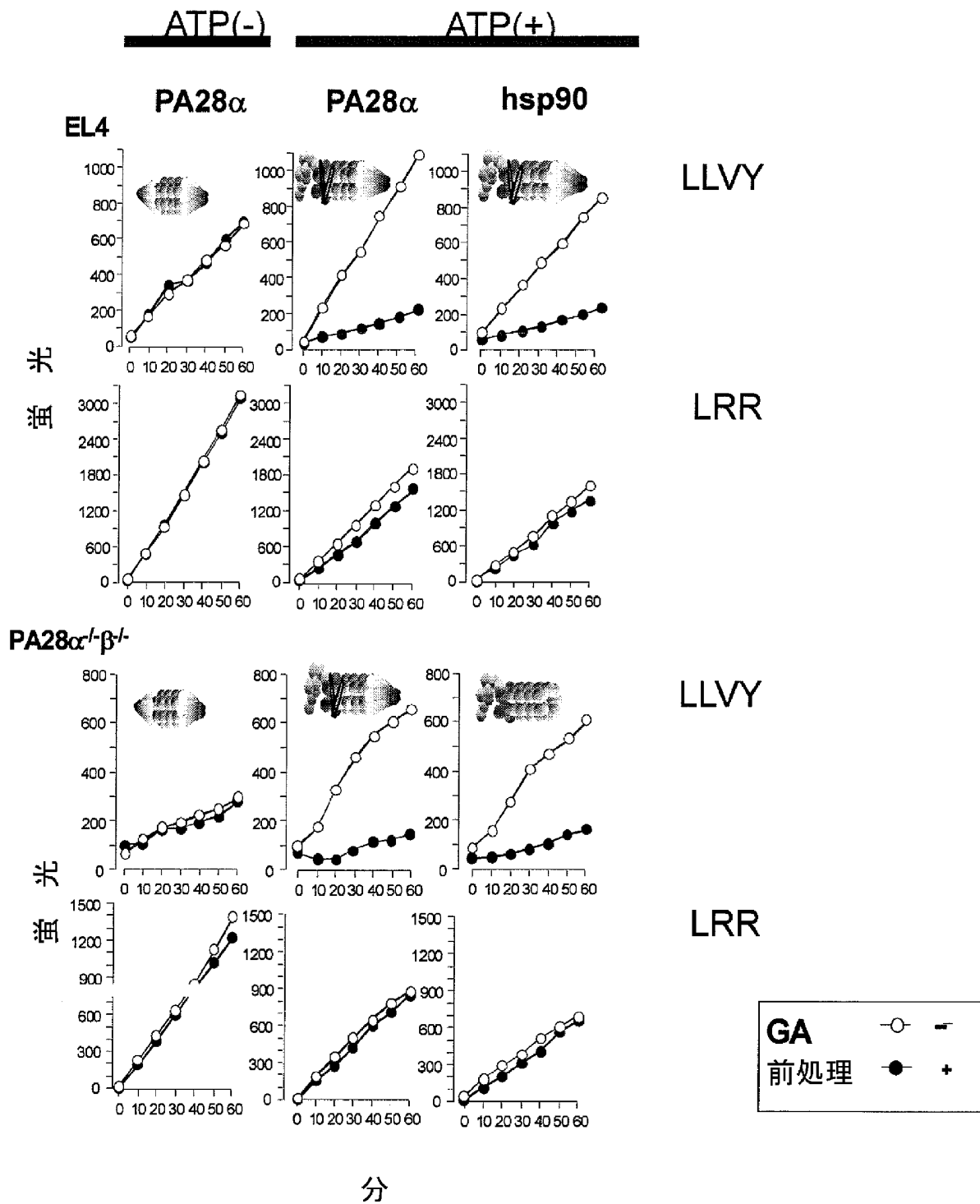


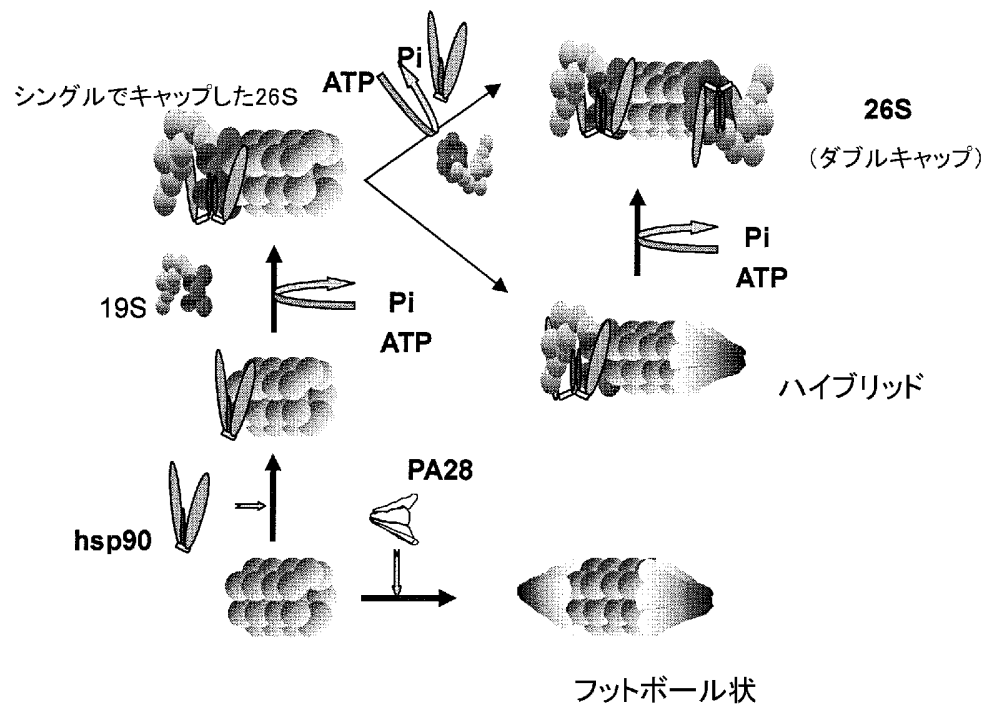
図8



[図9]



[図10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/021842

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N9/48** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12N9/48** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN), PubMed, JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | VERMA R. et al., Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes., Mol.Biol.Cell., 2000 October, Vol.11, No.10, pages 3425 to 3439 | 1-12                  |
| X         | TANAHASHI N. et al., Hybrid Proteasomes, J.Biol.Chem., 2000 May, Vol.275, No.19, pages 14336 to 14345                                                                                                                                             | 7-9                   |
| A         | BARBARA J. et al., Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1985 September, Vol.82, No.18, pages 6070 to 6074                                                                              | 1-12                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

Date of the actual completion of the international search  
02 March, 2006 (02.03.06)Date of mailing of the international search report  
20 March, 2006 (20.03.06)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/021842

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | KOPP F. et al., Reconstitution of Hybrid Proteasomes from Purified PA700-20S Complexes and PA28 $\alpha$ $\beta$ Activator: Ultrastructure and Peptidase Activities, J.Mol.Biol., 2001 October, Vol.313, No.3, pages 465 to 471                            | 1-12                  |
| A         | CASCIO P. et al., Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes., EMBO J., 2002 June, Vol.21, No.11, pages 2636 to 2645                                                                                       | 1-12                  |
| A         | KISSELEV A.F. et al., The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation., J.Biol.Chem., 1999 February, Vol.274, No.6, pages 3363 to 3371 | 1-12                  |
| A         | STRAUSBERG R.L. et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 2002 December, Vol.99, No.26, pages 16899 to 16903                                                       | 1-12                  |
| A         | SOULIER S. et al., Developmental regulation of murine integrin beta 1 subunit- and Hsc73-encoding genes in mammary gland: sequence of a new mouse Hsc73 cDNA., Gene, 1996 June, Vol.172, No.2, pages 285 to 289                                            | 1-12                  |
| A         | YAMAZAKI M. et al., Nucleotide sequence of a full-length cDNA for 90 kDa heat-shock protein from human peripheral blood lymphocytes., Nucleic Acid Res., 1989 September, Vol.17, No.17, page 7108                                                          | 1-12                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/021842

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Parts of claims 1 to 12 (hsp70 alone).

**Remark on Protest**

the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/021842

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)**Claim 1**

It is recognized that the invention according to claim 1 relates to methods of reconstituting 26S proteasome *in vitro* the common technical feature of which resides in incubating a cell or tissue lysate in the presence of a specific protein. However, it is reported in the following document that 26S proteasome was reconstituted by incubating a HeLa cell extract in the presence of ATP and it is indicated that the extract contained PA28 (Fig. 1). Such being the case, the common technical feature as described above does not make a contribution over prior art and, therefore, it appears that the inventions according to the above claim of the present case have technical features in individual proteins suitable for the method of the reconstitution of 26S proteasome. Since it appears that there is not one or more of the same or corresponding special technical features among the four proteins (i.e., hsp70, hsp70/hsp40, hsp90 and PA28) as described in claim 1, the inventions according to the above claim of the present case do not comply with the requirement of unity of invention.

**Claim 7**

It is recognized that the invention according to claim 7 relates to 26S proteasomes the common technical feature of which resides in having been reconstituted *in vitro* by incubating a cell or tissue lysate in the presence of a specific protein. However, 26S proteasome that was reconstituted by incubating a HeLa cell extract in the presence of ATP is reported in the following document and it is indicated that the extract contained PA28 (Fig. 1). Such being the case, the common technical feature as described above does not make a contribution over prior art and, therefore, it appears that the inventions according to the above claim of the present case have technical features in individual proteins suitable for the method of the reconstitution of 26S proteasome. Since it appears that there is not one or more of the same or corresponding special technical features among the four proteins (i.e., hsp70, hsp70/hsp40, hsp90 and PA28) as described in claim 7, the inventions according to the above claim of the present case do not comply with the requirement of unity of invention.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N9/48 (2006.01)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N9/48 (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus (STN),  
PubMed, JSTPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| X               | VERMA R., et al., Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes., Mol. Biol. Cell., 2000 October, Vol. 11, No. 10, p. 3425-3439 | 1-12             |
| X               | TANAHASHI N., et al., Hybrid Proteasomes, J. Biol. Chem., 2000 May, Vol. 275, No. 19, p. 14336-14345                                                                                                                                             | 7-9              |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.03.2006

国際調査報告の発送日

20.03.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3434

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                         |                  |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                       | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | BARBARA J., et al., Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1985 September, Vol. 82, No. 18, p. 6070-6074                                                                                       | 1-12             |
| A                     | KOPP F., et al., Reconstitution of Hybrid Proteasomes from Purified PA700-20S Complexes and PA28 $\alpha$ $\beta$ Activator:Ultrastructure and Peptidase Activities, J.Mol.Biol., 2001 October, Vol. 313, No. 3, p. 465-471                             | 1-12             |
| A                     | CASCIO P., et al., Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes., EMBO J., 2002 June, Vol. 21, No. 11, p.2636-2645                                                                                        | 1-12             |
| A                     | KISSELEV A.F., et al., The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation., J.Biol.Chem., 1999 February, Vol. 274, No. 6, p. 3363-3371 | 1-12             |
| A                     | STRAUSBERG R.L., et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2002 December, Vol. 99, No. 26, p. 16899-16903                                                        | 1-12             |
| A                     | SOULIER S., et al., Developmental regulation of murine integrin beta 1 subunit- and Hsc73-encoding genes in mammary gland: sequence of a new mouse Hsc73 cDNA., Gene, 1996 June, Vol. 172, No. 2, p. 285-289                                            | 1-12             |
| A                     | YAMAZAKI M., et al., Nucleotide sequence of a full-length cDNA for 90 kDa heat-shock protein from human peripheral blood lymphocytes., Nucleic Acid Res., 1989 September, Vol. 17, No. 17, p. 7108                                                      | 1-12             |

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-12の一部 (h s p 70のみ)

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

## 請求の範囲 1

請求の範囲1に係る発明は、特定のタンパク質の存在下において、細胞又は組織のライセートをインキュベートすることを共通の技術的特徴とする26Sプロテアソームをインビトロで再構成する方法であると認める。しかしながら、下記文献には、HeLa細胞の抽出液をATP存在条件下でインキュベートすることにより、26Sプロテアソームが再構成されたことが記載されており、その際、抽出液中にPA28が含まれていることが示されている(第1図)。そうしてみると、上記の共通する技術的特徴は、従来技術に対する貢献をもたらすものではなく、本願上記請求の範囲に係る発明は、26Sプロテアソームの再構成方法に適する個々のタンパク質に技術的特徴を有するものと認められる。そして、請求の範囲1に記載された、hsp70、hsp70/hsp40、hsp90、PA28の4つのタンパク質は、同一の又は対応する特別の技術的特徴を有しているとは言えないから、本願上記請求の範囲に係る発明は単一性がない。

## 請求の範囲 7

請求の範囲7に係る発明は、特定のタンパク質の存在下において、細胞又は組織のライセートをインキュベートすることによりインビトロで再構成したこと共通の技術的特徴とする26Sプロテアソームであると認める。しかしながら、下記文献には、HeLa細胞の抽出液をATP存在条件下でインキュベートすることにより再構成された26Sプロテアソームが記載されており、その際、抽出液中にPA28が含まれていることが示されている(第1図)。そうしてみると、上記の共通する技術的特徴は、従来技術に対する貢献をもたらすものではなく、本願上記請求の範囲に係る発明は、26Sプロテアソームの再構成方法に適する個々のタンパク質に技術的特徴を有するものと認められる。そして、請求の範囲7に記載された、hsp70、hsp70/hsp40、hsp90、PA28の4つのタンパク質は、同一の又は対応する特別の技術的特徴を有しているとは言えないから、本願上記請求の範囲に係る発明は単一性がない。