

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 16 日(16.08.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/108548 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/053585
- (22) 国際出願日: 2012 年 2 月 9 日(09.02.2012)
- (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 2011-026902 2011 年 2 月 10 日(10.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 住友化学株式会社 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1048260 東京都中央区新川二丁目 2 7 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 高橋 康彦 (TAKAHASHI, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目 1 番 9 8 号住友化学株式会社内 Osaka (JP). 片岡 正樹(KATAOKA, Masaki) [JP/JP]; 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目 1 番 9 8 号住友化学株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 中山 亨, 外(NAKAYAMA, Tohru et al.); 〒5418550 大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番

3 3 号住友化学知的財産センター株式会社内 Osaka (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: TRANSFORMANT HAVING Gm1 GENE, GPCR GENE, AND CRMP2 GENE INTRODUCED THEREIN

(54) 発明の名称: Gm 1 遺伝子と GPCR 遺伝子と CRMP 2 遺伝子とが導入された形質転換体

(57) Abstract: Provided are: a transformant having a Gm1 gene, a GPCR gene, and a CRMP2 gene introduced therein; a method using the transformant to screen for modulators of Gm1 protein-mediated signal transduction; and the like.

(57) 要約: 本発明は、Gm 1 遺伝子と GPCR 遺伝子と CRMP 2 遺伝子とが導入された形質転換体、及びそれを利用した Gm 1 タンパク質を介したシグナル伝達調節物質のスクリーニング方法等を提供する。



WO 2012/108548 A1

明細書

G m 1 遺伝子と G P C R 遺伝子と C R M P 2 遺伝子とが導入された形質転換体

技術分野

- 5 本発明は、Gm1遺伝子とG-タンパク質共役型受容体遺伝子とCRMP2遺伝子とが導入された形質転換体並びにその利用に関する。

背景技術

- 10 Gm1タンパク質は、G-タンパク質 α サブユニットの一種であり、G-タンパク質共役型受容体（GPCR）刺激による細胞内シグナル伝達に関与していることが知られている。Gm1遺伝子は、Golf遺伝子のスプライシングバリエーションであり、第1エクソン領域のみ固有の塩基配列を有しており、第2エクソン領域以降はGolf遺伝子と塩基配列を共有している。Gm1タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIデータベースにおいて登録番号NM__182978で示される。Gm1タンパク質は、guanine nucleotide
15 binding protein (G protein)、alpha activating activity polypeptide、olfactory type (GNAL)、又はtranscript variant 1と呼ばれることもあり、他のGタンパク質と比較してN末端領域が約80アミノ酸長い特徴的な構造を有している（例えば、US2005-0260595号公報参照）。

- 20 G-タンパク質共役型受容体（GPCR）は、7回膜貫通型の受容体であり、G-タンパク質と共役することが知られている（例えば、蛋白質核酸酵素 46: 1764-1771 (2001) 参照）。

- CRMP2タンパク質は、コラプシン応答メディエータタンパク質2（Collapsin Response Mediator Protein 2, CRMP2）であり、神経ガイダンス因子であるセマフォリンの情報を媒介する因子として同定されたタンパク質である（例えば、Nature,
25 376: 509-514 (1995)参照）。CRMP2タンパク質は、チューブリン、Numb、Sra-1、TrkB等の分子と直接的又は間接的に結合し、これらの分子を軸索先端へ輸送することにより軸索を伸長させる機能を有することが知られている（Nat. Cell Biol., 4: 583-591 (2002); Nat. Cell Biol., 5: 819-826 (2003); Nat. Rev. Neurosci.,

8: 194-205 (2007); Developmental Cell, 16: 675-686 (2009))。CRMP2タンパク質は、cdk5、GSK3 β 、Rhoキナーゼ等のキナーゼによりリン酸化されることにより、その活性が調節されること、具体的には、非リン酸化型が活性を有し、キナーゼによりリン酸化されることにより不活化されること、が知られている (Cell, 120: 137-149 (2005); Mol. Cell. Biol., 25: 9973-9984 (2005))。非リン酸化型変異CRMP2遺伝子を神経細胞に導入すると軸索先端の退縮が損なわれることや、神経細胞でCRMP2タンパク質の生物学的機能を阻害すると軸索の伸長が阻害されること等も報告されている (Cell, 120: 137-149 (2005); J. Biol. Chem., 275: 23973-23980 (2000))。神経損傷後にCRMP2タンパク質を過剰発現させると神経軸索再生が促進されること (例えば、J. Neurochem., 86: 1042-1050 (2003)) や、CRMP2タンパク質の変異が統合失調症のリスク要因になっていること (例えば、Biol Psychiatry., 53: 571-576 (2003)) 等も報告されている。

発明の開示

15 CRMP2タンパク質を介したシグナル伝達異常に起因すると思われる疾患、例えば、アルツハイマー病、統合失調症及び軸索損傷等のような疾患症状を改善させるために有用な、知識の蓄積及び技術の開発が急務であり、これに関連する試験ツール等の開発が期待されている。

20 本発明は、Gm1タンパク質の生物学的機能の活性化によりCRMP2タンパク質のリン酸化が抑制される、即ち、CRMP2タンパク質の生物学的機能が活性化される、との知見に基づく。

即ち、本発明は

1. 下記遺伝子 (1)、(2) 及び (3) が宿主細胞内に導入された形質転換体 (以下、本発明形質転換体と記することもある。) :

25 (1) Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子、

(2) G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子、及び

(3) CRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子 ;

2. 前記外来遺伝子が、前記タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するプラスミドの形態である核酸である前項1記載の形質転換体；

3. 前記遺伝子(1)、(2)及び(3)にコードされるタンパク質をいずれもその細胞内で共発現している前項1又は2記載の形質転換体；

5 4. (a) 被験物質と、前項1乃至3のいずれかに記載の形質転換体とを接触させる第一工程と、

(b) 第一工程後の形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと関連する指標値を測定する第二工程と、

10 (c) 第二工程で測定されたリン酸化状態又はそれと関連する指標値を、対照と比較して、前記形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと関連する指標値を変動させる被験物質を選択する第三工程と

を含む、Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質のスクリーニング方法（以下、本発明スクリーニング方法と記すこともある。）；

15 5. 第三工程における対照が、被験物質を接触させていない前項1乃至3のいずれかに記載の形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと関連する指標値である前項4記載のスクリーニング方法；

6. 前項4又は5記載のスクリーニング方法により得られるGm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質；及び

20 7. 前項6記載のGm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質を有効成分として含有する、CRMP2タンパク質を介したシグナル伝達異常に起因する疾患の治療又は予防剤（以下、本発明薬剤と記すこともある。）；

等を提供するものである。

本発明により、Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質のスクリーニング方法及びそれに利用される形質転換体を含む試験ツール等を提供することが可能となる

25 。

図面の簡単な説明

図1は、2次元電気泳動サンプルの抗CRMP2抗体を用いたウェスタンブロットの結

果を示す図である。上段図は対照（DMSO）での結果、下段図は被験物質として RS67333を用いた結果である。アルカリ性側に位置するスポット No. 1 は非リン酸化型CRMP2タンパク質のスポットであり、それより酸性側に位置するスポット No. 2 から No. 6 は、リン酸化型CRMP2タンパク質のスポットである。より酸性側に位置するスポットほど、つまり No. 6 側に位置するスポットほどリン酸化の程度が高い CRMP2 タンパク質のスポットである。

図 2 は、図 1 に示すウエスタンブロットの各スポットのシグナル強度を定量した結果を示す図である。非リン酸化型CRMP2タンパク質のスポット（No. 1）のシグナル強度を「1」とした時の、各リン酸化型CRMP2タンパク質のスポットのシグナル強度を示す。黒棒グラフは対照（DMSO）での結果、白棒グラフは被験物質として RS67333 を用いた結果である。

図 3 は、図 2 に示す各スポットのシグナル強度を、対照（溶媒）と被験物質との間で比較した結果を示す図である。黒棒グラフは対照（DMSO）での結果、白棒グラフは被験物質として RS67333 を用いた結果である。対照である DMSO 溶媒のみを接触させた細胞におけるそれぞれのスポットのシグナル強度の値を 100% とした場合の、RS67333 を接触させた細胞におけるそれぞれのスポットのシグナル強度の相対値（パーセンテージ）を示す。

発明を実施するための形態

本明細書において、DNA の調製やプラスミドの調製等の遺伝子工学的な手法、タンパク質の抽出やウエスタンブロッティング等のタンパク質工学的な手法は、特に明記しない限り、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1982))、新生化学実験講座（日本生化学会編；東京化学同人）等の実験書に記載される方法又はそれに準じた方法により行うことができる。

本発明における「Gm1 タンパク質」とは、背景技術に記載されるように、G-タンパク質共役型受容体（GPCR）刺激による細胞内シグナル伝達に関与していることが知ら

れている、Gタンパク質 α サブユニットの一種である。Gm1タンパク質は、例えば、US2005-0260595号公報等に記載された公知なタンパク質である。

Gm1タンパク質が有するアミノ酸配列としては、例えば、US2005-0260595号公報に記載される配列番号1、25又は26で示されるアミノ酸配列を挙げることができ、
5 当該配列番号1で示されるアミノ酸配列は、NCBIデータベースにおいて登録NM_182978で示される。Gm1タンパク質は、guanine nucleotide binding protein (G protein)、alpha activating activity polypeptide、又はolfactory type (GNAL)、transcript variant 1と呼ばれることもあり、他のGタンパク質と比較してN末端領域が約80アミノ酸長い特徴的な構造を有している。

10 Gm1遺伝子は、Golf遺伝子のスプライシングバリエーションであり、第1エクソン領域のみ固有の塩基配列を有しており、第2エクソン領域以降はGolf遺伝子と塩基配列を共有している。Gm1タンパク質が有するアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、例えば、US2005-0260595号公報に記載される配列番号2、27又は28で示される塩基配列を挙げることができる。

15 US2005-0260595号公報において配列番号1で示されるアミノ酸配列を配列番号1に、US2005-0260595号公報において配列番号2で示される塩基配列を配列番号2に示す。

本発明における「Gm1タンパク質」は、当該タンパク質の生物学的機能を維持する限り、その一部からなるものを含む。例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列は、
20 Gタンパク質 α サブユニット間で保存されている「GTP結合部位」及び「GTPase活性化部位」のアミノ酸配列と配列同一性が高いアミノ酸配列部分を有する。これらの部分は、配列番号1で示されるアミノ酸配列におけるアミノ酸番号126～133、287～292、353～359、428～435の各領域である。これらのアミノ酸領域は、既にGタンパク質 α サブユニットとして同定されている「Gs」及び「Golf」における「GTP結合部位」
25 及び「GTPase活性化部位」のアミノ酸配列（NATURE, 349: 117-127 (1991)）と一致している。また、配列番号1で示されるアミノ酸配列は、Gタンパク質 α サブユニット間で特にGsファミリーに属する「Gs」及び「Golf」で高く保存されている特徴的配列と同じ配列（配列番号1で示されるアミノ酸番号119～126）を有し、しかもGタン

パク質 α サブユニット間で保存されている α ヘリックス構造をとりうる配列である。

Gm1タンパク質の生物学的機能を喪失すること無く、Gm1タンパク質が有する如何なるアミノ酸残基を何個置換、欠失又は付加できるかの指標は、US2005-0260595号公報に記載された方法等により見出すことができる。前記生物学的機能を喪失しない改変は、例えば、既に同定されている各種のGタンパク質 α サブユニットのアミノ酸配列との配列同一性が低い部分について行えばよい。

本発明における「CRMP2タンパク質」とは、背景技術に記載されるように、コラプシン応答メディエータタンパク質2 (Collapsin Response Mediator Protein 2, CRMP2) であり、神経ガイダンス因子であるセマフォリンの情報を媒介する因子として同定されたタンパク質である。CRMP2タンパク質は、例えば、Nature, 376: 509-514 (1995)等に記載された公知なタンパク質である。

CRMP2タンパク質が有するアミノ酸配列、及び、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列としては、例えば、前記文献に記載されるアミノ酸配列、及び、塩基配列を挙げるができる。CRMP2タンパク質のアミノ酸配列は、NCBIデータベースにおいて登録番号NP_001377で示される。CRMP2タンパク質は、dihydropyrimidinase-like 2、dihydropyrimidinase-like 2、又はDPYSL2と呼ばれることもある。

本発明における「G-タンパク質共役型受容体タンパク質」(GPCR)とは、7回膜貫通型の受容体であり、G-タンパク質と共役することが知られている。当該G-タンパク質共役型受容体タンパク質として、例えば、Computational Biology Research Center (CBRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)が提供するSevens database (Methods Mol. Biol., 577: 41-54 (2009))のホームページ (<http://sevens.cbrc.jp/index.php>)に登録されている受容体を挙げることができ、具体的には、ドーパミン受容体、セロトニン受容体及びヒスタミン受容体等を挙げるができる。これらGPCRが有するアミノ酸配列、及び、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列は、例えば、NCBIデータベースから入手することができる。より具体的には、ドーパミンD1受容体の場合には、例えば、NCBIデータ

ベースにおいて登録番号「NP_000785.1」で示されるアミノ酸配列、及びNCBIデータベースにおいて登録番号「NM_000794.3」で示される塩基配列等を挙げることができ、セロトニン4受容体の場合には、例えば、NCBIデータベースにおいて登録番号「NP_001035259.1」で示されるアミノ酸配列、及びNCBIデータベースにおいて登録番号「NM_001040169.2」で示される塩基配列等を挙げることができ、ヒスタミンH1受容体の場合には、例えば、NCBIデータベースにおいて登録番号「NP_001091683.1」で示されるアミノ酸配列、及びNCBIデータベースにおいて登録番号「NM_001098213.1」で示される塩基配列を挙げることができる。

10 本発明形質転換体は、下記遺伝子（1）、（2）及び（3）が宿主細胞内に導入されて得られる：

- （1）Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子、
- （2）G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子、及び

15 （2）CRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子。

本発明形質転換体の宿主細胞としては、公知のいかなる宿主細胞でも用いることができ、例えば、大腸菌（例えば、K12等）、バチルス属細菌（例えば、MI114等）等の細菌、酵母（例えば、AH22等）、昆虫細胞（例えば、Sf細胞等）、動物細胞（例えば、COS7細胞等）等を挙げることができる。なかでも、哺乳動物由来の培養細胞（例えば、COS7細胞、CHO細胞、HEK293細胞、Hela細胞、PC12細胞等）を好ましく挙げることができる。

本発明形質転換体は、このような宿主細胞に対して、Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するプラスミドの形態である核酸、及び、G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するプラスミドの形態である核酸、及び、CRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するプラスミドの形態である核酸、の全てを外来的に導入する人為的操作を施

すことにより作製することができる。本発明形質転換体は、Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列、G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列及びCRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列のうち、2つの塩基配列を含有するプラスミドの形態である核酸と、残る1つの塩基配列を含有するプラスミドの形態である核酸とを宿主細胞に外来的に導入する人為的操作を施すことにより作製することもできる。本発明形質転換体は、Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列、G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列及びCRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全てを含有するプラスミドの形態である核酸を宿主細胞に外来的に導入する人為的操作を施すことにより作製することもできる。

前記人為的操作としては、用いられる宿主細胞に応じた通常の遺伝子工学的手法を利用すればよい。具体的には例えば、市販のトランスフェクション試薬を用いて、当該試薬に添付された説明書に記載される方法に従い行う方法を挙げることができる。また、外来遺伝子としてプラスミドの形態である核酸を利用する場合には、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法等を挙げることができる。

ここで「プラスミド」としては、Gm1タンパク質、G-タンパク質共役型受容体タンパク質及びCRMP2タンパク質をいずれも宿主細胞内で共発現させることが可能なプラスミドを挙げることができる。このようなプラスミドは、通常の遺伝子工学的手法に従い、Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する核酸、G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する核酸、及び、CRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する核酸、をそれぞれ、公知の発現プラスミドのプロモーター下流の発現可能な位置に連結することにより作製することができる。

ここで「発現プラスミド」としては、例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合には、pBR322、pUC12、pUC119、pBluescript等、バチルス属細菌を宿主細胞とする場合には、pUB110、pC194等、酵母を宿主細胞とする場合には、Yip5、Yep24等、昆虫細胞を宿

主細胞とする場合には、AcNPV等、動物細胞を宿主細胞とする場合には、pUC18、pcDNA3.1等の公知のプラスミドを挙げることができる。

5 本発明形質転換体における、Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子、G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子及びCRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子の宿主細胞内での保持は、一過的に保持されたものであってもよいし、また安定的に保持させたものであってもよい。これら外来遺伝子が安定的に保持された形質転換体は、当該外来遺伝子と同時に宿主細胞内に導入された薬剤耐性マーカー等の選択マーカー（例えば、発現プラスミドに含有された薬剤耐性マーカー等）を指標にして選択すればよい。

15 本発明形質転換体の細胞内で、Gm1タンパク質、G-タンパク質共役型受容体タンパク質及びCRMP2タンパク質の3種類のタンパク質を共発現させるには、例えば、本発明形質転換体を培養液の中で培養すればよい。

本発明形質転換体の培養条件は、本発明形質転換体の種類に応じた条件を適宜選択すればよい。

20 例えば、本発明形質転換体が微生物である場合には、微生物の培養に通常使用される液体培地又は平板培地を用いて培養すればよい。培養温度は、微生物の生育可能温度内であればよく、例えば、15～40℃程度を挙げることができる。培地のpHも、微生物の生育可能範囲であればよく、例えば、pH6～8程度を挙げることができる。培養時間は、その他の培養条件により異なるが、通常、1～5日間程度、特に1～2日間程度にすればよい。温度シフト型やIPTG誘導型等の誘導型の発現プラスミドを用いる場合には、誘導時間は1日間以内、特に数時間程度とすればよい。

形質転換体が昆虫細胞の場合には、昆虫細胞の種類に応じて適した培養条件とすればよい。例えば、FBS及びYeastlateを含むGrace's medium等の昆虫細胞用培地を用い

て培養すればよい。培養温度は、25～35℃程度を上げることができる。培地のpHも、昆虫細胞の生育可能範囲であればよく、例えば、pH6～8程度を上げることができる。培養時間は、その他の培養条件により異なるが、通常、1～5日間程度、特に2～3日間程度にすればよい。

- 5 発現プラスミドとしてBaculovirus等のウィルスを含む形質転換体の場合は、培養時間は細胞質効果が現れて細胞が死滅する前まで（例えば3～7日間程度、特に4～6日間程度）とするのが好ましい。

- 10 形質転換体が哺乳動物細胞の場合には、哺乳動物細胞の種類に応じて適した培養条件とすればよい。例えば、FBSを添加したDMEM培地（ニッスイ社製等）を用いて5% CO₂ 存在下、数日毎に新しい培地に交換しながら培養すればよい。哺乳動物細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、例えば、トリプシン溶液を加えて個々の細胞に分散させ、得られた細胞の懸濁液を数倍に希釈して新しいシャーレに播種し継代を続けられればよい。
- 15 培養温度は、36～38℃程度を上げることができる。培地のpHも、哺乳動物細胞の生育可能範囲であればよく、例えば、pH6～8程度を上げることができる。培養時間は、その他の培養条件により異なるが、通常、2～5日間程度、特に2～3日間程度にすればよい。

- 20 本発明形質転換体の細胞内で、Gm1タンパク質、G-タンパク質共役型受容体タンパク質及びCRMP2タンパク質のいずれもが共発現していることを確認する方法としては、通常のタンパク質工学的方法を利用すればよい。具体的には例えば、本発明形質転換体より調製されたタンパク質抽出液を、抗Gm1タンパク質抗体、抗G-タンパク質共役型受容体タンパク質抗体及び抗CRMP2タンパク質抗体を用いてウエスタンブロット
- 25 を行う方法等を上げることができる。

本発明スクリーニング方法は、（a）被験物質と、前項1、2又は3記載の形質転換体とを接触させる第一工程と、（b）第一工程後の形質転換体におけるCRMP2タン

パク質のリン酸化状態又はそれと相関する指標値を測定する第二工程と、（c）第二工程で測定されたリン酸化状態又はそれと相関する指標値を、対照と比較して、前記形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する指標値を変動させる被験物質を選択する第三工程とを含む。

5

本発明スクリーニング方法において「被験物質」としては、特に限定は無く、例えば、タンパク質（抗体を含む）、ペプチド、非ペプチド性化合物（ヌクレオチド、アミン、糖質、脂質等）、有機低分子化合物、無機低分子化合物、醗酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液等を挙げることができる。被験物質の形態としては、特に限定は無く、固体、液体、基剤との混合物、懸濁液又は溶液等を挙げることができる。懸濁液若しくは溶液とする場合、水、pH緩衝液、メチルセルロース溶液、生理食塩水、有機溶媒水溶液（有機溶媒としては通常エタノールやジメチルスルホキシドが用いられる。）等を用いればよい。

10

被験物質の接触量、接触回数及び接触時間は、例えば、本発明形質転換体に重篤な影響を及ぼさない範囲内とすればよい。

15

本発明スクリーニング方法の第一工程における「接触」は、当業者に汎用されている方法で実施することができる。被験物質を本発明形質転換体に接触する場合、その接触方法には特に限定はなく、例えば、本発明形質転換体を含む培養液・寒天培地等の中に、0.001～10 μ M程度の濃度となるように被験物質を添加すればよい。

20

本発明スクリーニング方法の第二工程における「CRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する指標値を測定する」方法では、タンパク質抽出液の調製、電気泳動法、メンブレンの上への転写、CRMP2タンパク質の検出方法等を用いることができる。これらの方法では、通常の生化学的手法・タンパク質工学的手法等を用いて分析すればよい。例えば、2次元電気泳動法とウエスタンブロット法とを組み合わせることにより行えばよい。具体的には例えば、まず被験物質を接触させた本発明形質転換体からタンパク質抽出液を調製する。調製されたタンパク質抽出液を1次元目の電気泳

25

動を行ない、次いで2次元目の電気泳動を行う。分離されたCRMP2タンパク質を適当なメンブレンの上に転写する。次いで、当該メンブレンの上に転写されたCRMP2タンパク質を抗CRMP2タンパク質抗体等で検出する。これら操作の結果、CRMP2タンパク質はリン酸化の程度の違いによって分離される。

- 5 非リン酸化型CRMP2は、よりアルカリ性側に検出され、リン酸化型CRMP2は、リン酸化の程度が高くなるほど、より酸性側に検出される。リン酸化の程度に基づくCRMP2の分離は、それ自体公知の通常用いられる方法に従い行うことができる。

CRMP2のリン酸化状態を定量する方法としては、公知の定量化法を用いればよいが、例えば、ウェスタンブロットにより検出されたシグナルをイメージアナライザー等
10 にて定量化すればよい。具体的には例えば、本発明形質転換体において2次元電気泳動後のウェスタンブロットにより検出されたCRMP2のスポットの非リン酸化型CRMP2のスポット強度を「1」とし、それぞれのリン酸化型CRMP2のスポット強度を算出する。同様に、対照におけるCRMP2のスポットの強度も、非リン酸化型CRMP2のスポット強度を「1」とし、それぞれのリン酸化型CRMP2のスポット強度を算出する。

15

本発明スクリーニング方法の第三工程における対照との比較では、例えば、被験物質を接触させた本発明形質転換体におけるCRMP2タンパク質の第二工程で測定されたリン酸化状態又はそれと相関する指標値を、被験物質を接触させていない本発明形質転換体におけるCRMP2タンパク質の第二工程で測定されたリン酸化状態又はそれと相
20 関する指標値と比較すればよい。ここで「被験物質を接触させていない本発明形質転換体」とは、例えば、溶媒のみを接触させた本発明形質転換体であってもよい。

かかる対照は、対照とするCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する指標値を、本発明形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する指標値と併行して測定して求めてもよいし、別途測定して求めてもよい。

- 25 例えば、被験物質と接触させた本発明形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する指標値の測定値が、対照とする本発明形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する指標値の測定値よりも低ければ、前記被験物質との接触は、CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制することによ

りCRMP2タンパク質を活性化させる効果を有することを意味し、当該被験物質はGm1を介したシグナル伝達調節物質として選択することができる。具体的には例えば、対照におけるそれぞれのスポットを100%とし、被検物質を接触させた本発明形質転換体で検出されたCRMP2のそれぞれのスポットのパーセンテージを算出する。被検物質を接触させた本発明形質転換体において検出されたCRMP2のそれぞれのスポットのパーセンテージのいずれかが、例えば70%以下、好ましくは60%以下、更に好ましくは50%以下になる被検物質を、シグナル伝達調節物質の候補物質として選択すればよい。好ましくは、より高度にリン酸化されたスポットにおいて、スポットのパーセンテージが、例えば70%以下、好ましくは60%以下、更に好ましくは50%以下になる被検物質を、シグナル伝達を活性化する候補物質として選択すればよい。

被験物質の代わりに「対照物質」となり得るポジティブコントロール又はネガティブコントロールを用いて本発明スクリーニング方法を実施することにより、場合にに応じて上記の対照とすることもできる。

ここで「ポジティブコントロール」とは、CRMP2タンパク質のリン酸化状態を制御する効果を有する任意の物質を表し、また「ネガティブコントロール」としては、被験物質に含まれる溶媒、バックグラウンドとなる試験系溶液等が挙げられる。

「対照物質」をネガティブコントロールとする場合、被験物質が有する「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」が、対照物質が有する「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」よりも大きければ、当該被験物質は「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」を有すると評価すればよい。一方、被験物質が有する「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」が、対照物質が有する「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」と同程度若しくは小さければ、当該被験物質が有する「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」を有しないと評価することができる。

また、対照物質をポジティブコントロールとする場合、被験物質が有する「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」と、対照物質が有する「CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」とを比較することにより、被験物質が有する「

CRMP2タンパク質のリン酸化状態を抑制する効果」を評価すればよい。

このようにして効果を有すると評価された場合には、当該被験物質を、Gm1を介したシグナル伝達調節物質として選択することができる。

- 5 本発明薬剤は、例えば、上記のようにして選択された「Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質」を有効成分として含有する。本発明薬剤は、CRMP2タンパク質を介したシグナル伝達異常に起因する疾患の治療又は予防剤として有用である。

実施例

- 10 以下、本発明の実施例を示してより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1（本発明スクリーニング方法：Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質のスクリーニング）（その1）

- 15 （1）G m 1 遺伝子の取得

文献（US2005-0260595号公報）記載の方法に準じた方法を用いて、ヒト脳由来cDNAライブラリー（宝酒造社製）20ngを鋳型に用いて且つ10 μ MのフォワードプライマーprGm1ATG（5'-ATGGGTCTGTGCTACAGTCTGCGG；配列番号3）、10 μ MのリバースプライマーprGNAL3'（5'-TCACAAGAGCTCATACTGCTT；配列番号4）及びTAKARA LA Taqポリメラーゼ（TAKARALA Taq with GC Buffer, 宝酒造社製）を用いてPCRを行った。

20 PCR条件は、95℃で30秒間、次いで60℃で30秒間、次いで72℃で2分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動後、当該ゲル上で検出された約1.5kbのバンドを切り出し、切り出されたゲルからDNAを回収して該DNAをpCR2.1-TOPOベクター（インビトロジェン社製）

25 ヘクローニングしpCR-Gm1を作製した。

（2）pcDNA-Gm1の構築

文献（US2005-0260595号公報）記載の方法に準じた方法を用いて、実施例1で作製

されたプラスミドpCR-Gm1を制限酵素XbaI及びKpnIで二重消化した。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動した後、当該ゲル上で検出された約1.5 kbのバンドを切り出し、切り出されたゲルからDNAを回収して該DNAをインサートDNAとした。

pcDNA3.1（インビトロジェン社製）をXbaI及びKpnIで二重消化したものをベクターとして用い、これに前記インサートDNAをライゲースを用いて連結することにより、プラスミドpcDNA-Gm1を作製した。

（3）pcDNA-m5HT4の構築

マウス脳より調製したRNA 200 ngを鋳型に用いて且つ10 μ Mのリバースプライマー-m5HT4-3'（5'-CTAAGTATCACTGGGCTGAGCAGCCA；配列番号5）及びSuper Script III逆転写酵素（インビトロジェン社製）を用いて、55℃で50分間、次いで75℃で15分間保温し、逆転写を行った。得られたcDNA 2 μ lを鋳型に用いて且つ10 μ Mのフォワードプライマー-m5HT4-5'（5'-ATGGACAACTTGATGCTAATGTGAGTT；配列番号6）、10 μ Mのリバースプライマー-m5HT4-3'（5'-CTAAGTATCACTGGGCTGAGCAGCCA；配列番号7）及びKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡製）を用いてPCRを行った。PCR条件は、95℃で30秒間、次いで60℃で30秒間、次いで68℃で2分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動後、当該ゲル上で検出された約1.2 kbのバンドを切り出し、切り出されたゲルからDNAを回収して該DNAをpDriveベクター（キアゲン社製）へクローニングしpDr-m5HT4を作製した。プラスミドpDr-m5HT4を制限酵素NheI及びKpnIで二重消化した。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動した後、当該ゲル上で検出された約1.2 kbのバンドを切り出し、切り出されたゲルからDNAを回収して該DNAをインサートDNAとした。pcDNA3.1（インビトロジェン社製）をNheI及びKpnIで二重消化したものをベクターとして用い、これに前記インサートDNAをライゲースを用いて連結することにより、プラスミドpcDNA-m5HT4を作製した。

（4）pcDNA-CRMP2の構築

ヒト脳由来cDNAライブラリー（宝酒造社製）20 ngを鋳型に用いて且つ10 μ Mの

フォワードプライマーhCRMP2(ATG) (5'-CACCATGTCTTATCAGGGGAAGAAAAA ; 配列番号 8) 、 10 μ MのリバースプライマーhCRMP2(-STOP)rev (5'-GCCCAGGCTGGTGATGTTGGCACGGCCA ; 配列番号 9) 及びKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡製) を用いてPCRを行った。PCR条件は、95℃で30秒間、次いで60℃で30秒間、
5 次いで68℃で2分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動後、当該ゲル上で検出された約1.7 kbのバンドを切り出し、切り出されたゲルからDNAを回収して該DNAをpENTR/D-TOPOベクター (インビトロジェン社製) ヘクローニングしpENTR-CRMP2を作製した。次いで、4 μ l pENTR-CRMP2、1 μ l pcDNA6.2・V5-DEST及び2 μ l LRクロナーゼII (インビトロジェン社製) を混合し室温で1時間保持することにより、プラスミドpcDNA-CRMP2を作
10 製した。

(5) pcDNA3.1の調製

pcDNA3.1は、インビトロジェン社から販売されている市販品を購入し、これを用い
15 た。

(6) 本発明形質転換体の作製およびシグナル伝達調節物質のスクリーニング

COS7細胞 (ATCCからの購入品) を10 cmシャーレに 5×10^6 cells/シャーレで播種し、10%FCSを含むDMEM培地 (インビトロジェン社製) 中で、37℃、
20 5%CO₂ 条件下にて約24時間培養した。得られた細胞に、上記(2) で得られた「Gm1発現プラスミド (pcDNA-Gm1; 12 μ g)」、上記(3) で得られた「5HT4発現プラスミド (pcDNA-m5HT4; 6 μ g)」及び、上記(4) で得られた「CRMP2発現プラスミド (pcDNA-CRMP2; 6 μ g)」の全てを60 μ lのリポフェクトアミン2000 (インビトロジェン社製) と混合し20分間保持したものをトランスフェクションした。トラン
25 スフェクション3時間後に培地を5%透析FCSを含むDMEM培地に全交換し、更に約21時間培養した。

被験物質RS67333 (1-(4-Amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-[1-butyl-4-piperidinyl]-1-propanone hydrochloride ; C₁₉H₂₉ClN₂O₂·HCl) を、最終濃度が10 μ

Mになるように、前記で作製された本発明形質転換体である細胞の培養液中に添加した後、得られた培養物を 37℃で 30 分間静置した。

得られた培養物から、RS67333を含む培地を除去した後、得られた細胞を PhosphoProtein Purification kit (キアゲン) を用いて溶解することにより細胞抽出液を得た。当該細胞抽出液から 2-D Clean-Up kit (GEヘルスサイエンス) を用いてタンパク質抽出液(精製タンパク質)を調製した。対照として、RS67333の代わりに DMSO溶媒のみを上記細胞の培養液中に添加して同様に培養し、得られた培養物から同様にタンパク質抽出液(精製タンパク質)を調製した。

得られたタンパク質抽出液(精製タンパク質800 μ g)を、Immobiline DryStrip (GEヘルスサイエンス) を用いた一次元目の電気泳動に供した。次いで、7.5%SDS-PAGEゲルを用いて二次元目の電気泳動を行った。二次元電気泳動後のゲルを、Hybond-P (GEヘルスサイエンス) へ転写した。当該メンブレンの上に転写されたCRMP2タンパク質を抗CRMP2抗体(C4G) (株式会社免疫生物研究所) を用いてウエスタンブロッティングにより検出した (図1 参照)。図1 でアルカリ性側に位置するスポットNo. 1は、非リン酸化型CRMP2タンパク質のスポットであり、それより酸性側に位置するスポットNo. 2-6は、リン酸化型CRMP2タンパク質のスポットである。また、より酸性側に位置するスポットほど、つまりNo. 6側に位置するスポットほどリン酸化の程度が高いCRMP2タンパク質のスポットである。

図1 に示したウエスタンブロットにより検出されたそれぞれのスポットのシグナル強度を、LAS-4000 (富士フイルム) を用いて測定した。非リン酸化型CRMP2タンパク質のスポットの強度を「1」とした時の、それぞれのリン酸化型CRMP2タンパク質のスポットの強度を算出した (図2 参照)。図2 に示された結果から明らかな通り、RS67333を接触させた細胞における「より高度にリン酸化されたスポット (スポットNo. 3からNo. 6)」のシグナル強度が、DMSO溶媒のみを接触させた細胞における「より高度にリン酸化されたスポット (スポットNo. 3からNo. 6)」のシグナル強度と比較して低下していた。

以上の結果より、RS67333を接触させた細胞において、リン酸化の程度が抑制された結果、より高度にリン酸化された状態のCRMP2タンパク質が減少したことが確認さ

れた。

次に、各スポットにおけるシグナルの変化の程度を定量化するために、DMSO溶媒のみを接触させた細胞におけるそれぞれのスポットのシグナル強度の値を100%とした場合の、RS67333を接触させた細胞におけるそれぞれのスポットのシグナル強度の
5 相対値（パーセンテージ）を算出した（図3参照）。その結果、RS67333を接触させた細胞のより高度にリン酸化型されたCRMP2のスポット（スポットNo. 3からNo. 6）において、スポットのシグナル強度の相対値（パーセンテージ）がそれぞれ、54.1%、27.9%、22.4%及び16.4%であることが確認された。

以上の結果より、RS67333がGm1タンパク質を介するシグナル伝達調節物質であるこ
10 とが判明した。

実施例2（本発明スクリーニング方法：Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質のスクリーニング）（その2）

（7）pcDNA-GPCRの構築

15 cDNA2 μ lを鋳型に用いて且つ10 μ Mのフォワードプライマー、10 μ Mのリバースプライマー及びKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡製）を用いてPCRを行う。PCRで得られたDNAをアガロースゲル電気泳動後、当該ゲル上で検出されたバンドを切り出し、切り出されたゲルからDNAを回収して該DNAをpENTR/D-TOPOベクター（インビトロジェン社製）へクローニングしpENTR-GPCRを作製する。4 μ l pENTR-GPCR、1 μ l
20 pcDNA6.2・V5-DEST及び2 μ l LRクロナーゼII（インビトロジェン社製）を混合し室温で1時間保持することにより、プラスミドpcDNA-GPCRを作製する。

（8）本発明形質転換体の作製およびシグナル伝達調節物質のスクリーニング

COS7細胞（ATCCからの購入品）を6穴プレートに 1×10^6 cells/シャーレ
25 で播種し、10%FCSを含むDMEM培地（インビトロジェン社製）中で、37℃、5%CO₂条件下にて約24時間培養する。得られた細胞に、上記（2）で得られた「Gm1発現プラスミド（pcDNA-Gm1）」、（7）で得られる「GPCR発現プラスミド（pcDNA-GPCR）」及び、上記（4）で得られた「CRMP2発現プラスミド（pcDNA-CRMP2）」

の全てをリポフェクトアミン2000（インビトロジェン社製）と混合し20分間保持したものをトランスフェクションする。トランスフェクション3時間後に培地を全交換し、更に約21時間培養する。

5 各種の被験物質を、最終濃度10 μ Mになるように前記で作製された本発明形質転換体である細胞の培養液中に添加した後、得られた培養物を37℃で30分間静置する。

得られた培養物から、前記被験物質を含む培地を除去した後、得られた細胞をPhosphoProtein Purification kit（キアゲン）を用いて溶解することにより細胞抽出液を得る。当該細胞抽出液から2-D Clean-Up kit（GEヘルスサイエンス）を用いてタンパク質抽出液（精製タンパク質）を調製する。対照として、前記被験物質の代わ
10 りにDMSO溶媒のみを前記細胞の培養液中に添加して同様に培養し、得られた培養物から同様にタンパク質抽出液（精製タンパク質）を調製する。

得られたタンパク質抽出液（精製タンパク質800 μ g）を、Immobiline DryStrip（GEヘルスサイエンス）を用いた一次元目の電気泳動に供する。次いで、7.5%SDS-PAGE
15 ゲルを用い2次元目の電気泳動を行う。2次元電気泳動後のゲルを、Hybond-P（GEヘルスサイエンス）へ転写する。当該メンブレンの上に転写されたCRMP2タンパク質を抗CRMP2抗体（C4G）（株式会社免疫生物研究所）を用いてウエスタンブロッティングにより検出する。

ウエスタンブロットにより検出されたそれぞれのスポットのシグナル強度を、LAS
20 -4000（富士フィルム）を用い測定する。非リン酸化型CRMP2タンパク質のスポットの強度を「1」とした時の、それぞれのリン酸化型CRMP2タンパク質のスポットの強度を算出する。

各スポットにおけるシグナルの変化の程度を定量化するために、DMSO溶媒のみを接触させた細胞におけるそれぞれのスポットのシグナル強度の値を100%とした場合
25 の、前記被験物質を接触させた細胞におけるそれぞれのスポットのシグナル強度の相対値（パーセンテージ）を算出する。その結果、前記被験物質を接触させた細胞のいずれかのリン酸化型CRMP2タンパク質のスポットにおいて、スポットのシグナル強度の相対値（パーセンテージ）が50%以下になる被験物質を、「Gm1タンパク質を介

するシグナル伝達調節物質」として選択する。選択された「Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質」を有効成分として含有する薬剤（即ち、CRMP2タンパク質を介したシグナル伝達異常に起因する疾患の治療又は予防剤）を調製する。

5 産業上の利用可能性

本発明により、Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質のスクリーニング方法及びそれに利用する形質転換体を含む試験ツール等を提供することが可能となる。

配列表フリーテキスト

10 配列番号 3

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 4

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 5

15 R T - P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 6

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 7

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

20 配列番号 8

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 9

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

請求の範囲

1. 下記遺伝子（１）、（２）及び（３）が宿主細胞内に導入された形質転換体：
 - （１）Gm1タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子、
 - 5 （２）G-タンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子、及び
 - （３）CRMP2タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する外来遺伝子。
2. 前記外来遺伝子が、前記タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有
10 するプラスミドの形態である核酸である請求項１記載の形質転換体。
3. 前記遺伝子（１）、（２）及び（３）にコードされるタンパク質をいずれもその細胞内で共発現している請求項１又は２記載の形質転換体。
- 15 4. （a）被験物質と、請求項１乃至３のいずれかに記載の形質転換体とを接触させる第一工程と、
（b）第一工程後の形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと
相関する指標値を測定する第二工程と、
（c）第二工程で測定されたリン酸化状態又はそれと相関する指標値を、対照と比較
20 して、前記形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する
指標値を変動させる被験物質を選択する第三工程と
を含む、Gm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質のスクリーニング方法。
5. 第三工程における対照が、被験物質を接触させていない請求項１乃至３のいずれ
25 かに記載の形質転換体におけるCRMP2タンパク質のリン酸化状態又はそれと相関する
指標値である請求項４記載のスクリーニング方法。
6. 請求項４又は５記載のスクリーニング方法により得られるGm1タンパク質を介し

たシグナル伝達調節物質。

7. 請求項6記載のGm1タンパク質を介したシグナル伝達調節物質を有効成分として含有する、CRMP2タンパク質を介したシグナル伝達異常に起因する疾患の治療又は予

5 防剤。

1/2

図 1

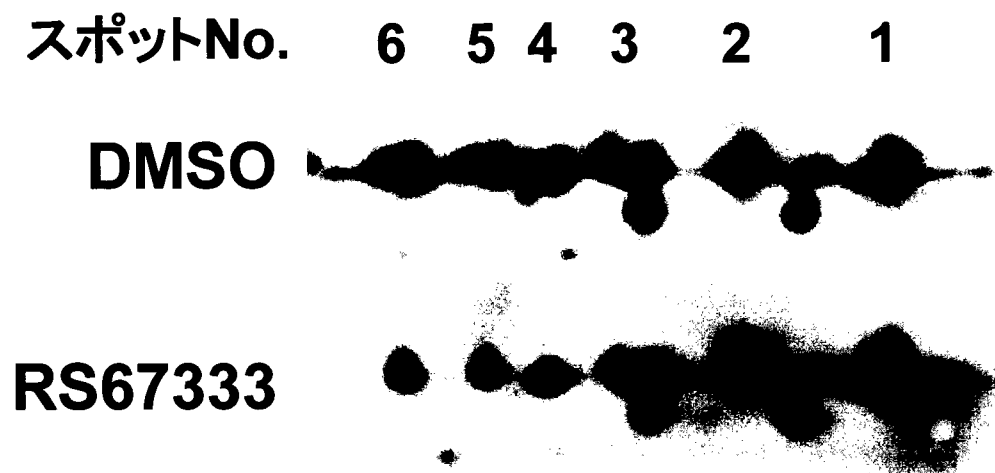
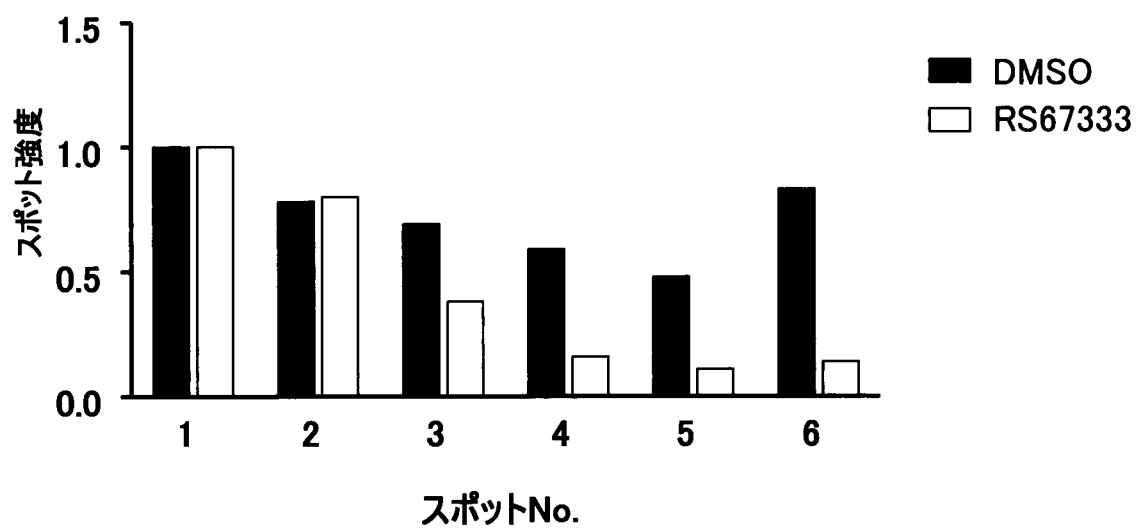
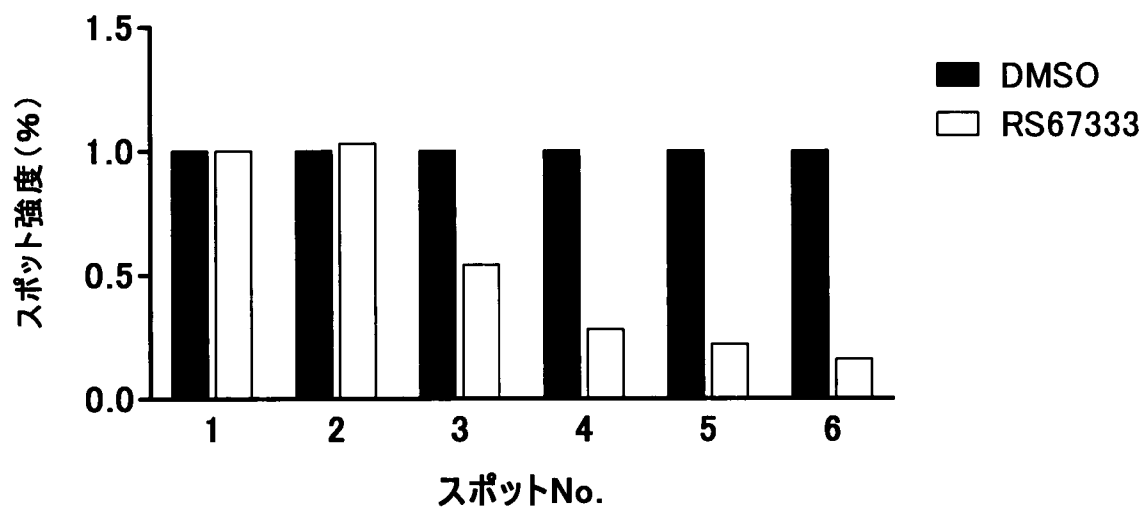


図 2



2/2

図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/053585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/10(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10, A61K45/00, A61P25/00, A61P25/18, A61P25/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N15/09, C12Q1/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CORRADI J.P. et al., Alternative transcripts and evidence of imprinting of GNAL on 18p11.2, Mol. Psychiatry, 2005.11, Vol.10, No.11, pp.1017-1025	1-5
A	JP 2006-288387 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 26 October 2006 (26.10.2006), abstract & WO 2006/098488 A1 & US 2009/0210949 A1 & EP 1867717 A1	1-5
A	JP 2006-320201 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 30 November 2006 (30.11.2006), abstract & WO 2006/123827 A1 & US 2009/0042789 A1 & EP 1889905 A1	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 April, 2012 (26.04.12)

Date of mailing of the international search report
15 May, 2012 (15.05.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/053585

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-350672 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 16 December 2004 (16.12.2004), abstract & US 2005/0260595 A1 & EP 1382613 A1	1-5
A	HENSLEY K. et al., Collapsin response mediator protein-2: an emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodisease indications, Mol. Neurobiol., 2011.01.28, Vol.43, No.3, pp. 180-191	1-5
P,X	WO 2012/005379 A1 (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 12 January 2012 (12.01.2012), the entire description (Family: none)	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/053585

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.: 6-7
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:
With regard to the signaling regulator substance or the therapeutic or prophylactic agent which is obtained by the screening method claimed in claims 6-7, the structure of the compound is not specified and it is quite unknown
(continued to extra sheet)
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:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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/JP2012/053585

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

as to what types of compounds are included within the scope of the signaling regulator substance or the therapeutic or prophylactic agent. Therefore, the statements of claims 6-7 are remarkably unclear, and no meaningful opinion is possible on the question of novelty, inventive step or industrial applicability.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/10, A61K45/00, A61P25/00, A61P25/18, A61P25/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N15/09, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CORRADI J.P. et al., Alternative transcripts and evidence of imprinting of GNAL on 18p11.2, Mol. Psychiatry, 2005.11, Vol.10, No.11, pp.1017-1025	1-5
A	JP 2006-288387 A (住友化学株式会社) 2006.10.26, 要約等 & WO 2006/098488 A1 & US 2009/0210949 A1 & EP 1867717 A1	1-5
A	JP 2006-320201 A (住友化学株式会社) 2006.11.30, 要約等 & WO 2006/123827 A1 & US 2009/0042789 A1 & EP 1889905 A1	1-5

☒ 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

2 6 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 5 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小金井 悟

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

4 N

3 9 6 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2004-350672 A (住友化学工業株式会社) 2004.12.16, 要約等 & US 2005/0260595 A1 & EP 1382613 A1	1-5
A	HENSLEY K. et al., Collapsin response mediator protein-2: an emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodegeneration indications, Mol. Neurobiol., 2011.01.28, Vol.43, No.3, pp.180-191	1-5
P, X	WO 2012/005379 A1 (住友化学株式会社) 2012.01.12, 明細書全体 (ファミリーなし)	1-5

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（P C T 17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. ☐ 請求項 _____ 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. ☒ 請求項 6-7 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、
請求項 6-7 に記載のスクリーニング方法によって得られるシグナル伝達調節物質又は治療若しくは予防剤は、化合物の構造が特定されておらず、どのような化合物を包含しているのか全く不明である。よって、請求項 6-7 の記載は著しく不明確であるので、新規性、進歩性、産業上の利用可能性について有意義な見解を示すことができない。
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 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ろの国際調査機関は認めた。

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項について作成した。
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項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ため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項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ため、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項について作成した。

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はあったが、異議申立てはなかった。