

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-60

(P2004-60A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

4 B O 2 4

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/00

4 B O 6 3

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 25/28

4 B O 6 5

C O 7 K 14/47

C O 7 K 14/47

4 C O 8 4

C O 7 K 19/00

C O 7 K 19/00

4 H O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 25 O L (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-159472 (P2002-159472)

(22) 出願日 平成14年5月31日 (2002.5.31)

(71) 出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

(74) 代理人 100076510

弁理士 掛樋 悠路

(74) 代理人 100086427

弁理士 小原 健志

(74) 代理人 100090066

弁理士 中川 博司

(74) 代理人 100094101

弁理士 館 泰光

(74) 代理人 100099988

弁理士 斎藤 健治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドβ産生に影響を与える化合物のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 アルツハイマー型痴呆症の発症に係るアミロイドβの産生を効率的に測定するための材料、および該材料を利用しアミロイドβ産生に影響を与える物質のスクリーニング方法の提供。

【解決手段】 アミロイドβ前駆蛋白 改変蛋白、および当該改変蛋白および検出可能な分泌型蛋白からなる融合蛋白、および、これらを安定発現した試験細胞、ならびに、該試験細胞を用いたアミロイドβ産生に影響を与える物質のスクリーニング方法。

【選択図】 なし。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

βセクレタース切断部位を含み、該βセクレタースによる切断に影響を与えず、かつαセクレタース切断を生じないようなアミノ酸変異がなされている、アミロイドβ前駆蛋白質（APP） 改変蛋白。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の APP 改変蛋白をコードする核酸分子。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の APP 改変蛋白を発現している試験細胞。

【請求項 4】

検出可能な分泌蛋白、及び請求項 1 に記載の APP 改変蛋白からなる融合蛋白。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の融合蛋白をコードする核酸分子。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の融合蛋白を発現している試験細胞。

【請求項 7】

被験物質がβセクレタース活性に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、請求項 3 および 6 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、該βセクレタースにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌型蛋白を測定することを特徴とする方法。

【請求項 8】

被験物質が、アミロイドβ産生に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、請求項 3 および 6 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、βセクレタースにより切断されて、細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することを特徴とする方法。

【請求項 9】

アルツハイマー型痴呆症治療薬又は予防薬の有効成分となる物質をスクリーニングするための方法であって、請求項 3 および 6 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、βセクレタースにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することを特徴とする方法。

【請求項 10】

被験物質の存在下で培養した細胞の生死判定を行うことにより、被験物質の細胞毒性を調べる工程を有する請求項 7 乃至 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

スウェーデン型家族性アルツハイマー病 APP 変異が導入されている請求項 1 に記載の改変蛋白。

【請求項 12】

スウェーデン型家族性アルツハイマー病 APP 変異が導入されている請求項 4 に記載の融合蛋白。

【請求項 13】

配列番号 2～6 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の改変蛋白。

【請求項 14】

配列番号 7～11 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の改変蛋白。

【請求項 15】

配列番号 12～16 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する請求項 4 に記載の融合蛋白。

【請求項 16】

配列番号 17～21 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する請求項 4 に記載の融合蛋白。

【請求項 17】

以下のアミノ酸配列

10

20

30

40

**Lys-Met-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val
-His-His-Gln- X - X -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-
Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val**

(ここでXは、任意のアミノ酸残基を表す)

を有する請求項 1 に記載の改変蛋白。

【請求項 18】

以下のアミノ酸配列

**Asn-Leu-Met-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu
-Val-His-His-Gln- X - X -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-
Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Va**

10

1

(ここでXは、任意のアミノ酸残基を表す)

を有する請求項 1 に記載の改変蛋白。

【請求項 19】

請求項 17 又は 18 のいずれかに記載の改変蛋白、及び検出可能な分泌蛋白からなる融合蛋白。 20

【請求項 20】

請求項 11～19 のいずれかに記載の蛋白をコードする核酸分子。

【請求項 21】

請求項 11～19 のいずれかに記載の蛋白を発現している試験細胞。

【請求項 22】

被験物質がβセクレタース活性に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、請求項 21 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、該βセクレタースにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌型蛋白を測定することを特徴とする方法。

【請求項 23】

被験物質が、アミロイドβ産生に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、請求項 21 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、βセクレタースにより切断されて、細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することを特徴とする方法。

30

【請求項 24】

アルツハイマー型痴呆症治療薬又は予防薬の有効成分となる物質をスクリーニングするための方法であって、請求項 21 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、βセクレタースにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することを特徴とする方法。

【請求項 25】

被験物質の存在下で培養した細胞の生死判定を行うことにより、被験物質の細胞毒性を調べる工程を有する請求項 22 乃至 24 のいずれかに記載の方法。 40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アルツハイマー病誘因の一つと考えられているアミロイドβの測定方法およびアミロイドβの産生に影響を与える物質のスクリーニング方法の提供に関する。

【0002】

【従来の技術】

アルツハイマー型痴呆症は、進行性の神経変性疾患であり、記憶力障害を中心とする認知機能障害と病理学的変化（老人斑、神経原線維変化および神経細胞死）がその特徴とされ 50

ている。

【0003】

一方、アミロイドβは、約40個のアミノ酸残基からなるポリペプチドで、本疾患の病理学的特徴である老人斑の主要な構成成分であり、アミロイドβの脳内蓄積は本疾患の初期における病理変化として周知である。

【0004】

また、アミロイドβは、それ自体神経細胞に対して毒性を示すこと、及びその前駆体であるアミロイドβ前駆蛋白質 (amiloïd precursor protein: APP) に遺伝的に変異を有する家系が存在し高頻度にアルツハイマー型痴呆症が発症すること、およびその変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおいては脳内に大量のアミロイドβの蓄積が認められることなどから、本疾患の発症原因の一つであると考えられている。

10

【0005】

APPは、構造上I型膜蛋白質として分類され、生体内においては、Kunitz-type protease inhibitor domainの有無により数種の分子種が存在する。神経系においては、695アミノ酸残基よりなるAPP695が主要分子であるが、その生理作用については不明の部分が多い。

【0006】

ところで、APPは、多くは図1に示すようにアミロイドβ中央部(N末端から16番目)、すなわち、APP695の612位リジン残基のC末端側においてαセクレターゼによりプロセッシングを受ける。この場合、アミロイドβの産生は起こらず、N末端側のsAPPαとC末端側の83残基のフラグメント(C83)が生じる。C83は、さらに、γセクレターゼによりP3ペプチドを生じるが、P3ペプチドはアミロイドβと性質が異なり凝集性を示さず、易分解性であることが示されている(非アミロイドβ産生系)。

20

【0007】

一方、APPのマイナープロセッシング系として、アミロイドβを生ずるアミロイドジェニックな系が存在する。このプロセッシングは、APP695の596位メチオニン残基C末端側において、βセクレターゼの作用により生じる系であり、sAPPβおよびC末端側の99残基のフラグメント(C99)が生じる。C99は、さらにγセクレターゼによる切断を受け、アルツハイマー病の原因とされるアミロイドβを産生する。また、この経路は、APPのプロセッシング全体の10%以下と考えられている(アミロイドβ産生系)。

30

【0008】

ここでいうαセクレターゼとは、APPにおけるαセクレターゼ切断部位に作用し、ペプチド結合を切断せしめる酵素、βセクレターゼとは、APPにおけるβセクレターゼ切断部位に作用し、ペプチド結合を切断せしめる酵素をいう。

【0009】

また、上記APPプロセッシングの初期段階において、αおよびβセクレターゼは競合的に働くとされている(Journal of Molecular Neuroscience 17, 157-180, 2001)。

40

【0010】

現在、アミロイドβの産生を抑制することによりアルツハイマー病を予防、治療する試みがなされているが、その標的分子候補の一つとしてβセクレターゼが検討されている。βセクレターゼは、すでにBACE1として同定されている。またBACE1ノックアウトマウスの知見よりBACE1が欠損しても正常なフェノタイプを示すことが報告されている(Nature Neuroscience, 4, 231, 2001 および Nature Neuroscience, 4, 233, 2001)。従って、βセクレターゼ活性を阻害することによるアミロイドβ産生抑制はアルツハイマー病の予防薬、治療薬に結びつくものとして期待されている。他方、βセクレターゼ活性を上げる物質は、アルツハイマー病の発症機構の解明、疾患モデルの作製、およびアミロイド仮説の証明に役立つ

50

ものと思われる。

【0011】

実際、野生型 A P P の C 末端部分を、分泌型アルカリホスファターゼ (S E A P) の C 末端側に融合した蛋白を細胞内に発現させ、 β セクレターズ阻害活性を有する化合物を、培養上清中に分泌された S E A P 活性を測定することによりスクリーニングする方法などが検討されている (シーアイエス ダイアグノスティック株式会社)。

【0012】

しかしながら、前述のように α および β セクレターズは競合的に働き、しかも α セクレターズによるプロセッシングが全体の 90% を占めていることから、アミロイド β 産生効率は極めて低いものと考えられる。従って、前述の融合蛋白を用いたスクリーニング系では、アミロイド β 産生に影響を与える物質を、効率的にスクリーニングし得るとは言い難い。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、アルツハイマー型痴呆症の発症に関係するアミロイド β の産生を効率的に測定するための材料及び方法、並びにアミロイド β の産生に影響を与える物質を効率的にスクリーニングするための方法を提供することを主な目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、アミロイド β の産生を効率的に測定するための材料又は方法について、鋭意研究した結果、A P P の α セクレターズ切断部位をアミノ酸置換することにより、 β セクレターズ切断に影響を与えることなく、該 α セクレターズ切断を消失せしめ得ることを見出した。更に、当該 A P P 変換蛋白を、検出可能な分泌蛋白に融合させて、細胞内に安定発現させることにより、アミロイド β 産生に影響を与える物質を効率的にスクリーニングする方法を見出し、これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

【0015】

即ち、本発明は、次の事項を含むものである。

【0016】

項 1. β セクレターズ切断部位を含み、該 β セクレターズによる切断に影響を与えず、かつ α セクレターズ切断を生じないようなアミノ酸変異がなされている、アミロイド β 前駆蛋白質 (A P P) 変換蛋白。

【0017】

項 2. 項 1 に記載の A P P 変換蛋白をコードする核酸分子。

【0018】

項 3. 項 1 に記載の A P P 変換蛋白を発現している試験細胞。

【0019】

項 4. 検出可能な分泌蛋白、及び項 1 に記載の A P P 変換蛋白からなる融合蛋白。

【0020】

項 5. 項 4 に記載の融合蛋白をコードする核酸分子。

【0021】

項 6. 項 4 に記載の融合蛋白を発現している試験細胞。

【0022】

項 7. 被験物質が β セクレターズ活性に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、項 3 および 6 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、該 β セクレターズにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌型蛋白を測定することの特徴とする方法。

【0023】

項 8. 被験物質が、アミロイド β 産生に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、項 3 および 6 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、 β セクレターズにより切断されて、細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することの特徴とする方法。

【0024】

10

20

30

40

50

項 9. アルツハイマー型痴呆症治療薬又は予防薬の有効成分となる物質をスクリーニングするための方法であって、項 3 および 6 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、 β セクレタースにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することを特徴とする方法。

【0025】

項 10. 被験物質の存在下で培養した細胞の生死判定を行うことにより、被験物質の細胞毒性を調べる工程を有する細胞毒性を示すか否かを試験する工程を含む項 7 乃至 9 のいずれかに記載の方法。

【0026】

本願発明には、更には、以下の発明が包含される。

10

【0027】

項 11. スウェーデン型家族性アルツハイマー病 A P P 変異が導入されている、項 1 に記載の改変蛋白。

【0028】

項 12. スウェーデン型家族性アルツハイマー病 A P P 変異が導入されている、項 4 に記載の融合蛋白。

【0029】

項 13. 配列番号 2 ～ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する項 1 に記載の改変蛋白。

【0030】

20

項 14. 配列番号 7 ～ 11 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する項 1 に記載の改変蛋白。

【0031】

項 15. 配列番号 12 ～ 16 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する項 4 に記載の融合蛋白。

【0032】

項 16. 配列番号 17 ～ 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する項 4 に記載の融合蛋白。

【0033】

項 17. 以下のアミノ酸配列

30

**Lys-Met-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val
-His-His-Gln- X - X -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-
Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
(ここでXは、任意のアミノ酸残基を表す)**

を有する項 1 に記載の改変蛋白。

【0034】

項 18. 以下のアミノ酸配列

40

**Asn-Leu-Met-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-
Val-His-His-Gln- X - X -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Se
r-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
(ここでXは、任意のアミノ酸残基を表す)**

を有する項 1 に記載の改変蛋白。

【0035】

項 19. 項 17 又は 18 のいずれかに記載の改変蛋白、及び検出可能な分泌蛋白からなる融合蛋白。

【0036】

50

項 2 0 . 項 1 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の蛋白をコードする核酸分子。

【 0 0 3 7 】

項 2 1 . 項 1 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の蛋白を発現している試験細胞。

【 0 0 3 8 】

項 2 2 . 被験物質が β セクレターゼ活性に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、項 2 1 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、該 β セクレターゼにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌型蛋白を測定することを特徴とする方法。

【 0 0 3 9 】

項 2 3 . 被験物質が、アミロイド β 産生に影響を与えるか否かを試験するための方法であって、項 2 1 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、 β セクレターゼにより切断されて、細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することを特徴とする方法。 10

【 0 0 4 0 】

項 2 4 . アルツハイマー型痴呆症治療薬又は予防薬の有効成分となる物質をスクリーニングするための方法であって、項 2 1 に記載の細胞を被験物質の存在下で培養し、 β セクレターゼにより切断されて細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することを特徴とする方法。

【 0 0 4 1 】

項 2 5 . 被験物質の存在下で培養した細胞の生死判定を行うことにより、被験物質の細胞毒性を調べる工程を有する項 2 2 乃至 2 4 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 4 2 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について、詳細に説明する。

【 0 0 4 3 】

アミロイド β 前駆蛋白質 (A P P) 改変蛋白

本発明におけるアミロイド β 前駆蛋白質 (A P P) 改変蛋白とは、A P P における β セクレターゼ切断部位を含み、かつ、 α セクレターゼ切断部位が、上記 β セクレターゼによる切断に障害を与えないアミノ酸変異によって改変されていることを特徴とする蛋白である。

【 0 0 4 4 】

ここで、 β セクレターゼ切断部位とは、例えば、A P P 6 9 5 においては、A P P 6 9 5 の 5 9 6 位メチオニン残基と 5 9 7 位アスパラギン酸残基の間を指す (図 1 参照)。また、 α セクレターゼ切断部位とは、A P P 6 9 5 においては、6 1 2 位リジン残基と 6 1 3 位のロイシン残基との間を指す。 30

【 0 0 4 5 】

A P P 6 9 5 のアミノ酸配列を図 2 及び配列表の配列番号 1 に示す。以下、本明細書におけるアミノ酸、蛋白質、塩基配列、核酸等の略号による表示は、I U P A C、I U B の規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

【 0 0 4 6 】

A P P には、A P P 6 9 5 以外に、A P P 7 5 1、A P P 7 7 0 等の複数の分子種が存在するが、これらの α セクレターゼ及び β セクレターゼの切断部位は同じであるため、A P P 6 9 5 を用いて説明している。但し、本発明の A P P 改変蛋白に用いる A P P が、A P P 6 9 5 に限定されるわけではない。 40

【 0 0 4 7 】

本発明の A P P 改変蛋白においては、上記特徴を有するために必要な領域を含有し、かつ β セクレターゼによる切断に支障がなければ、特に、N 末端側のアミノ酸配列の長さには限定はない。また、C 末端領域に関しても、 β セクレターゼ部分の開裂後に生じる γ セクレターゼにより生じるアミロイド β の産生に支障がなければ、必ずしも C 末端部分全てのアミノ酸配列を必要とするわけではない。

【 0 0 4 8 】

A P P 6 9 5 の場合、上記特徴を有するために必要な領域として、A P P 6 9 5 の 5 9 3 - 6 4 8 位を例示することができる。

【0049】

この必要な領域について説明すると、まずβセクレター認識サイト596-597を含んでいる必要がある。また、βセクレターが、基質として認識するのにN端側の4残基程度が必要であるとの報告(Neuron, 14, 661-670 (1995))があるため、少なくともN端側は、593残基から必須となる。さらに、αセクレターサイトである612-613が必要である。更に、産生されるアミロイドβにて産生量を確認するためのアミロイドβ部分(597-638)を含めると593-638残基が必要となる。また更に、A P P は、I型膜蛋白であるので、正常に膜に固定され、膜に固定された上でプロセッシングを受けるために、膜貫通領域625-648が必要である。従って、これらを含む593-648位が例示される。

【0050】

このような領域を含む蛋白としては、例えば、A P P 6 9 5 のアミノ酸配列581-695位を含むC末端側領域を有するものなどが例示できる。

【0051】

本発明において、「βセクレターによる切断に影響を与えず」とは、αセクレター切断を生じさせないようなアミノ酸変異によって、βセクレターによる切断が消失又は低下しないことを意味する。

【0052】

本発明の改変蛋白において、αセクレター切断を生じないようなアミノ酸変異とは、例えば、αセクレター切断部位におけるアミノ酸の欠失、置換、付加などによってアミノ酸が変異されたものを意味する。該アミノ酸変異は、βセクレターによる切断に影響を与えず、かつαセクレター切断を生じないようなものである限り、特に制限されることはない。

【0053】

このうち、アミロイドβのN末端アミノ酸から17位のロイシン残基をグルタミン酸、プロリン、アラニン又はリジンに置換するアミノ酸で変異したもの、および、16位リジン残基をトリプトファンに置換するアミノ酸に変異したものが、特に好ましい。

【0054】

具体的には、配列番号2~6のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するA P P 改変蛋白などが例示できる。

【0055】

さらに、βセクレターの攻撃をより容易にするために、一般に知られている遺伝性アルツハイマー病におけるA P P アミノ酸変異配列を導入することもできる。遺伝性アルツハイマー病におけるA P P アミノ酸変異配列としては、例えば、スウェーデン型家族性アルツハイマー病A P P 変異配列を例示できる。

【0056】

このような蛋白として、具体的には、配列番号7~11のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する改変蛋白などが挙げられる。

【0057】

本発明のA P P 改変蛋白は、A P P 蛋白をコードする遺伝子を該改変蛋白のアミノ酸配列をコードするD N A 配列に改変し、適当な発現ベクターへ導入した後、宿主細胞内において発現させることにより得ることができる。また、各ステップにおける目的遺伝子の取得に際し、適宜、サブクローニング操作等を行ってもよい。例えば、適当なクローニングベクターに目的遺伝子を挿入した後、常法により目的遺伝子の選別を行い、該遺伝子自体の量を増やすことなどができる。

【0058】

なお、A P P 改変部分のアミノ酸に対応するD N A 分子に関しては、該アミノ酸配列をコードするD N A 配列である限り、いずれの組み合わせも可能である。コドンの選択は、常

法に従って行うことができる。例えば、利用する宿主のコドンの使用頻度などを考慮し決定することができる。

【0059】

また、目的DNA分子配列の取得に際しては、たとえばPCR法によるDNA増幅法により変換増幅することができる。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、上記核酸分子の変換DNAの配列情報に基づいて適宜設定でき、常法に従って合成できる。

【0060】

また、増幅させたDNA断片の単離、精製は、常法に従って行うことができ、例えばゲル電気泳動法、分子ふるい操作などによって得ることができる。

10

【0061】

また、上記で得られる本発明の核酸分子或いはDNA断片は、例えばジデオキシ法やマキサムーギルバート法などに従って、また簡便には市販のシークエンスキットなどを用いて、その塩基配列を決定することができる。

【0062】

該蛋白の製造は、上記DNA分子により提供されるDNA分子の配列情報に基づいて、常法の遺伝子組換え技術（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley Sons, Inc. 1998. など参照）に従って調製することができる。

20

【0063】

該蛋白の製造は、より詳細には、該所望の蛋白をコードするDNA分子が宿主細胞中で発現できる組換えDNA（発現ベクター）を作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から回収することによって行われる。

【0064】

宿主細胞としては、原核生物由来細胞、真核生物由来細胞などを用いることができる。

【0065】

原核生物由来細胞としては、例えば、大腸菌や枯草菌などに由来する細胞を用いることができる。大腸菌としては、とりわけエシェリシア・コリ（*Escherichia coli*）K12株に含まれるものが好適である。また、枯草菌としては、とりわけバチラスズブチリス マーバーグ168株に含まれるものが好適である。

30

【0066】

原核生物を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中にDNA分子が発現できるように該遺伝子の5'にプロモーター及びSD（シャイン・アンド・ダルガーノ）塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン（例えばATG）を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベクターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13 などがよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種ベクターを用いることができる。大腸菌を利用した発現系に利用される上記ベクターの市販品としては、例えばpGEX-4T（Amersham Pharmacia Biotech 社）、pMAL-C2、pMAL-P2（New England Biolabs 社）、pET21、pET21/lacq（Invitrogen 社）、pBAD/His（Invitrogen 社）等を例示できる。

40

【0067】

プロモーターについても特に限定はなく、エシェリシア属菌を宿主とする場合は、例えばトリプトファン（trp）プロモーター、lppプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PL/PR プロモーターなどを好ましく利用できる。宿主がバ

50

チルス属菌である場合は、S P O 1 プロモーター、p e n P プロモーターなどが好ましい。

【0068】

真核生物由来細胞としては、例えば、哺乳動物由来細胞、具体的には、サルの細胞であるCOS細胞 (Cell, 23: 175 (1981)) やチャイニーズハムスター卵巣細胞およびそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (J. Exp. Med., 108: 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 4216 (1980))、NIH3T3細胞 (J. Virol., 4: 549 (1969))、およびJurkat細胞 (J. Immunol., 133: 123 (1984)) などを用いることができる。また、サッカロミセス属酵母細胞なども好適に用いることができる。 10

【0069】

真核生物由来細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとするDNA分子上流のプロモーター、RNAのスプライシング部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列を保有するものが挙げられ、更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、例えばSV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr (Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)) 等が例示できる。上記以外にも既知の各種市販ベクターを用いることができる。動物細胞を利用した発現系に利用される、かかるベクターとしては、例えばpCI (Promega社)、pIND (Invitrogen社)、pcDNA3.1/His (Invitrogen社)、pEF1/V5-His (Invitrogen社)などの動物細胞用ベクターや、pFastBac HT (GibcoBRL社)、pAcGHIT (PharMingen社)、pAc5/V5-His、pMT/V5-His、pMT/Bip/V5-his (以上 Invitrogen社)などの昆虫細胞用ベクターなどが挙げられる。 20

【0070】

また、動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインのプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーター、アデノウイルスプロモーター、エロンゲーションファクターのプロモーターなどを例示できる。酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えばpH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどを好適に利用できる。 30

【0071】

発現ベクターの宿主細胞への導入法及びこれによる形質転換法は、特に限定されず、一般的な各種方法を採用することができる。具体的には、エレクトロポレーション、リポソーム法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法などを用いることができる。

【0072】

宿主細胞を培養し、産生される蛋白を適宜分離精製することによって、本発明の蛋白を取得することができる。

【0073】

かくして取得した当該蛋白は、そのもの自体を、 β -セクレタースに対して、影響を与える化合物のスクリーニングに使用することができる。 40

【0074】

また、真核生物由来細胞を用いて当該蛋白を産生した場合には、細胞全体あるいは単離蛋白のいずれを用いても良い。

【0075】

被験化合物および該蛋白（又は蛋白発現細胞）を、 β -セクレタースの共存下反応することにより、上述 β -セクレタースに対して影響を与える化合物を効果的にスクリーニングすることもできる。

【0076】

蛋白の検出方法は、たとえばA P Pのアミノ酸配列を認識する抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法、或いはE L I S A法などで行うことができる。

【0077】

融合蛋白

本発明の融合蛋白とは、上述した本発明のA P P改変蛋白のN末端側部分に、検出可能な分泌蛋白等を融合した蛋白をいう。

【0078】

検出可能な分泌蛋白等とは、そのアミノ酸配列中に細胞内各組織への局在配列を含まない蛋白であり、細胞内構成成分とは異なり、通常の細胞内における生合成により細胞外に遊離され、その機能を発揮する蛋白およびアミノ酸配列を指し、当該分泌蛋白等のC端側領域において、 β セクレターズにより切断を受け、細胞外に分泌され得る蛋白等をいう。 10

【0079】

好ましくは、当該分泌蛋白等は、酵素のように基質を用いて簡便に検出できるもの、あるいは、そのもの自体が特徴的な物性を有し、機器および試薬などを用いて、胞外又は培養上清中に分泌された量を定量的に測定できるもの、あるいは、細胞外にて生理活性作用を発揮する蛋白・ペプチドである。また、培養上清中の該生理活性蛋白に起因する生物活性を測定できるもの、あるいは、一般的に、分泌蛋白の抗体を利用し、培養上清中の該分泌蛋白の量を、例えば、E L I S A法あるいはウエスタンブロッティング法などにより測定できるものも用い得る。

【0080】

具体的には、分泌型アルカリフォスファターゼ、 β ガラクトシダーゼ、パーオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等を挙げることができ、例えば、培養上清中に当該酵素の基質を添加することにより、酵素活性量として定量することが可能である。 20

【0081】

他に例示すれば、グリーンフルオレッセンスプロテイン（G F P）、エクオリン等の検出可能な蛋白、イムノグロブリン、成長ホルモン等の測定系の確立されている蛋白、ヒスチジンタグ、c-m y cタグ、フラッグタグ、ヘマグルチニン（H A）タグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ（G S P）タグ、T7タグ、V5エピトープタグ、X-p r e s sタグ、B E 1 1タグ等の抗体により検出可能なアミノ酸配列等を例示することができる。 30

【0082】

さらに例示すれば、サイトカインに属する生理活性蛋白群、例えばインターロイキン2を挙げることができ、細胞外に遊離した該蛋白を培養液中の生物活性を測定することにより、あるいは市販のE L I S Aキットを用いて測定することにより、検出することが可能である。

【0083】

また、これらの分泌蛋白等は、分泌型蛋白として産生され、分泌されることが望ましく、本来の分泌蛋白としてのシグナルペプチドを有することが望ましいが、A P Pその他の分泌蛋白のシグナルペプチドを利用して、分泌させることも可能である。

【0084】

また、これらの分泌蛋白等は、検出される酵素活性、免疫反応性、生物活性等に大きな影響のない限りにおいて、その配列の一部を改変、欠失、挿入することが可能である。 40

【0085】

一方、分泌蛋白等に融合せしめる蛋白は、上述の本発明のA P P改変蛋白であって、A P Pにおける β セクレターズ切断部位を含み、 β セクレターズによる切断に影響を与えず、かつ α セクレターズ切断を生じないようなアミノ酸変異がなされた蛋白である。

【0086】

該アミノ酸変異は、 β セクレターズによる切断に影響を与えず、かつ α セクレターズ切断を生じないようなものである限り、特に制限されることはないが、中でも、アミロイド β のN末端アミノ酸から17位のロイシン残基をグルタミン酸、プロリン、アラニン又はリジンに置換するアミノ酸で変異したもの、および、16位リジン残基をトリプトファンに 50

置換するアミノ酸に変異したものが、特に好ましい。

【0087】

本発明の融合蛋白として、具体的には、配列番号12～16のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する蛋白などを例示することができる。

【0088】

さらに、本発明の融合蛋白には、 β セクレターズの攻撃をより容易にするために、一般に知られている遺伝性アルツハイマー病におけるAPPアミノ酸変異配列を導入することもできる。遺伝性アルツハイマー病におけるAPPアミノ酸変異配列としては、例えば、スウェーデン型家族性アルツハイマー病APP変異配列を例示できる。

【0089】

このような融合蛋白として、具体的には、配列番号17～21のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する蛋白などを挙げるることができる。

【0090】

また、該APP改変蛋白は、 β セクレターズの攻撃を受け、切断された後、該分泌蛋白が細胞外に分泌され、かつ分泌された該蛋白が本来の特性を保持しうるアミノ酸領域を有していることが好ましい。そのようなアミノ酸領域としては、例えば、 β セクレターズの切断部位からN端側のアミノ酸4残基までの領域から、膜貫通領域（APP695の625～648番目のアミノ酸領域）までを含む領域、すなわちAPP695の593～648位等が挙げられる。さらに、この領域を含む改変蛋白として、APP695の581～695位のC端領域を例示することができる。

【0091】

また、当該融合蛋白は、APPにおける β セクレターズ切断部位が β セクレターズの攻撃に影響を及ぼすような立体構造上の障害を持つものでないよう、必要に応じて、APP改変蛋白のN末端領域を延長し、もしくは、適宜分泌蛋白とAPP改変蛋白の間に新たにスペーサーを入れることもできる。

【0092】

このような融合蛋白の具体例として、配列番号12～21のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する蛋白を例示することができる。

【0093】

該融合蛋白は、前述の本発明APP改変蛋白における製造方法に記載されたのと同様の方法で製造することができ、遺伝子組換え手法により、前述した本発明のAPP改変蛋白をコードする遺伝子および分泌可能な蛋白をコードする遺伝子を基に作製することができる。

【0094】

試験細胞

上述した本発明のAPP改変蛋白又は融合蛋白を安定に発現する本発明の試験細胞について以下に述べる。

【0095】

ここで、試験細胞とは、化合物の効力や毒性などを測定するための試験に使用し、測定結果を判定するために用いられる細胞のことを意味する。

【0096】

本発明の試験細胞は、例えば、上述と同様の遺伝子工学的手法および材料（発現ベクター）を用いることにより、作成することができる。

【0097】

治療薬の開発を目的としたスクリーニングに使用する場合には、試験細胞の製造に使用する細胞の、細胞構成成分、遺伝子発現機構、蛋白発現機構および分泌機構が、ヒトに近いことが好ましい。従って、融合蛋白を発現する細胞の場合は、例えば、APP部分で切断を受けた後、分泌蛋白が細胞外に遊離される機構を備えた細胞などを用いることが好ましい。

【0098】

10

20

30

40

50

また、細胞の性質としては、増殖速度が速く継代を経ても安定な細胞であることが好ましい。例えば、ヒト由来細胞または、哺乳動物由来の細胞、具体的にはCHO-K1細胞（J. Exp. Med., 108: 945 (1958)）、HeLa細胞（Cancer Res., 12: 264 (1952)）、NIH3T3細胞（J. Virol., 108: (1958)）、Jurkat細胞（J. Immunol., 133: 123 (1984)）、293細胞（J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)）などを例示できる。

【0099】

安定発現細胞株を得るための方法として、薬剤耐性遺伝子、即ち、アミノグリコシドリン酸転移酵素（Th5neo）、ハイグロマイシンBリン酸転移酵素（hygr）、キサンチン・グアニンホスホリボシル転移酵素（Ecogpt）およびジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）などを、発現ベクターに組み込んでいる発現ベクター、たとえば、pSV2neo、pRSVneoあるいは、pHyg、pSV2gpt、もしくはpSV2dhfrなどを用いることができる。これを、細胞内導入後、それぞれの選択薬剤G418、ハイグロマイシン、HAT培地およびメトトレキセート添加培地にて培養することにより安定発現細胞を得ることが可能である。また、高発現細胞株の選別に関しては、培養上清中の分泌蛋白か、もしくは該融合蛋白の構成成分を測定することにより達成することができる。たとえば、培養上清中の酵素活性を例示することができる。あるいは、細胞内にあっては、検出可能な分泌蛋白およびAPP C末端部分認識抗体を用いたウエスタンブロッティング法あるいはELISA法にて検出することも可能である。さらに、遺伝子発現レベルでは、ノーザンブロッティングあるいはRT-PCR法などを用いて検出することができる。

10

20

【0100】

測定方法

本発明の測定方法は、上述した試験細胞を被験物質と処理し、βセクレタース切断部位で開裂され細胞外に分泌された検出可能な分泌蛋白を測定することにより行うことができる。

【0101】

以下に、その測定方法に関して詳述する。すなわち、該試験細胞を、培地で懸濁した後、適当な培養プレートに播種する。播種細胞は、必要なら安定化するまで一定時間インキュベートを行う。また、プレートは播種細胞数、および分泌蛋白の測定感度を勘案して任意に決定できる。好適な例として、例えば、96穴プレートをあげることができる。

30

【0102】

その後、被験化合物を溶媒に加え、溶解せしめた後、一定濃度となるように添加する。この時、被験物質は、たとえば脂溶性化合物又は難溶性化合物であればDMSOなどの両親媒性溶媒を用いて溶解した後添加することができるが、使用溶媒が細胞に対して影響を及ぼさない濃度に設定することが望ましい。また、親水性被験物質の場合は、水溶性の溶媒、たとえば生理食塩水、培地などを用いることができる。被験物質を添加後、一定時間培養を行うが、培養時間は、被験物質が細胞内に取り込まれ十分に標的分子と反応する時間であればよく、試験系に応じて任意に設定できる。

40

【0103】

インキュベート後、培養上清を一定量分取し、該上清中に存在する分泌蛋白量をその特性に応じて測定する。例えば、該分泌蛋白が酵素であれば基質を添加することにより酵素活性量として測定することができる。また、該分泌蛋白が特徴的物性を有するものであれば、その特性に応じた測定法によればよく、たとえば特有の吸収スペクトルを有するものであれば吸光度計等を用いて測定できる。必要ならHPLCなどを用いた分離操作により、目的蛋白をモニターすることにより定量することもできる。さらに、該分泌蛋白が生理活性蛋白たとえばサイトカインのようなものであれば、培養上清中の該蛋白に起因する生物活性を測定すればよい。また、市販のELISAキットなどを用いて測定定量することも可能である。

50

【0104】

また、細胞内に発現している融合蛋白の存在形態をモニターしてもよい。つまり、融合蛋白がβセクレタース切断部位において切断を受けたかどうかを直接確認することもできる。すなわち、βセクレタースにより切断を受け生成する99残基のC端フラグメント（C99）の量を測定することにより、被験候補化合物が機能的に作用したか否かを確認することができる。

【0105】

測定方法としては、C99を認識する抗体を用いて、たとえば細胞を溶解後ウエスタンブロッティングあるいはELISA法を用いて検出定量することが可能である。

【0106】

被験物質が、βセクレタース活性に影響を及ぼすかどうかは、上記方法において、被験物質無添加（溶媒のみ）において培地中に遊離されてくる該検出可能な分泌蛋白（コントロール値）を基準にして判定することができる。具体的には、コントロール値に対して測定値が低い場合は、アミロイドβ産生に抑制的影響を及ぼしたものと判定される。また、逆にコントロール値に比し高い値が測定された場合は、アミロイドβ産生に促進効果を有しているものと判定される。

【0107】

被験化合物がアミロイドβ産生に対して影響を及ぼすかどうかは、統計学的解析、すなわち、有意差検定を行うことにより判定を行う。

【0108】

上記方法によって、被験物質が、βセクレタース活性に対して影響を及ぼすかどうかを試験することができる。また、アルツハイマー型痴呆症治療薬又は予防薬の有効成分の候補となる物質をスクリーニングする事ができる。

【0109】

さらに、本発明の測定方法においては、被験物質が細胞に対して毒性を示すか否かを試験する工程を含ませてもよい。

【0110】

被験物質が細胞に対して毒性を示すか否かは、被験物質と試験細胞を処理し、検出可能な分泌型蛋白を測定した後、該処理細胞の生存状況を測定することにより、判定することができる。

【0111】

具体的には、生存細胞数の測定は、カルセインAMに染色された細胞数を、死細胞数の染色においては、プロピジウム - ヨードによって染色された細胞数を測定することによって調べることができる。また、トリパンブルー染色にて染色された細胞をカウントすることにより死細胞数を測定することもできる。あるいは生細胞によって生じるテトラゾリウム塩（MTT, MTS, WST-1, WST-8等）のホルマザンを比色測定することにより生細胞数を、あるいはアポトーシスなどの細胞死により培養上清中に流出してきた乳酸脱水素酵素（LDH）を測定することにより死細胞数を測定することもできる。もちろん、これらに限定されるものではない。

【0112】

【実施例】

以下、実施例により、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0113】

実施例1：APP改変蛋白遺伝子の構築と発現

ヒト型APP遺伝子（図2）のN末端のシグナルペプチド直後にエピトープ タグ B E 1 1を付加し、ベクターに組み込んだB E 1 1-h A P P 6 9 5を出発物質とした。

A P P 6 9 5のαセクレタース切断部位のN末側アミノ酸（アミロイドβ16位リジン）、もしくは、C末側アミノ酸（アミロイドβ17位ロイシン）にサイトダイレクテッドムータゲネシス法（Quick Change, Stratagene）を用いて、16位

10

20

30

40

50

にはトリプトファンを、17位には、アラニン、グルタミン酸、リジン、プロリン、グルタミン、スレオニン残基を導入した。これらの変異型APPと野生型APPをそれぞれpCIneo哺乳動物発現ベクター（Promega）に組み入れたコンストラクトを構築し、リポソーム法（DOTAP, ベーリングマンハイム）にてCOS7細胞にトランスフェクトし、一過性に発現させた。トランスフェクト後48時間で細胞と培養上清を回収し、8% SDS-PAGE/ウエスタンブロッティングにて発現蛋白とそのプロセッシングを解析した。また、BE11に対するモノクローナル抗体（Mab BE11）を用い細胞膜付随全長型APPの発現を確認し、その発現レベルを標準化した後、培養上清（Medium）中に分泌された α セクレタース切断産物（sAPP α ）と β セクレタース切断産物（sAPP β ）をそれぞれに対する特異的抗体をもちいて検出、定量した。結果を図3及び表1に示す。

10

【0114】

図3において、A、E、K、P、Q、Tは、アミノ酸1文字表記で、それぞれ、アラニン、グルタミン酸、リジン、プロリン、グルタミン、スレオニンを意味する。また、左端のWは野生型（Wild type）を、右端のmは、mockでベクターのみを意味する。

【0115】

【表1】

20

表1.

	α 切断	β 切断
Trp (16位)	↓↓	→
Ala (17位)	↓	→
Glu (17位)	0	→
Pro (17位)	0	→
Lys (17位)	↓↓	↑

30

【0116】

また、表1において、↓は各セクレタース切断産物の量の減少、→は各セクレタース切断産物の量が不変、↑はセクレタース切断産物の量の増加、0は、各セクレタース切断産物が全く検出されないことを示す。

40

【0117】

図3又は表1の結果に示されるように、17位をアラニンで置換した場合、 α セクレタース切断産物の量が減少した。16位をトリプトファンで置換した場合、 α セクレタース切断産物の量が大幅に減少した。また、17位をグルタミン酸又はプロリンで置換した場合には、 α セクレタース切断産物が全く検出されなかった。

【0118】

一方、これらの変異によって、 β セクレタースによる切断は全く影響を受けなかった。

【0119】

50

また、17位をリジンに置換したところ、 α セクレテース切断産物の量が減少し、 β セクレテース切断産物の量がやや増加した。

【0120】

以上の結果に示されるように、これらの変異を導入した本発明のタンパク質は、アミロイド β の産生に影響を与える物質を効率的にスクリーニングするために有効に使用し得ることが確認できた。

【0121】

以下、アミロイド β 17位をグルタミン酸で置換して変異したAPP改変蛋白を用いて、融合蛋白の構築を行った。

【0122】

実施例2：融合蛋白遺伝子の構築および試験細胞の樹立

(1) 融合蛋白遺伝子の構築

まず、分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) をコードしている cDNA (pSEAP2-Basic (Clontech, Cat. No. 6049-1)) を、EcoRI 及び XbaI で処理することにより、EcoRI-XbaI 断片を得た。ただし、これは、SEAP のコーディング領域の、最後の10個のアミノ酸に相当する部位は除かれている。

【0123】

次いで、ヒトAPP改変蛋白 cDNA 断片すなわち、C末端領域 (APP N末端より数えて581から695アミノ酸) を用いてPCR法をにより単離した。なお、プライマーは以下のものを用いた。

センスプライマー： TCTAGACCCAGGTTCTGGGTGACAAATATC (XbaI を含む)

アンチセンスプライマー： CCGGATCCCTAGTTCTGCATCTGCTCAAGAAGCTTGTAA (NotI を含む)。

また、テンプレートDNAは、前述本発明ヒトAPP改変蛋白遺伝子を用いた。

【0124】

PCR反応条件は以下の通りである。

【0125】

反応溶液 25 μ l (10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% TritonX-100, 400 μ M NTP, 0.5 μ M Primer (各センス、アンチセンス), 10 ng テンプレートDNA, 0.01% BSA, 0.25ユニット Ventri'q DNAポリメラーゼ (NEB, Cat. No. 254L) を含む 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)。

【0126】

増幅条件は、(94 $^{\circ}\text{C}$ x 30秒、55 $^{\circ}\text{C}$ x 1分、72 $^{\circ}\text{C}$ x 2分) x 25サイクルで行い、増幅されたPCR断片のクローニングには、pT7 blue-3 (Novagen Inc., Cat. No. 70029-3) を使用し、トランスフォーメーションには、E. coli DH5a (Toyobo, Cat. No. DNA-901) を用いた。該操作により、pT7 blue-3/cAPPEを得た。

【0127】

また、スウェーデン型変異を挿入するために、以下の操作を行った。すなわち、まずBglIIおよびEcoRIサイトを持つDNAアダプターを作製した。なお、オリゴヌクレオチド配列は、以下の通りである。

【0128】

センス： GATCTCTGAAGTGAACCTGGATGCAG

アンチセンス： AATTCTGCATCCAGGTTCACTTCAGA

これを、BglIIおよびEcoRIで前もって消化しておいたpT7 blue-3/cAPPEに挿入し、サブクローニングを常法に従って行い、pT7 blue-3/

10

20

30

40

50

A P P Eを得た。

【0129】

次いで、p T 7 b l u e - 3 / A P P Eを、常法に従いX b a IおよびN o t Iにて処理を行い、得たX b a I - N o t I断片を融合蛋白の製造材料とした。S E A Pに関しては、p S E A P 2 - B a s i c をE c o R IおよびX b a Iにて処理を行い、S E A P E c o R I - X b a I D N A断片を得た。

上記2種類のD N A断片を、前もってE c o R IおよびN o t Iにて処理しておいた発現ベクター p E F 1 / V 5 - H i s に対して、ライゲーションを行い融合蛋白発現遺伝子の構築を完成した。

(2) 融合蛋白安定発現試験細胞株の樹立

60 mm カルチャーディッシュ上にて培養を行っておいたチャイニーズハムスターオバリー細胞 (C H O - K 1, A T C C C C L 6 1) に対してトランスフェクション試薬 P o l y f e c t T M (Q i a g e n, C a t. N o. 3 0 1 1 0 5) を用いて該発現ベクターのトランスフェクションを行った。なお、該細胞の培養には、D M E M / F 1 2 培地 (S i g m a C h e m i c a l C o., C a t. N o. D 8 0 6 2) に牛胎仔血清 (F B S) (J R H B i o s c i e n c e, C a t. N o. 1 2 1 0 3 - 7 8 9, L o t. N o. 9 K 2 0 8 7) を終濃度10%となるように添加した培地を使用した。48時間後、G e n e t i c i n (500 μ g/ml) を含む前述培地に処理細胞を懸濁した後、96穴マイクロプレートに 1, 10, 100 c e l l s / w e l l の割合で播種した。2週間後、陽性クローンを含むw e l l のスクリーニングを行った。すなわち、アルカリフォスファターゼ基質 (B l u e P h o s T M, K P L, C a t. N o. 5 0 - 8 8 - 0 0) を用いて培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。このアルカリフォスファターゼ活性を指標として、安定した発現を示すクローンを選別した。

【0130】

図4に示されるように、得られたクローン (C H O / s w) は細胞の増殖に伴い (図4-B)、時間経過とともに、培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性 (A l k a l i n e P h o s p h a t a s e A c t i v i t y) が上昇していることがわかる (図4-A)。

【0131】

以上のようにして樹立した融合蛋白発現細胞 (C H O / s w) は、増殖・培養時間に伴い、培養上清中に β セクレタース切断産物としてアルカリフォスファターゼを分泌した。また、分泌されたアルカリフォスファターゼの活性は、同様に分泌されたアミロイド β の産生量と相関することが明らかとなった。従って、分泌アルカリフォスファターゼの活性を測定することにより、アミロイド β の産生を検出することが可能である目的の細胞株を作製することに成功した。

【0132】

さらに、培養上清中のアミロイド β をE L I S Aにより測定したところ、アミロイド β 産生量は、アルカリフォスファターゼ活性と相関することが確認された (図4-CおよびD)。アルカリフォスファターゼ活性、およびM T Tによる細胞増殖は、後述の方法により行った。アミロイド β 1-40および1-42測定は、市販のキット (免疫生物研究所、C o d e N o. 1 7 7 1 4 及び1 7 7 1 2) を用いた。

【0133】

(3) 融合蛋白に導入された遺伝子の確認

更に、実際に、遺伝子導入が行われているかどうかの確認を行った。まず、100 mm D i s h上でコンフルエント状態に培養した遺伝子導入C H O - K 1細胞をD i g e s t i o n b u f f e r (100 mM N a C l, 25 mM E D T A, 0.5% S D S, 0.1 mg/ml プロテインキナーゼK (p r o t e i n a s e K) を含む10 mM T r i s - H C l, pH 8.0) 500 μ l に懸濁し、50℃で一夜インキュベートした。続いて、細胞溶解物をフェノールクロロホルム (1

10

20

30

40

50

：1)で抽出し、水槽を同量のイソプロパノールを添加し、1,700 x gで2分間遠心分離することによりDNAを回収した。次いで、DNAはTE緩衝液(1 mM EDTAを含むTris-HCl, pH 8.0) 0.5 mg/mlに懸濁し、60℃で完全に溶解させた。PCRは、前述調製DNAをテンプレート(2.5 µg)とし、Takara Ex Taq (Takara, Cat. No. RR001A)、および後述各プライマー0.5 µMを用いて行った。条件は、(94℃ x 30秒、60℃ x 1分、72℃ x 2分) x 30サイクルにて行った。

【0134】

融合蛋白に対するプライマーは以下の通りである。

【0135】

センス：TCTAGACCCAGGTTCCTGGGTGACAAATATC

アンチセンス：CCGGATCCCTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGT

また、βアクチンに対するプライマーは以下の通りである。

【0136】

センス：TTTGAGACCTTCAACACCC

アンチセンス：AGGAAAGGAAGGCTGGAAGA

図5-Aに示したように、本融合蛋白発現細胞株(図中Sで示す)は、目的の融合蛋白(SEAP-APPSw)の遺伝子が導入されていることが明らかとなった。対照として、遺伝子導入していないCHO細胞株(図中Hで示す)およびスウェーデン型変異を付加していない融合蛋白(SEAP-APPwt)遺伝子を導入した細胞株(図中Wで示す)を用いた。Wにおいても融合蛋白遺伝子の導入が確認された。ここで、対照の遺伝子としては、β-Actinを用いた。

【0137】

また、取得クローンが実際に目的融合蛋白が発現しているかどうかについて、ウエスタンブロッティングを用いて確認した。

【0138】

まず、100 mm Dish上でコンフルエントの状態に培養したCHO-K1細胞を細胞溶解バッファー(150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% Chaps, 10 mg/ml アプロチニン, 10 mg/ml リュウベプチンを含む50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 1 mlに懸濁し、氷上で30分間間欠的にボルテックス操作を行った。細胞溶解物は、14,000 rpmで10分、4℃遠心分離を行い、上清をウエスタンブロッティング用サンプルとした。次いで、細胞抽出液 および培養上清16 µlを、サンプル調製バッファー(10 mM EDTA, 10% SDS, 25% グリセロール, 0.1% BPB, 1% 2-メルカプトエタノールを含む0.624 M Tris-HCl, pH 6.8) 4 µlに対して混合し、13% ポリアクリルアミドゲル電気泳動(10 x 10 cm スラブゲル)にて、電気泳動を行った。泳動後、蛋白はセミドライブロッター(Trans-Blot SD, Bio Rad, Cat. No. 170-3940)を用い、ニトロセルロース膜(HybondTM-ECL, アマシャムファルマシア バイオテック, Cat. No. RPN3032D)に対してトランスファーを行った。次いで、ニトロセルロース膜を、Blotting buffer(1% BSA, 1% skim milk, 0.05% tween-20を含むPBS)中で、1時間室温でブロッティング操作を行い、APP認識抗体溶液で処理(2時間、室温)を行った。ニトロセルロース膜は洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS)で十分洗浄した後、二次抗体(Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc. Cat. No. SC-2030)および Peroxidase-conjugated anti-Rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc. Cat. No. SC-2005))に対して、1時間室温で処理を行った。

10

20

30

40

50

検出は、Chemiluminescence detection kit (Super Signal[®] q, Pierce Co., Cat. No. 34080) を用いた。なお、一次抗体は、以下のものを使用した。

【0139】

抗ヒトAPP抗体 (C末端部分認識抗体, Sigma Chemical Co., Cat. No. A-8717)、抗sAPP α 抗体 (自社作製)、抗sAPP β 抗体 (免疫生物研究所)。

【0140】

結果を図5-Bに示した。細胞溶解物のウェスタンブロッティングの結果 (図5-B左写真) より、矢印で示すように目的の位置にAPPの発現が確認された。上部のバンドは内因性APP、下部のバンドは融合蛋白を示し、スウェーデン型変異を付加した融合蛋白発現細胞株 (S) およびスウェーデン型変異を付加していない融合蛋白遺伝子導入細胞株 (W) において融合蛋白の発現が確認された。 10

【0141】

また、培養上清のウェスタンブロッティングの結果より、 α 切断産物は、いずれの培養上清においても検出されなかった (図5-B中央写真)。

【0142】

一方、 β 切断産物に関しては、融合蛋白発現細胞株 (S) においてのみ検出された (図5-B右写真)。以上の結果より、本融合蛋白発現細胞株は、蛋白レベルにおいて目的融合蛋白を発現し、我々の意図したように、 β 切断を優先的に受けて融合蛋白を細胞外に分泌していることが確認された。 20

【0143】

さらに、APPの切断により生ずるC末端領域について確認を行った。上記のように調製したウェスタンブロッティングサンプル (細胞溶解物の上清) をアセトンにより濃縮した。すなわち、ウェスタンブロッティングサンプル167 μ l に8倍量の冷アセトンを添加し、攪拌後、 -20°C にて一夜放置し、14,000 rpmで10分、 4°C 遠心分離を行い、抗ヒトAPP C末端抗体 (Sigma Chemical Co., Cat. N. A-8717) を一次抗体として検出した。

【0144】

図5-Cに示したように、融合蛋白発現細胞株 (S) は、 β 切断を優先的に受けて、細胞内にその切断産物であるC端99残基フラグメント (C99) の増加が観察された。また、同時に観察された α 切断産物であるC83は、宿主細胞においても同様に観察されることから、内因性APPのプロセッシングにより生じた分子であることが推定された。 30

【0145】

以上より、我々の作製した安定細胞株は、目的融合蛋白遺伝子が導入され、目的融合蛋白を発現し、目的としたプロセッシングを受けて、目的融合蛋白を分泌していることが確認された。また、スウェーデン型変異を入れた方が β セクレタスの基質特異性が高く、 β アミロイドの産生は5~10倍増加することが明らかとなった。

【0146】

実施例3：試験細胞を用いた化合物のスクリーニング 40

(1) アミロイド β 産生に対する影響の測定

96穴マイクロプレートに対して、実施例2で取得した細胞、すなわち融合蛋白 (SEAPP-APPsw) の遺伝子が導入されている安定細胞株を 5,000 cells/well の割合で蒔き、予め、DMSOに溶解しておいた被験物質を終濃度、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、一夜 (18-24時間)、5% CO_2 の下インキュベーター中にてインキュベートさせた。その後、培養上清50 μl を、アルカリフォスファターゼ活性測定用のマイクロプレートに移し、アルカリフォスファターゼ基質 (Blue Phos TM, KPL, Cat. No. 50-88-00) 50 μl を添加し、1時間反応させた後、反応停止液 (Blue Phos TM, KPL, Cat. No. 50-89-01) 100 μl を加え、マイクロプレートリーダー (Lab sys 50

tems Multiskan'q Multisoft)を用いて、650 nmの吸収を測定した(図6左上図及び右上図)。

【0147】

被験物質無添加における吸収に対して有意に差のつく被験物質を、アミロイドβ産生に対して影響を与える候補物質とした。

【0148】

(2) 被験物質の細胞に対する毒性の判定

上記試験細胞のマイクロプレートに対して、MTT溶液 50 μl (1 mg/ml 培養液) ずつ、各ウェルに添加し、4時間、5% CO₂インキュベーター中にて反応させた。反応後、上清を捨て、DMSO 100 μlを格ウェルに添加し、攪拌した後、マ
10
イクロプレートリーダー(Labsystems Multiskan'q Multisoft)にて、575 nmにて吸収を測定した(図6左下図及び右下図)。被験物質無添加における吸収と同程度の吸収を持つ被験物質を細胞毒性なしとした。

【0149】

図6に実施例3および4で行った結果を示した。図6左側の上下の図は、実際のマイクロプレートの写真で、上図がアルカリフォスファターゼの結果を、下図がMTTによる細胞毒性の結果を示している。プレートの1列目は、細胞を入れないブランクを、12列目は細胞を入れた時の被験物質無添加のコントロールを示す。2~11列目が、被験物質を添加したときの例となっている。一方、右側の上下の図は、吸光度より求めたコントロールに対する%値を数値で表したものであって、左側の2~11列目に相当するものを示して
20
いる。

【0150】

この結果より、6D、10G、11Bにおいてアルカリフォスファターゼ活性の低下が観察された。また、5G、8C、8D、10G、11Bにおいて細胞毒性が認められた。これらの結果を総合した結果、アミロイドβ産生に対して影響を与え、かつ、細胞毒性の少ない化合物として、6Dの化合物が選別された。

【0151】

【発明の効果】

本発明によれば、アミロイドβ産生を効率的にモニターできる材料が提供される。また、
30
該材料を利用した融合蛋白を細胞に発現させることにより、アミロイドβ産生に影響を与える物質を効率的にスクリーニングすることが可能になる。また、アルツハイマー治療薬あるいは予防薬のスクリーニングも有効に行うことが可能となり、治療薬の開発という面からも有用である。さらに、該スクリーニング系から見出された物質は、アルツハイマー病のモデル動物の作製または作用機序の解明にも有用である。

【0152】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> AMYLOIDOGENIC PROCESSING OF AP

<130> 32202JP

10

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 695

<212> PRT

<213> human

<400> 1

30

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu
1 5

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn
20 25

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu
35 40

40

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser
50 55

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys
65 70

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn
85

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys
100 105

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His
130 135

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val
145 150

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly
165

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val
180 185

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala

10

20

30

40

195

200

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr
210 215

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu
225 230

10

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu
245

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala
260 265

20

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
275 280

Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro
290 295

Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His
305 310

30

Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu
325

Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala
340 345

40

Lys	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	His	Phe	Gln	
		355					360		
Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	Arg	Gln	Gln	
	370					375			
Arg	Val	Glu	Ala	Met	Leu	Asn	Asp	Arg	10
385					390				
Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	
				405					
Asn	Met	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg	Ala	
	420			425		430			20
Thr	Leu	Lys	His	Phe	Glu	His	Val	Arg	
		435					440		
Ala	Gln	Ile	Arg	Ser	Gln	Val	Met	Thr	
	450					455			
									30
Arg	Met	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	
465					470				
Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Glu	Val	Asp	Glu	
				485					
Tyr	Ser	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Asn	Met	40
			500					505	

Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser
515 520

Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu
530 535

Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser
545 550

Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro
565

Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
580 585

Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg
595 600

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
610 615

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
625 630

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys
645

His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala

10

20

30

40

660

6 6 5

His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly
675 680

P h e P h e G l u G l n M e t G l n A s n
690 695

10

$$\langle 210 \rangle \quad 2$$
 $\langle 211 \rangle \quad 42$

<2 1 2> PRT

<2 1 3> Artificial Sequence

20

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequ

 $\langle 400 \rangle \quad 2$

Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

30

Gln Trp Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
35 40

40

 $\langle 210 \rangle \quad 3$

<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequ

10

<400> 3
Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

Gln Lys Ala Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

20

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 4
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequ

<400> 4
Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

40

Gln Lys Glu Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
35 40

10

<210> 5
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 5

Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

Gln Lys Lys Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

30

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
35 40

<210> 6

40

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 6

10

Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

Gln Lys Pro Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

20

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 7

Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

40

Gln Trp Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
35 40

10

<210> 8
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
(223) Description of Artificial Sequence:peptide

20

<400> 8
Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

Gln Lys Ala Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

30

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
35 40

<210> 9
<211> 42
<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 9

Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

10

Gln Lys Glu Val Phe Phe Ala Glu Asp
20 25

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
35 40

20

<210> 10

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 10

Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

40

Gln Lys Lys Val Phe Phe Ala Glu Asp

20

25

I l e I l e G l y L e u M e t V a l G l y G l y V a l
35 40

<210> 11

10

<211> 42

<212> PRT

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220>

<223> D e s c r i p t i o n o f A r t i f i c i a l S e q u

20

<400> 11

A s n L e u A s p A l a G l u P h e A r g H i s A s p
1 5

G l n L y s P r o V a l P h e P h e A l a G l u A s p
20 25

30

I l e I l e G l y L e u M e t V a l G l y G l y V a l
35 40

<210> 12

<211> 626

<212> PRT

40

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 12

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly
 1 5

10

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn
 20 25

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys
 35 40

20

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 50 55

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys
 65 70

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
 85

30

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
 100 105

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
 115 120

40

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln
130 135

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala
145 150

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln
165

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp
180 185

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln
195 200 205

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu
210 215

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu
225 230

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn
245

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp
260 265

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His
275 280

10

20

30

40

435

440

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe
450 455

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

10

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

20

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
515 520

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
530 535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

30

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

40

50

55

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys
65 70

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
85

10

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
100 105

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
115 120

20

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
130 135

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala
145 150

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln
165

30

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp
180 185

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln
195 200

40

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu
210 215

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu
225 230

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn
245

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp
260 265

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His
275 280 285

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg
290 295

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu
305 310

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly
325

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu
340 345

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu
355 360

10

20

30

40

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His
370 375

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly
385 390

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu
405

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp
420 425

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr
435 440

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe
450 455

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu

10

20

30

40

515

520

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
530 535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

10

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

20

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
595 600

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr
610 615

Gln Asn
625

30

<210> 14

<211> 626

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 14

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly
 1 5

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn
 20 25

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys
 35 40

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 50 55

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys
 65 70

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
 85

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
 100 105

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
 115 120

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln

10

20

30

40

130

135

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala
145 150

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln
165

10

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp
180 185

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln
195 200

20

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
210 215

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu
225 230

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn
245

30

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp
260 265

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His
275 280

40

Gly	Asp	Met	Lys	Tyr	Glu	Ile	His	Arg	
	290					295			
Leu	Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	
305					310				
Arg	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	10
				325					
His	Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ala	Leu	
			340					345	
Asp	Ala	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Gln	Leu	
	355		360			365			20
Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	
	370					375			
Pro	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	
385					390				30
Asp	Arg	Lys	Ala	Tyr	Thr	Val	Leu	Leu	
				405					
Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	
			420					425	
Ser	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gln	Gln	Ser	Ala	40
		435					440		

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe
450 455

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
515 520

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
530 535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu

10

20

30

40

595

600

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr
610 615

Gln Asn
625

10

<210> 15
<211> 626
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequ

<400> 15
Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5

30

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn
20 25

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys
35 40

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu
50 55

40

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys
65 70

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
85

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
100 105

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
115 120

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
130 135

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala
145 150

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln
165

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp
180 185

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln
195 200

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu

10

20

30

40

210

215

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu
225 230

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn
245

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp
260 265

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His
275 280

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser
290 295

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu
305 310

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly
325

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu
340 345

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu
355 360

10

20

30

40

Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	
	370					375			
Pro	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	
385					390				
Asp	Arg	Lys	Ala	Tyr	Thr	Val	Leu	Leu	10
			405						
Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	
			420					425	
Ser	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gln	Gln	Ser	Ala	
	435		440			445			20
His	Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Phe	
	450					455			
Leu	Val	His	Gly	Val	Gln	Glu	Gln	Thr	
465					470				30
Phe	Ala	Ala	Cys	Leu	Glu	Pro	Tyr	Thr	
			485						
Ala	Gly	Thr	Thr	Asp	Ala	Ala	His	Pro	
			500					505	
Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	40
		515					520		

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
530 535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
595 600

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr
610 615

Gln Asn
625

<210> 16

<211> 626

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

30

40

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 16

Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly
1				5				

Gly	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asn
			20					25

10

Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Lys
		35					40	

Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe	Leu
50			55		60			

20

Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys
65					70			

Gly	Pro	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Met	Asp
				85				

30

Ser	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Lys	His
			100					105

Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys
		115					120	

Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Gln
	130					135		

40

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala
145 150

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln
165

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp
180 185

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln
195 200

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
210 215

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu
225 230

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn
245

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp
260 265

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His
275 280

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg

10

20

30

40

290

295

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu
305 310

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly
325

10

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu
340 345

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu
355 360

20

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr
370 375

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly
385 390

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu
405

30

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp
420 425

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala
435 440

40

H i s	A l a	G l y	G l u	A s p	V a l	A l a	V a l	P h e	
	4 5 0					4 5 5			
L e u	V a l	H i s	G l y	V a l	G l n	G l u	G l n	T h r	
4 6 5					4 7 0				
P h e	A l a	A l a	C y s	L e u	G l u	P r o	T y r	T h r	10
				4 8 5					
A l a	G l y	T h r	T h r	A s p	A l a	A l a	H i s	P r o	
			5 0 0					5 0 5	
G l y	L e u	T h r	A s n	I l e	L y s	T h r	G l u	G l u	
	5 1 5		5 2 0			5 2 5			20
A l a	G l u	P h e	A r g	H i s	A s p	S e r	G l y	T y r	
	5 3 0					5 3 5			
V a l	P h e	P h e	A l a	G l u	A s p	V a l	G l y	S e r	
5 4 5					5 5 0				30
L e u	M e t	V a l	G l y	G l y	V a l	V a l	I l e	A l a	
				5 6 5					
V a l	M e t	L e u	L y s	L y s	L y s	G l n	T y r	T h r	
			5 8 0					5 8 5	
G l u	V a l	A s p	A l a	A l a	V a l	T h r	P r o	G l u	40
		5 9 5					6 0 0		

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr
610 615

Gln Asn
625

10

<210> 17
<211> 626
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequ

<400> 17

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn
20 25

30

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys
35 40

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu
50 55

40

Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	
65					70				
Gly	Pro	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	
				85					
Ser	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Lys	His	10
			100					105	
Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	
		115					120		
Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Gln	
130			135		140				20
Glu	Val	Ile	Ser	Val	Met	Asn	Arg	Ala	
145					150				
Gly	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	
				165					
									30
Tyr	Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	
			180					185	
Ala	Ser	Ala	Arg	Gln	Glu	Gly	Cys	Gln	
		195					200		
Ser	Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	40
	210					215			

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu
225 230

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn
245

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp
260 265

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His
275 280

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser
290 295

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu
305 310

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly
325

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu
340 345

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu
355 360

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His

10

20

30

40

370

375

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly
385 390

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu
405

10

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp
420 425

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala
435 440

20

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His
450 455

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

30

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu
515 520

40

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
530 535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu
595 600 605

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr
610 615

Gln Asn
625

<210> 18

<211> 626

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

10

20

30

40

<400> 18

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly
 1 5

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn
 20 25

10

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys
 35 40

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu
 50 55

20

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
 65 70

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
 85

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
 100 105

30

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
 115 120

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln
 130 135

40

10

20

30

40

40

40

40

40

40

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg
290 295

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu
305 310

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly
325

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu
340 345

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu
355 360

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr
370 375

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly
385 390

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu
405

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp
420 425

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala
435 440

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe

10

20

30

40

450

455

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

10

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu
515 520

20

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Ala
530 535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

30

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu
595 600

40

10

20

30

40

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys

65

70

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
85

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
100 105

10

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
115 120

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln
130 135

20

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
145 150

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln
165

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp
180 185

30

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln
195 200

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu
210 215

40

Phe	Arg	Met	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	
225					230				
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Lys	Asn	
				245					
Lys	Arg	Gln	Gly	Ala	Arg	Tyr	Val	Trp	10
			260					265	
Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	His	
		275					280		
Gly	Asp	Met	Lys	Tyr	Glu	Ile	His	Arg	
290			295		300				20
Leu	Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	
305					310				
Arg	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	
				325					
His	Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ala	Leu	30
			340					345	
Asp	Ala	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Gln	Leu	
		355					360		
Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	40
	370					375			

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly
385 390

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu
405

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp
420 425

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala
435 440

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His
450 455

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu
515 520

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr

10

20

30

40

530

535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

10

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu
595 600

20

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
610 615

Gln Asn
625

30

<210> 20

<211> 626

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ

40

<400> 20

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly
 1 5

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn
 20 25

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys
 35 40

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu
 50 55

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
 65 70

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
 85

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
 100 105

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
 115 120

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln
 130 135

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala

10

20

30

40

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg
290 295

40

Leu	Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	
305					310				
Arg	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	
				325					
His	Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ala	Leu	10
			340					345	
Asp	Ala	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Gln	Leu	
		355					360		
Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	
370			375		380				20
Pro	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	
385					390				
Asp	Arg	Lys	Ala	Tyr	Thr	Val	Leu	Leu	
				405					
Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	30
			420					425	
Ser	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gln	Gln	Ser	Ala	
		435					440		
His	Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Phe	40
	450					455			

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu
515 520

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Lys
530 535

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu
595 600

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr

10

20

30

40

6 1 0

6 1 5

G l n A s n

6 2 5

<2 1 0> 2 1

10

<2 1 1> 6 2 6

<2 1 2> P R T

<2 1 3> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<2 2 0>

<2 2 3> D e s c r i p t i o n o f A r t i f i c i a l S e q u

20

<400> 21

M e t L e u L e u L e u L e u L e u L e u L e u G l y

1

5

G l y I l e I l e P r o V a l G l u G l u G l u A s n

2 0

2 5

30

A l a A l a G l u A l a L e u G l y A l a A l a L y s

3 5

4 0

A l a A l a L y s A s n L e u I l e I l e P h e L e u

5 0

5 5

T h r V a l T h r A l a A l a A r g I l e L e u L y s

6 5

7 0

40

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp
85

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
100 105

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys
115 120

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln
130 135

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
145 150

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln
165

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp
180 185

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln
195 200

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu
210 215

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu

10

20

30

40

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His
370 375

40

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly
385 390

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu
405

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp
420 425

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala
435 440

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe
450 455 460

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr
465 470

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr
485

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro
500 505

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu
515 520

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
530 535

10

20

30

40

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
545 550

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
565

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr
580 585

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu
595 600

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
610 615

Gln Asn
625

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、A P P の構造の模式図と A P P のプロセッシングを示した図である。

【図 2】図 2 は、A P P 6 9 5 のアミノ酸配列を示す図である。

【図 3】図 3 は、A P P における α セクレテース切断部位（17 位）のアミノ酸置換における β セクレテース切断に与える影響を示したウエスタンブロッティングの図である。

A は、細胞溶解後、8 % S D S - P A G E 電気泳動を行い、ウエスタンブロッティングを行った結果を示す図である。エピトークタグ B E 1 1 に対するモノクローナル抗体で A P P 全長を検出した。

B は、培養上清を A と同様に電気泳動を行った後、ウエスタンブロッティングを行った結果を示す図である。 α セクレテースおよび β セクレテース切断部位に挟まれた部分のアミノ酸を認識するモノクローナル抗体（A n t i - s A P P α ）を用いて検出を行った。

C は、培養上清を、B と同様に電気泳動を行った後、ウエスタンブロッティングを行った結果を示す図である。A P P N 末端側 5 9 6 位までを認識する抗体（A n t i - s A P P β ）を用いて検出を行った。

D は、抗体認識部分を模式図で示した図である。

【図 4】図 4 における A は、S E A P - A P P s w 安定発現 C H O K 1 細胞株（C H O / S W）の培養上清中のアルカリホスファターゼ活性を示す図である。

図 4 における B は、S E A P - A P P s w 安定発現 C H O K 1 細胞株（C H O / S W）の M T T アッセイによる細胞の増殖を示す図である。

図 4 における C 及び D は、培養上清中のアミロイド β の産生量を示す図である。

【図 5】図 5 の A は、選択されたクローンにおいて、本発明の融合蛋白をコードする遺伝子が細胞内に導入されているかどうかを P C R で確認した図である。

図 5 の B は、選択されたクローンにおいて、融合蛋白が実際に合成され、また、目的の部分のみで切断されて培養上清中に分泌されているかどうかをウエスタンブロッティングで確認した図である。

図 5 の C は、選択されたクローンにおいて、融合蛋白が実際に合成され、また目的の部分で切断されているかどうかを調べるために、細胞内 C 9 9 をウエスタンブロッティングで確認した図である。

【図 6】図 6 は、本発明のスクリーニング結果の一例を示す図である。

図 6 の左上図は、培養上清中のアルカリホスファターゼ活性を 6 5 0 n m で比色測定した結果を示している。

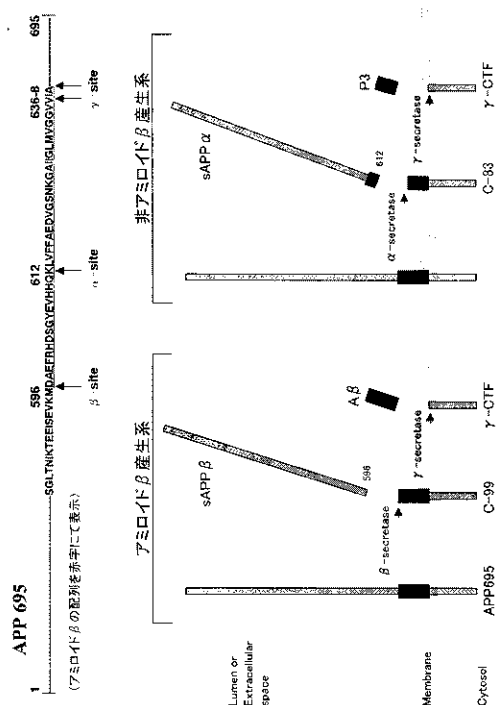
図 6 の左下図は、M T T アッセイにおける細胞数の測定結果を示す図である。

10

図 6 の右上図は、アルカリホスファターゼ活性を、被験物質無添加の場合を 1 0 0 として、数値化した結果を示す図である。

図 6 の右下図は、M T T アッセイにおける細胞数を、被験物質無添加の場合を 1 0 0 として、数値化した結果を示す図である。

【図 1】



【図 2】

APP695 のアミノ酸配列

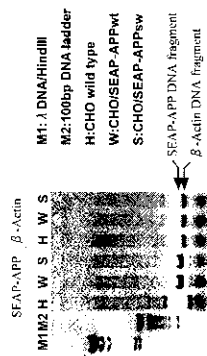
```

M L P G L A L L L L A A W T A R A L E V P T D G S A G L L A
E P Q I A M F C G R L S M H M X V Q S G K N D S D P S G T X
T C I D T K E G I L Q Y C Q E V Y P E L Q J T X V V E A N Q
P V T I Q S W C K R G R K K Q E K T H P H F Y I P Y R C L V G
E F V S D A L L Y P D K C K F L H Q E R M D V C E T H L H W
H T V A A E T C S E K S T N L H D Y G M L L P C G I D K F R
G V E F Y C C P L A E E S D S V D S A D A E H D S D V W W
G G A D T D Y A D G S E D K V Y E V A E E E E V A E V E E
E A D D D E D D E D G D E V E E E A E E P Y E E A T E R T T
S I A T T T T T T T E S Y E E V Y R Y P T T A A S T P D A Y
D K Y L E T P G D E N E H A H F Q K A K E R L E A K H R E R
M S Q Y M R E W E E A E R Q A X N L P K A D K A V I Q H F
Q E K Y E S L E Q E A A N E R Q Q L V E T I I N A R V E A M L
N D R R R L A L E N Y I T A L Q A V P P R P R H V P N M L K
K Y Y R A E Q K D R Q H T L K H F E H V R M V D P K K A A Q
I R S Q Y M T H L R V I Y E N M N Q S L S L L Y S V P A V A
E E I Q D R V D E L L Q K E Q X Y S D D V L A X M I S E P R
I S Y G S D A L M P S L T E T K T T V E L L P V S G F F S L
D D L Q P W I I S F G A D S V P A N T E N E V E P V D A R P A
A D R G L T T R P G S G L T N I K T E E I S E V E M D A E F
R H D S G Y E V H H Q K Q V F F A E D S G S S A C A I I G L
M V G G V F I A T V I V I T L V M L K K K Q Y F S I H N G V
V E V D A A V T P E E R H L S K M Q Q N G Y E S P T Y K F F
E Q M Q N *

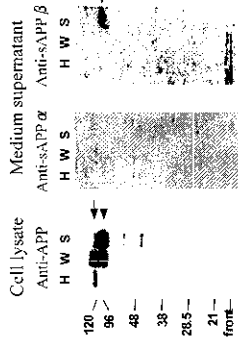
```

(アミロイドβ (1-42) 部分を下線、β-サイトを太字、αサイトを太斜体にて表示。)

(A) PCR of genomic DNA



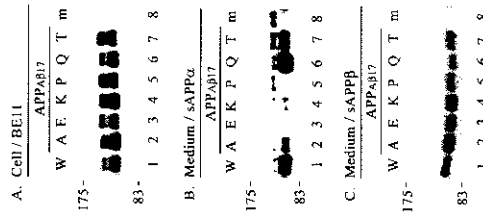
(B) Western blotting



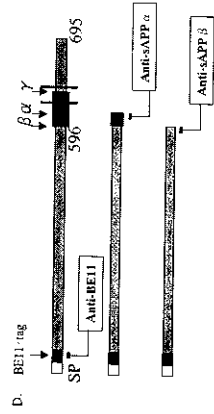
(C) Detection of C99



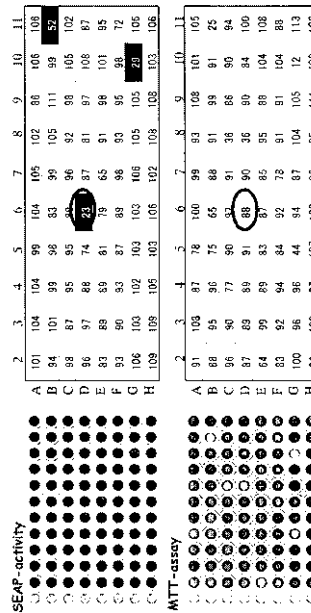
【図 5】



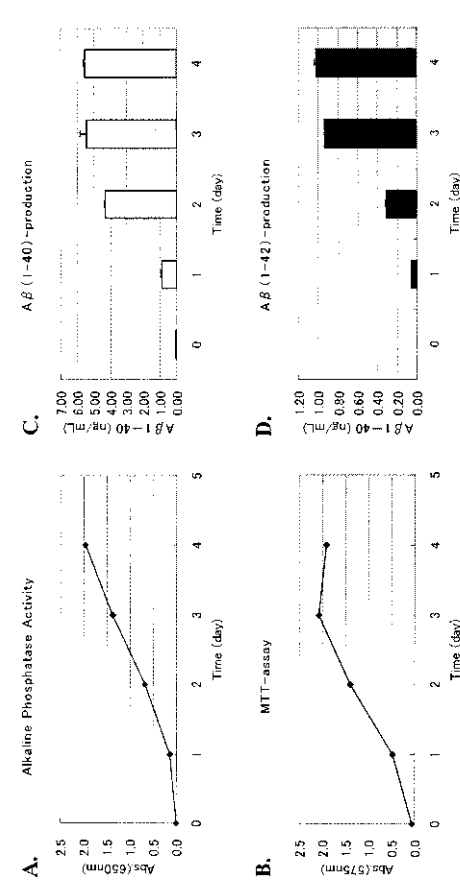
【図 3】



【図 6】



【図 4】



(CHO/sw 2500cells/well,

Medium:10%FBS-DMEM/F12)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 N 5/00	A

(74)代理人 100105821
弁理士 藤井 淳

(74)代理人 100099911
弁理士 関 仁士

(74)代理人 100108084
弁理士 中野 睦子

(72)発明者 シマブクアルフレッド
徳島県徳島市川内町富吉 7-5

(72)発明者 萩野 晃一
徳島県鳴門市無養町南浜字東浜 1 9 7-3

(72)発明者 瀧 孝雄
徳島県板野郡北島町江尻字山王宮 8-4

(72)発明者 辛 龍雲
宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘 2-3 6-2

(72)発明者 北本 哲之
宮城県仙台市青葉区八幡 6-2-1 6-7 0 3号

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA11 BA80 CA04 CA07 CA20 DA02 EA04 FA10
FA18 GA13 GA18 GA25 GA27 HA11
4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ33 QQ36 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QR77
QR80 QS36 QX02 QX10
4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA05 BA16
BA25 BB01 CA24 CA31 CA46
4C084 AA17 MA01 NA14 ZA162
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA89 EA50 FA74