(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
2004 年1 月29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/009617 A1

(51) 国際特許分類[7]: C07K 7/08, 14/47, 16/18, C12N 15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, G01N 33/563

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009059

(22) 国際出願日: 2003 年7 月17 日 (17.07.2003)

(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2002-210040 2002 年7 月18 日 (18.07.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人大阪産業振興機構 (OSAKA INDUSTRIAL PROMOTION ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒540-0029 大阪府 大阪市 中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか内 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大河内 正康 (OKOCHI,Masayasu) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘2-2、D3 大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセシング異常疾患分野（精神医学） Osaka (JP). 武田 雅俊 (TAKEDA,Masatoshi) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘2-2、D3 大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセシング異常疾患分野（精神医学） Osaka (JP).

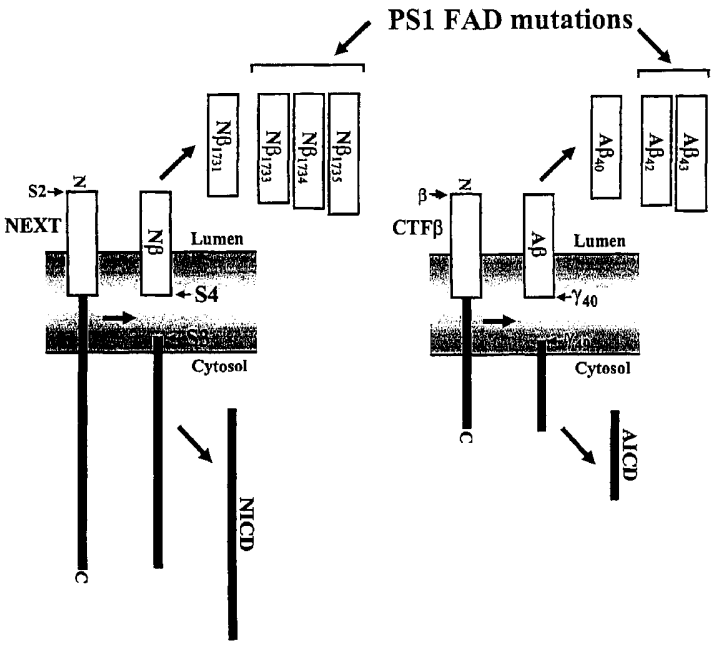
(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府 大阪市 北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL Notch-ORIGIN POLYPEPTIDES AND BIOMARKERS AND REAGENTS USING THE SAME

(54) 発明の名称: Ｎｏｔｃｈ由来新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬



(57) Abstract: It is intended to provide extracellular markers whereby Notch signal transduction can be detected. Polypeptides (Nβ), which are novel peptides originating in Notch protein and released form cells in the step of the nuclear migration of NICH (Notch intracellular cytoplasmic domain) due to the extracellular digestion and the subsequent protein digestion in the membrane during a series of the Notch protein digestion, are referred to as markers. These peptides (Nβ) are released from the cells in proportion to the Notch signal depending on presenilin. By detecting these peptides, the Notch signal transduction, cell differentiation, cell tumorigenesis, apoptosis, Alzheimer's disease, etc. can be monitored.

[続葉有]

WO 2004/009617 A1

ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (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

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。

(57) 要約: Ｎｏｔｃｈシグナル伝達を検出できる細胞外マーカーを提供する。 Ｎｏｔｃｈタンパク質由来の新規ペプチド群であり、前記Ｎｏｔｃｈタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外部分における分解に続く膜内でのタンパク質分解によりNICD(Ｎｏｔｃｈ intracellular cytoplasmic domain)が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド（Ｎβ）をマーカーとする。このペプチド群（Ｎβ）は、Ｎｏｔｃｈシグナルに比例して細胞外に放出され、プレセニリン（presenilin）依存である。このペプチド群を検出することにより、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトーシス及びアルツハイマー病等をモニターできる。

明　細　書

Ｎｏｔｃｈ由来新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬

技術分野

本発明は、Ｎｏｔｃｈタンパク質の新規膜内タンパク質分解に由来する新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬等に関する。なお、本発明の説明において、Ｎｏｔｃｈのタンパク質分解部分については、Site-1;S1、Site-2;S2、Site-3;S3、Site-4;S4と略記する。なお、Site－４（Ｓ４）は、後述のように、本発明者等が発見した膜内の新規タンパク質分解部位である。

背景技術

Ｎｏｔｃｈは、細胞表面に存在するタイプ１膜貫通型タンパク質であり、細胞外部分にＥＧＦリピートを持ち、細胞内部分にアンキリンリピートを含む転写調節因子であるNICD（Ｎｏｔｃｈ Intracellular Cytoplasmic Domain）を持つ。Ｎｏｔｃｈは、細胞の分化に関する細胞間情報伝達に関与することが知られており、例えば、脳神経系の発生過程では、外胚葉系の細胞の一部が神経前駆細胞（幹細胞）に分化し、さらにニューロン細胞やグリア細胞へと分化するが、この過程において、Ｎｏｔｃｈを介した細胞間情報伝達が重要である。Ｎｏｔｃｈを介した細胞間情報伝達のメカニズムは、つぎの通りである。まず、Ｎｏｔｃｈは、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達の受け手側細胞のレセプターとして発現される。細胞表面に輸送されたＮｏｔｃｈは、furin等のプロテアーゼで細胞外部分領域（Ｓ１）で切断されて２分子になっているが、これらはＳ

－Ｓ結合で結合した状態で、そのまま細胞表面に存在する。次に、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達の送り手側の細胞が近接して存在した場合、その細胞表面にはＮｏｔｃｈリガンド（Delta、Serrate、Lag-2のDSLファミリー等）が発現されている。これら２つの条件が整い、細胞表面でＮｏｔｃｈリガンドがレセプターであるＮｏｔｃｈと相互作用すると、段階的なタンパク質分解が誘導されシグナル伝達が開始される。即ち、Ｎｏｔｃｈは細胞膜表面付近（Ｓ２）で切断され、さらにこの切断が引き金になって細胞膜内あるいは細胞内側の細胞膜の極めて近傍（Ｓ３）で切断が起こり、その結果生ずる細胞内部分であるNICDが細胞内に放出され、これが核内に移行し、CSLファミリー（CPB、SuH、Lag-1；転写因子）と結合することで標的遺伝子の転写を調節する。上記のＳ３部位での切断には、アルツハイマー病に関連するプレセニリンが関与している。

このように、Ｎｏｔｃｈは、細胞分化における細胞間情報伝達に極めて重要であるが、前記脳神経系の分化の他に、細胞の腫瘍化、アポトーシス、アルツハイマー病等にも関係していることが最近明らかになり注目を集めている（例えば、大河内等 「アルツハイマー病とプレセニリンの生物学」 分子精神医学 Vol.1 No.3 2001、影山等 「Ｎｏｔｃｈによる神経分化制御」 タンパク質 酵素 核酸 Vol.45 No.3 2000、Brian et.al., 「A carboxy-terminal deletion mutant of Ｎｏｔｃｈ 1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice」 Blood Vol.96 No.5 2000 Sep.1 p1906-1913）。したがって、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達の検出は、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトーシス、アルツハイマー病等の研究や診断に極めて重要な技術であり、その早期確立が求められている。

発明の開示

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達を検出するための細胞外分泌マーカーとなり得る物質の提供を、その目的とする。

本発明者等は、Ｎｏｔｃｈの一連のタンパク質分解過程で、Ｓ３部位での切断の際、細胞膜中に残されたポリペプチドが、細胞外に放出されるという仮説を立て、その検討を行うことにした。すなわち、細胞膜中の残されたポリペプチドが細胞外に放出されるとすれば、これがＮｏｔｃｈシグナル伝達のマーカーになり得るからである。本発明者等によるＮｏｔｃｈシグナル伝達の一連の研究の結果、Ｓ３の分解箇所とは別の部位（膜貫通部分内にある）で第４番目の切断が生じ、この切断により生じたポリペプチドが細胞外に放出することを突き止め、本発明に至った。

すなわち、本発明の新規ポリペプチドは、Ｎｏｔｃｈタンパク質由来の新規ポリペプチドであり、前記Ｎｏｔｃｈタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解によりNICD(Ｎｏｔｃｈ intracellular cytoplasmic domain)が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。このポリペプチドは、抗体等で検出できることから、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達を検出するためのマーカーとして使用できる。また、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、細胞分化、細胞の腫瘍化、アルツハイマー病、アポトーシス等に関連しているため、本発明の新規ポリペプチドは、これらの検出用マーカーとしても使用できる。また、後述するように、本発明の新規ポリペプチドにおいて、Ｃ末端が異なる複数種類のポリペプチドがある。なお、以下

において、本発明の新規ポリペプチドを、「Ｎｏｔｃｈ-β（Ｎβ）」とも言う。また、前記膜内のタンパク質分解は、細胞膜に限定されず、その他の細胞のオルガネラ膜も含まれる。

図面の簡単な説明

図１（Ａ）は、ＮΔＥ、Ｆ－ＮＥＸＴおよびNICDの構成を示す図であり、図１（Ｂ）および（Ｃ）は、本発明のFLAGタグされた新規ポリペプチド（Ｎβ）の生成の一例を示す電気泳動の写真である。

図２（Ａ）および（Ｂ）は、本発明の新規ポリペプチド（Ｎβ）の生成の一例を示す電気泳動の写真である。

図３（Ａ）は、本発明の新規ポリペプチド群の質量分析チャートであり、図３（Ｂ）は新規のＮｏｔｃｈタンパク質切断部位（Ｓ４）の主要な部位およびアルツハイマー病アミロイドβ（ｈβＡＰＰ）タンパク質前駆体の主要な切断部位を、それぞれ示す。

図４（Ａ）は、本発明の本体である新規ポリペプチドのアミノ酸配列の例を示す図である。図４（Ｂ）はＮｏｔｃｈ-1～４およびｈβＡＰＰの膜内アミノ酸配列を比較したものである。

図５（Ａ）および（Ｂ）は、本発明の新規ポリペプチド（Nβ）の細胞外放出におけるプレセニリン（ＰＳ）の機能阻害の影響の一例を示す電気泳動の写真である。

図６（Ａ）は、Ｎβ放出におけるアルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体の影響の一例を示す質量分析チャートの一例である。図６（Ｂ）は、アルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体の影響により分泌量が相対的増加するＮβ種を示したものである。図６（Ｃ）は、分泌量の相対的増加を半定量したものである。

図７は、本発明の新規ポリペプチド（Ｎβ）の細胞外放出の一例およ

びその放出ペプチドのＣ末端がアルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体により変化することを説明する図である。

図８（Ａ）は、Ｎｏｔｃｈ－１およびβAPPの膜貫通部分での切断の機構を示したものである。図８（Ｂ）は、F-NEXT Ｖ１７４４ＧおよびF-NEXT Ｖ１７４４Ｌ変異体を具体的にシェーマで示したものである。図８（Ｃ）は、Ｖ１７４４を変異させたことによる、NICD産生の阻害の一例を示す電気泳動の写真である。図８（Ｄ）は、対応する細胞培養上清中のF-Nβの分泌の一例を示す電気泳動の写真である。図８（Ｅ）は、細胞内でのＳ３／Ｓ４切断の効率を測定したものである。

図９（Ａ）は、野生型F-NEXT、図９（Ｂ）は、F-NEXT Ｖ１７４４Ｇ突然変異体、図９（Ｃ）は、F-NEXT Ｖ１７４４Ｌ突然変異体から放出されたF-Nβペプチドの質量分析チャートである。

図１０（Ａ）は、作成したＳ４切断部位突然変異体を具体的にシェーマで示したものである。図１０（Ｂ）および（Ｃ）は、野生型F-NEXT、F-NEXT Ｇ１７３０－１７３３変異体およびＬ１７３０－１７３３変異体から放出されたF-Nβの分子量の一例を示す電気泳動の写真である。図１０（Ｄ）は、細胞内でのＳ３／Ｓ４切断の効率を測定したものである。

図１１（Ａ）は、F-NEXT Ｇ１７３０－１７３３突然変異体、図１１（Ｂ）は、F-NEXT Ｌ１７３０－１７３３突然変異体から放出されたF-Nβペプチドの質量分析チャートである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について、さらに詳しく説明する。

本発明のポリペプチドは、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達に比例して細胞外

に放出される。しかも、この細胞外への放出の直前におこるタンパク質分解である新規タンパク質分解は、プレセニリン依存的であり、プレセニリン機能が阻害されれば、本発明のポリペプチドの放出も減少する。

本発明の新規ポリペプチドは、Ｎｏｔｃｈタンパク質において、Ｓ３切断部位でのタンパク質分解と同時若しくはこれと前後しておこり、Ｓ３切断部位よりＮ末端側の細胞膜貫通部分でのタンパク質分解（Ｓ４切断）により、生じて放出される。

本発明の新規ポリペプチド（Nβ）のアミノ酸配列は、配列番号１から１８のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。配列番号１から１８において、配列番号１から９までが、マウスの配列であり、配列番号１０から１８までがヒトの配列である。また、配列番号１から１８のアミノ酸配列は、１個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。このようなアミノ酸配列からなるポリペプチドも、Ｎｏｔｃｈタンパク質由来であり、前記Ｎｏｔｃｈタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き細胞膜内タンパク質分解によりNICDが核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。そして、このポリペプチドも、Ｎｏｔｃｈシグナルに比例して細胞外に放出され、プレセニリン依存的に細胞外への放出される。なお、本発明の新規ポリペプチドは、生物から得られたものであってもよく、また人工的に合成したものであってもよい。また、前記生物の種類も限定されず、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシ、ショウジョウバエ、線虫等であってもよい。また、本発明の新規ポリペプチドの由来となる組織や細胞の種類も限定されず、即ち、未分化、分化を問わない体細胞および組織であり、例え

ば神経、骨髄、癌細胞および組織等であってもよい。

本発明のバイオマーカーは、前記本発明の新規ポリペプチドを含むものであり、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病等の検出に使用できる。なお、本発明のバイオマーカーは、その他の成分を含有していても良く、また前記新規ポリペプチドそのもの（単独）であってもよい。このバイオマーカーは、前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体を含む試薬で検出できる。前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体は、通常の方法で作成でき、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体であってもよい。前記試薬は、前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体の他に、この抗体を抗原とする標識化抗体若しくは前記新規ポリペプチドを認識可能な標識化抗体を含んでいてもよい。前記標識化は、例えば、蛍光物質、酵素（その基質が酵素反応で発色するもの等）、放射性物質、アガロースなどの担体等で行うことができる。

本発明の遺伝子は、前記本発明の新規ポリペプチドをコードする遺伝子であり、ＤＮＡ若しくはＲＮＡである。また、本発明のベクターは、前記遺伝子を組み込んだものであり、本発明の形質転換体は、前記ベクターを用いた形質転換体である。

つぎに、本発明の新規ポリペプチドが細胞外放出される一例を、図７の左側に示す。なお、同図右側は、アルツハイマー病におけるアミロイドベータ（Ａβ）の細胞外放出の一例を示している。同図左側に示すように、NEXT(Notch Extracellular Truncation)のアミノ末端は、TACE (TNFβ-Converting Enzyme)による細胞外切断により生成される。Ｓ２部位で

切断されたNEXTは、さらに、Ｓ３部位の切断により、ＮＩＣＤが核内に移行し、これと同時若しくは前後して、Ｓ４部位の切断（本発明者等が初めて見出した第４のＮｏｔｃｈのタンパク質分解部位）により、Ｎβ（本発明の新規ポリペプチド）が、細胞外に放出される。

5

つぎに、本発明の新規ポリペプチド（Ｎβ）のＣ末端のアミノ酸配列の例を、図４（Ｂ）に示す。同図には、マウスの４種類のＮｏｔｃｈ（ｍＮｏｔｃｈ-1～4）、ヒトの４種類のＮｏｔｃｈ（hＮｏｔｃｈ-1～４）およびhβAPPにおける、それぞれのＮβ若しくは細胞外放出フラグメ
10 ントのＣ末端周辺の配列を示している。図示のように、主要なＳ４切断部位は、推定膜貫通ドメイン（ＴＭ）領域において、数アミノ酸残基ほどＮ末端側に位置する（図において、左側の三角矢印で示す）。図示のように、主要な切断部位周辺のアミノ酸配列は、ｍＮｏｔｃｈ-1～4の間で保存されていなかったが、Ｓ３切断部位であるバリン１７４３は保存
15 されていた（図において、右側の三角矢印で示す）。このように、Ｓ４切断部位は、Ｓ３と異なり多様性があるのが特徴である。この多様性は、Ｓ４セクレターゼの切断配列認識機構が特殊であることを反映していると推察される。

20 実施例

以下、本発明の実施例について説明する。なお、実施例における試薬、材料および実験手法は、以下のとおりである。

（試薬）

25 γ－セクレターゼ（γ-Secretase）阻害剤である、[(2R, 4R, 5S)-2-Benzyl-5-(Boc-amino)-4-hydroxy-6-phenyl-hexanoyl]-Leu-Phe

-NH2は、Bachem社から購入した。

（プラスミド）

Ｃ末端に６回連続するｃ－ｍｙｃ配列を付加したＮｏｔｃｈΔE-M1727V(NΔE)およびNICDをコードするｃＤＮＡを、プラスミドpcDNA3 hygroに挿入したものは、Schroeter等の方法により調製した（Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R. (1998). Ｎｏｔｃｈ-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature. *393*, 382-386.）。なお、前記ｃＤＮＡは、R. Kopan博士から提供されたものを使用した。Ｎ末端にFLAG配列を付加したNEXT、即ちFLAG-NEXT (F-NEXT)は、２段階の部位特異的突然変異誘発（2-step site-directed mutagenesis）により調製した。第一段階では、F-NEXT Ｍ１７２７Ｖ(F-NEXT Ｍ１７２７Ｖ)を、部位特的突然変異誘発キット（ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit、Stratagene社）を用いて製造した。その際、NΔEを鋳型として使用し、また、下記の２つのプライマー１、２（配列番号１９、２０）を調製した。

プライマー１：

5-P-ATCGTCGTCCTTGTAGTCTCTCAAGCCTCTTGCGCCGAGCGCGGGCAGCAGCGTTAG-3'

プライマー２：

5-P-GACAAGATGGTGATGAAGAGTGAGCCGGTGGAGCCTCCGCTGCCCTCGCAGCTG-3'

第二段階では、F-NEXTを、部位特異的突然変異誘発キット(Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit、Stratagene社）を使用して、部位特異的突然変異誘発により調製した。その際、F-NEXT M1727Vを鋳型として使用し、また、下記の２つのプライマー３、４（配列番号２１，２２

）を調製した。

プライマー３；5-CCTCGCAGCTGCACCTCATGTACGTGGCAGCG-3'

プライマー４；5-CGCTGCCACGTACATGAGGTGCAGCTGCGAGG-3'

これらの変異体について、塩基配列を決定（シーケンス）し、突然変異誘発が成功したことを確認した。

（抗体）

ポリクローナル抗体（Ｌ６５２）は、ヒトＮｏｔｃｈ-1のＶ１７２２からＧ１７４３の間のアミノ酸配列（Ｓ２部位からＳ３部位の間の配列）のポリペプチドに対する抗体である。この抗体（Ｌ６５２）は、次のようにして作製した。まず、抗原となる前記ポリペプチドを準備した。このポリペプチドは、疎水性アミノ酸を多く含んでいることが特徴である。このため、アルツハイマー病アミロイドβタンパク質に対する抗体作成時に利用したのと同じ方法で抗体を作成した。即ち、キャリアタンパク質と結合させずに直接水溶し、同容積のリン酸バッファー（２倍濃度）を加え、アジュバントと共に乳化し、この乳化物をウサギに注射した（Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y., Haass, C. (1997). Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. J Biol Chem 272, 16085-16088）。抗ｃ－ｍｙｃモノクローナル抗体（9E10）および抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体をアガロースに共有結合させた試薬（Ｍ２-アガロース）は、市販品を使用した。

（培養細胞および細胞株）

ヒト胎児腎臓２９３細胞（Ｋ２９３細胞）、N2ａ細胞およびＣＯＳ細胞を、１０％ウシ胎仔血清、１％ペニシリン／ストレプトマイシン、２００μｇ／ｍｌゼオシン（zeocin；ＰＳ１発現を選択するため）および１００μｇ／ｍｌハイクロマイシン（hygromycin；ＮΔＥおよびF-NEXT発現を選択するため）を添加したＤＭＥＭ培地にて培養した。Ｋ２９３細胞はＰＳ１ 野生型、ＰＳ１ Ｌ２８６Ｖおよび ＰＳ１ Ｄ３８５Ｎを安定に発現する(Okochi et al, 2000, Kulic et al, 2000, Wolfe et al, 1999)。NΔEおよびF-NEXTの細胞への導入は、商品名Lipofectamine 2000 (Invitrogen社)を用いて行った。

（パルス-チェイス実験）

ＮΔＥを発現する細胞から、ＮΔＥのＮ末端フラグメント（NTF：Ｎβ）が放出されるかを判断するために、NΔEおよびNICDを安定的に導入したＫ２９３細胞を、１０ｃｍディッシュ中で、コンフルエントな状態まで培養した。そして、その細胞を、MEMビタミン溶液(Gibco社)と非標識アミノ酸を添加したイーグルとの平衡塩溶液中に300μCiの [^{3}H] アミノ酸（トリチウム化アミノ酸混合液；tritiated amino acid mixture, Amersham社）を加えた培養液中で、代謝的にパルスラベルを２時間行い、その後、１０％FCS/DMEMで６時間チェイスした。Ｎβが放出されるかどうか判断するため、Ｆ-NEXTを発現する細胞を、最初に、メチオニン非含有培地で４０分間メチオニン飢餓状態で培養し、ついで、メチオニン非含有DMEMにおいて、400μCiの [^{35}S] アミノ酸混合液(Redivue Promix, Amersham社)で１時間パルスラベルをし、つづいて、過剰量の非標識メチオニンを添加した１０％FCS/DMEMを含むチェイス培地で、種々の時間、チェイスした。

（免疫沈降/SDS-PAGE）

チェイス期間の終了後、培地を集めて直ちに氷上においた。ついで、３０００×ｇで遠心分離を行い、細胞残屑を排除した。次に、プロテアーゼ阻害剤カクテル(1:1000;Sigma社)および０．０２５％のアジ化ナトリウムを加えた。その試料を、Ｌ６５２またはＭ２-アガロース(Sigma社)を用いて、一晩免疫沈降を行い、ついで、０．１％ＳＤＳ、０．５％deoxycholic acidおよび１％ TritonX-100を含むRIPAバッファーで三回洗浄した。そのあとに、トリス－トリシン１０～２０％勾配ゲル(Invitrogen社)を使用してSDS-PAGEを行った。細胞は、氷冷PBS中でかき集め、１５００×ｇの遠心分離によって分離収集し、１０倍濃度の前記RIPA １００μｌで溶解した。そして、プロテアーゼ阻害混合液(１：５００;Sigma社)を含む９００μｌのＰＢＳを、前記溶解した細胞に加えた。不溶画分は、１５０００×ｇの遠心分離で分離し、その上清を免疫沈降に使用した。免疫沈降用の試料は、プロテインＡセファロース(protein A sepharose; Sigma社)で前処理し、９Ｅ１０またはＭ２-アガロースで免疫沈降した。次に、洗浄したタンパク質試料を、８％若しくはトリス－トリシンSDS－PAGEにて分離した。ゲルを固定した後、増幅蛍光写真撮影法試薬（Amplify Fluorographic Reagent、Amersham社）中で振とうし、ついで乾燥し、最後にオートラジオグラフィーを行った。

（免疫沈降/MALDI-TOF/MS解析）

F-NEXTおよびその派生物を安定に発現する細胞をコンフルエントな状態まで２０cmディッシュで培養した後、培養培地を新しい１０％ ＦＣＳ／ＤＭＥＭと取り替えた。CO_2インキュベーター中で３時間培養した後、培養上清を集めてすぐに氷上におき、そして、遠心分離で細胞残

屑を除去した。プロテアーゼ阻害混合液（１：１０００）および０．０２５％アジ化ナトリウムを添加した後、その培地を、Ｍ２-アガロースを使用して、４時間、４℃で免疫沈降した。そして、試料を、0.1% n-octylglucoside、１４０mM ＮａＣｌ、１０mM Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）および０．０２５％ アジ化ナトリウムを含むＭＳ洗浄バッファーを使用して、１０分間、４℃で３回洗浄した。そして、さらにもう一回、０．０２５％ アジ化ナトリウムを含む１０mM Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）で洗浄した。その結果得られた沈殿に結合したペプチドを、α-cyano-4hydroxy cinnamic acidで飽和したＴＦＡ／アセトニトリル／水（ＴＦＡ：アセトニトリル：水＝１：２０：２０）で溶出した。可溶化した試料を、ステンレスプレート上で乾燥させ、MALDI-TOF/MS解析にかけた。ＭＳピークは、アンギオテンシン（Sigma社）およびインシュリンβ鎖（Sigma社）で較正した。

（実施例１）

培養上清中における、FLAG-NEXT(F-NEXT)のＮ末端フラグメント（NTF;F-Nβ）の検出

図１（Ａ）に、NΔE、NICDおよびF-NEXTの構成を示す。図示のように、F-NEXTでは、NEXTのＮ末端にシグナルペプチドとそれに続くFLAG配列および２つのメチオニンが挿入されている。F-NEXTでは１７２７番目のアミノ酸残基に変異を加えていないが、NΔE（マウスＮｏｔｃｈ-1（ｍＮｏｔｃｈ-1））中では、図中の逆三角で示すように、メチオニン１７２７をバリンへ人為的に変異させてある(Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R. (1998). Ｎｏｔｃｈ-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature. *393*, 382-386.)。三角矢印は、Ｓ３タンパク質分解部位を示す。

NΔEおよびF-NEXTを安定に発現する細胞を、１時間［^{35}S］でパルスラベルし、図１（Ｂ）に示す時間チェイスした。その結果得た細胞の溶解物を9E10で免疫沈降し、８％SDS-PAGEで解析した。図１（Ｂ）の上パネルに示すように、２時間チェイスした後、NΔE(パネル中央)およびF-NEXT（パネル右）においてタンパク質分解が観察され、NΔEおよびF-NEXTのバンドよりも速く移動するNICDバンドの生成が認められた。NICD生成効率は、ＮΔＥまたはF－NEXTを発現させた場合で違いがなかった。

つぎに、前記培養上清を、Ｍ２-アガロースで免疫沈降し、８％SDS-PAGEで解析した。図１（Ｂ）の下パネルに示すように、約４kDaのF-Nβ（本発明の新規ポリペプチド群の集合体）のバンドが、F-NEXTを安定に発現する細胞を２時間チェイスした培地からのみ同定された。このことは、NICD生成時にその反対側のアミノ末端フラグメントが細胞外に分泌されているという全く新しい知見を示す。

F-NEXTを発現する細胞を、［^{35}S］で１時間パルスラベルし、図１（ｃ）に示した時間チェイスした。培地および溶解物中のF-Nβを、上記の実験手法により調べた。図１（Ｃ）に示すように、F-Nβ（本発明の新規ポリペプチド群の集合体）の蓄積が、培地中ではチェイス時間の延長に応じて観察されたが、細胞溶解物中では殆ど検出できなかった。なお、電気泳動ゲルの写真撮影の露光時間を長くすると、培地中と同じ分子量のF-Nβバンドが溶解物中でも検出できた（図示せず）。

図１(Ｂ)および（Ｃ）に示した結果は、F-NEXT Ｍ１７２７Ｖ変異体を使用した場合、または発現細胞としてCHO、COS、N2aを用いた場合に

再現できた（図示省略）。

（実施例２）

培養培地中における、NΔEのＮ末端フラグメント（NTF：Ｎβ）の検出

ＮΔEまたはNICDを安定に発現するＫ２９３細胞を、［^{3}H］で２時間パルスラベルし、６時間チェイスした。チェイス培地および細胞溶解物を抗NΔE抗体であるＬ６５２で免疫沈降し、その試料をトリス－トリシンSDS-PAGEで分離した。図２（Ａ）に示すように、分子量３～４kDaのNΔEのNTFバンド（三角矢印）は、NΔEを発現する細胞の培養上清からは検出されたが、NICDを発現する細胞の培養上清および細胞溶解物中には認められなかった。このことから、このバンドはFLAGタグされていない野生型のNβであると考えられた。

上記と同じ培地および溶解物を、抗ｃ－ｍｙｃ抗体(9E10)を使用して、免疫沈降した。図２（Ｂ）の下パネルに示すように、約１００ｋＤａのNΔEおよびNICDのバンドが、溶解物中では検出されたが（三角矢印）、培地中では検出されなかった。この結果は、NΔEおよびNICDがほぼ同じ速度で各細胞に発現していることを示している。

（実施例３）

培養上清に放出されたNβのＣ末端の決定

図３（Ｂ）に、マウスＮｏｔｃｈ-1（ｍＮｏｔｃｈ-1）およびヒトβAPP（hβAPP）の膜内切断の概略を示す。ｍＮｏｔｃｈ-1は、膜内切断により、NICDとNβを生じる。この実施例では、Nβの分泌およびそのＣ末端に新規のタンパク質切断部位を確認した。一方、hβAPPは、膜内切断によ

り、細胞内フラグメントCTFγ50（Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Ｎｏｔｃｈ.EMBO Rep. *2*, 835-841.）と、数種類のＡβフラグメントを生じる。

F-NEXTを安定に発現する細胞の培養上清を、Ｍ２-アガロースで免疫沈降し、上記の実験手法により、Nβの分子量をMALDI-TOF/MSを使用して解析した。その結果を、図３（Ａ）グラフ（大）に示す。図示のように、分子量４０００を中心に、多数のピークが観察されたが、４５００より多い分子量の顕著なピークは確認されなかった。分子量３０００から４５００のピークの詳細を図３（Ａ）のグラフ（小）に示す。同じ主要なピークは、CHO、COSおよびN2aを宿主細胞として使用した場合でも確認された(図示せず)。また、これらのピークは、F-NEXT Ｍ１７２７Ｖ変異体を感染させた場合でも確認された(図示せず)。

図４(Ａ)に図３（Ａ）グラフ（小）に示したMALDI-TOF/MSのピークに一致するNβのアミノ酸配列を示す。主要なNβのＣ末端は、アラニン１７３１である。太文字は、主要ピークのアミノ酸配列を示す。図示のように、Ｓ３切断部位に一致する５０６０付近の分子量のピークは、確認されなかった。この結果から、Nβは細胞外に放出され、その放出の直前に起こるタンパク質の分解部位はこれまで報告された３つのタンパク質分解部位（Ｓ１、Ｓ２、Ｓ３）とは異なる、新規の第４のタンパク質分解部位（Ｓ４）であると結論できる。

図４（Ｂ）はヒト（ｈ）とマウス（ｍ）のＮｏｔｃｈ-1～４タンパク質膜貫通部分のアミノ酸配列を列挙したものである。Ｓ１、Ｓ２、Ｓ３切断がＮｏｔｃｈ-1～４に共通した現象であり、また、種によらない共通したシグナル伝達機構であることから、Ｓ４切断もすべてのＮｏｔｃｈ関連タンパク質に共通する現象であると推測できる。図示のようにＳ４部位はＳ３部位と同じように部分的に保存されていることから、このＳ４切断が、Ｎｏｔｃｈ-1～４タンパク質に共通する現象であると推察できる。

（実施例４）

Nβ細胞外放出のプレセニリン（PS）機能依存性の確認

ＰＳ１野生型およびプレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体（ＰＳ１ dominant negative mutant）であるＰＳ１ Ｄ３８５Ｎを発現する細胞に、F-NEXTを安定的に感染させた。そして、これらのＰＳ１派生物とF-NEXTとを同時に発現する細胞から放出されるNβのレベルを、[^{35}S]で１時間パルスし、ついで、２時間チェイスした培養上清および細胞溶解物を解析することにより調べた。まず、チェイス培地をＭ２-アガロースで免疫沈降し、Nβ放出を検出した。図５（ａ）の上パネルに示すように、ＰＳ１ Ｄ３８５Ｎ発現細胞からのNβの放出が、ＰＳ１野生型発現細胞と比較して著しく減少した。即ち、プレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体発現細胞ではＳ４切断効率が著しく減少することが確認できた。また、同時に採取した細胞溶解物を、9E10を使用して免疫沈降した。図５（Ａ）の下パネルに示すように、２時間のチェイス期間後のNICDバンドが、ＰＳ１ Ｄ３８５Ｎ発現細胞ではほとんど見ることができなかった。即ち、プレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体発現細胞では、Ｓ３切断効率が著しく減少するという報

告を同時に再現することができた。

つぎに、F-NEXTを安定に発現する細胞を、プレセニリンの活性中心に結合するγ－セクレターゼ阻害剤（Ｌ６８５，４５８）を加えた場合と、加えない場合とで、１時間ラベルし、２時間チェイスした。すなわち、１μＭのＬ６８５，４５８を、メチオニン飢餓状態にする２時間前に培養培地に加えると同時に、パルスーチェイス期間中、使用する各培地に同濃度のＬ６８５，４５８を含ませた。チェイス培地をＭ２-アガロースで免疫沈降し、Nβ放出を検出した。図５（Ｂ）の上パネルに示すように、γ－セクレターゼ阻害剤により、Nβの細胞から放出が著しく減少した。また、それに相当する溶解物を9E10で免疫沈降した。図５（ｂ）下パネルに示すように、２時間のチェイス期間後のNICDバンドが、Ｓ３切断阻害によって、ほとんど確認できなかった。これらの結果から、Nβの細胞外への放出はプレセニリン依存性タンパク質分解の働きによるものであり、プレセニリンの機能が阻害されると、Ｓ４切断およびそれに引き続くNβの放出も阻害されるといえる。

（実施例５）

家族性アルツハイマー病（ＦＡＤ）関連プレセニリン（ＰＳ）突然変異体のＳ４切断への影響

これまでＦＡＤに関連するＰＳの突然変異が分析された結果、すべての例でＡβ４２分泌の増加が確認されている。この実施例では、ＰＳ依存的Ｓ４タンパク質分解も、ＦＡＤ関連ＰＳ突然変異に関係していることを確認した。

野性型（wt）ＰＳ１若しくはＦＡＤ関連ＰＳ１突然変異であるＰＳ１

Ｃ９２Ｓ、ＰＳ１ Ｌ１６６ＰおよびＰＳ１ Ｌ２８６Ｖを発現するＫ２９３細胞に、Ｆ－ＮＥＸＴを安定的に感染させた。そして、MALDI-TOF/MSにより、Ｆ－Ｎβの Ｃ末端の変化を確認するために、ＰＳ１派生物およびＦ－ＮＥＸＴを発現する細胞の培養上清を分析した。図６（Ａ）に示すように、Ｎβの Ｃ末端タンパク質分解パターンの特徴的変化が、野性型ＰＳ１に比較してＦＡＤ突然変異ＰＳ１発現細胞で確認できた。特に、Ａβ４２生成が極めて増加しているＰＳ１ Ｌ１６６Ｐ突然変異では、Ｆ－Ｎβペプチドを長くする傾向が見られ、Ｆ－Ｎβ１７３１より２および４アミノ酸残基長いＦ－Ｎβ種（Ｆ－Ｎβ１７３３、１７３５）の生成の増加が確認できた（図６（Ｂ）参照）。また、図６（Ａ）に示すように、ＰＳ１ Ｃ９２Ｓでは、Ｆ－Ｎβ１７３４のレベルが増加し、ＰＳ１ Ｌ２８６Ｖでは、Ｆ－Ｎβ１７３５のレベルが増加し、かつＦ－Ｎβ１７３４のレベルが減少した。これらの結果から、ＦＡＤ突然変異により、Ｓ４切断部位のパターンは影響を受け、Ｃ末端側にペプチド長が伸びる傾向があることが確認された。Ａβ４２と同様に、アグレッシブなＰＳ１ Ｌ１６６Ｐ突然変異が、Ｆ－Ｎβのペプチド長に最も影響を与える。なお、ＰＳ１ Ｌ１６６Ｐは、成人初期のＦＡＤを引き起こすことが知られている。これらの効果は、Ｋ２９３細胞に限られず、Neuro2a細胞においても、ＦＡＤ関連ＰＳ突然変異の同様の効果が確認できた（データ図示せず）。以上のことから、全てのＦＡＤ突然変異は、Ｆ－Ｎβの Ｃ末端に対し、影響を及ぼすといえる（図６（Ｃ）参照）。

（実施例６）

Ｓ３部位でのタンパク質分解のＳ４部位でのタンパク質分解効率への影響

膜内での二箇所の切断のうち、Ｎｏｔｃｈ－βペプチドを産生するＳ４部位でのタンパク質分解と、シグナル伝達量を規定するNICDを産生するＳ３切断との関係について検討を行うために、この実施例では、Ｓ３部位でのタンパク質分解を阻害する突然変異体を作成し、人工的にＳ３部位での切断効率を減少させた場合でも、Ｓ４での切断効率は変化しないことを確認した。

Ｎｏｔｃｈ-1のＳ３切断部位のＣ末端側にあるＶ１７４４を変異させると、Ｓ３での切断が部分的に阻害されることが報告されている(Schroeter et al., Nature, 1998)。このことから、まず、Ｓ３部位での切断を阻害した場合における、Ｓ４切断活性の変化について検討を行った。膜内タンパク質分解による生成物を効率よく認識するために、NEXT類縁体のＮ末端側にFLAGタグを、そしてＣ末端側にmycタグをつけ、ついで、前記類縁体を発現するプラスミド(F-NEXT; Okochi, 2002)のバリン１７４４をグリシンまたはロイシンに変異させた(以下、F-NEXT Ｖ１７４４GおよびF-NEXT Ｖ１７４４Ｌという)(図８（Ｂ））。Ｓ３切断部位の突然変異を持つあるいは持たないF-NEXT発現コンストラクトを、野生型ＰＳ１またはγ-セクレターゼ機能を欠いたＰＳ１ Ｄ３８５Ｎを恒常的に過剰発現させたＫ２９３細胞に安定的に感染させた。そしてそれらの細胞を^{35}Sメチオニンでのメタボリック・ラベル実験を行い、その細胞沈査中およびそれに対応する細胞培養上清中の放射線標識された新規のF-NβおよびNICDを、免疫沈降法および電気泳動による分離後の放射線量測定を組み合わせて検出した（IP-autoradiography）。

前記細胞沈査に３０分間パルス刺激を与え、抗ｃ－ｍｙｃ抗体（9E10）でIP-autoradiographyを行ったところ、F-NEXTの発現が認められた。

さらにその細胞を２時間チェイスしたところ、F-NEXTの分解によるNICD生成が認められたが、Ｖ１７４４ＧおよびＶ１７４４Ｌ変異体では有意に阻害されていた（図８（Ｃ）の上パネル）。この結果は、今までの報告と同一であった。プロテアゾーム阻害薬であるラクタシスチンを加えることでNICDの分解を阻害した場合においても、Ｖ１７４４Ｇ変異体発現細胞およびＶ１７４４Ｌ変異体発現細胞における２時間チェイス後の放射線標識されたNICD量は、有意に少なかった。このF-NEXTによる膜内タンパク質分解およびNICD生成は、ＰＳ１ Ｄ３８５Ｎ発現細胞では完全に消失した（図８（Ｃ）の下パネル）。これらのことより、図８（Ｃ）の上パネルで認められたタンパク質分解が、PS/γ-セクレターゼにより生じたといえる。

つぎに、２時間チェイス後の細胞培養上清を、抗FLAG抗体（Ｍ２）を用いて解析した。F-NEXT Ｖ１７４４Ｇ変異体発現細胞およびF-NEXT Ｖ１７４４Ｌ変異体発現細胞から分泌されたF-Nβは、野生型F-NEXT発現細胞からのそれとほぼ同じレベルであった（図８（Ｄ））。また、ＰＳ１ Ｄ３８５Ｎ変異体発現細胞からはF-Nβの生成は認められなかった。以上のことから、PS/γ-セクレターゼが、この切断に影響を及ぼすといえる。

これらの結果をさらに強固にするために、Ｓ３およびＳ４切断の効率を算出した。細胞沈査中のF-NEXT類縁体に対するNICDの割合、および細胞沈査中のF-NEXT類縁体に対する細胞培養上清中のF-Nβの量比を測定した。その結果、野生型に比較してＶ１７４４Ｇ変異体およびＶ１７４４Ｌ変異体は、共にＳ３切断活性を低下させるが、Ｓ４切断活性には影響を及ぼさないことが確認された（図８（Ｅ））。

（実施例７）

Ｓ３切断効率の低下とＳ４切断の正確さとの関係

アルツハイマー病の原因となるＰＳ１の突然変異体では、Ｓ４切断の正確さの変化と共にＳ３切断の活性の減少が起こる。Ｓ３切断がＳ４切断の前提条件であるならば、ＰＳ１の突然変異体によるＳ３切断効率の減少がＳ４切断の正確さに影響を及ぼすと考えた。そこで、この実施例では、Ｓ３切断部位の突然変異体を作成し、人工的にＳ３での切断効率を減少させた場合においても、Ｓ４での切断の正確さが変化しないことを確認した。

PSの家族性アルツハイマー病（FAD）型変異体が、PS/γ-セクレターゼによるタンパク質分解の正確さに影響を及ぼし、さらに延長型Aβであ るAβ42の産生を増大させることが、FAD発症の原因となっていると考えられている。同様に、PSのFAD変異体は、PS/γ-セクレターゼによるＮｏｔｃｈの切断の正確さに影響を及ぼし、延長型F-Nβの産生を増大させる。さらに、いくつかのPS変異体が、Ｓ３切断効率を減少させることが報告されている。そこで、Ｓ３切断効率を減少させるＳ３変異体のＳ４切断の正確さへの影響について検討を行った。野生型F-NEXT発現細胞、F-NEXT Ｖ１７４４Ｇ変異体発現細胞またはF-NEXT Ｖ１７４４Ｌ変異体発現細胞の細胞培養上清中のF-Nβを、Ｍ２－アガロースを用いて免疫沈降し、MALDI-TOF/MSで解析した。この結果、図９（Ｂ）および（Ｃ）に示したとおり、F-NEXT Ｖ１７４４Ｇ変異体およびＶ１７４４Ｌ変異体では、野生型と同じく、アラニン１７３１とアラニン１７３２との間が主な切断部位であって、幾つかに分散する副次的なＳ４切断のパターンにはなんら影響を及ぼさなかった。すなわち、Ｓ３切断を減少させる変異は、Ｓ４切断部位の正確さに何ら影響を及ぼさないことが確認

された。このことより、ＦＡＤ型のＰＳ変異が、間接的にＳ４切断の正確さに影響を与えていると考えられた。

（実施例８）

Ｓ４切断効率の減少のＳ３切断効率への影響

Ｓ４切断部位変異体が、前述のＳ３の人工的点突然変異体と同様の効果を発揮するのではないかと考え、Ｓ４切断部位周辺の４つのアラニン残基をグリシン残基またはロイシン残基に変異させたF-NEXT Ｇ１７３０－１７３３変異体およびＬ１７３０－１７３３変異体（図１０（Ａ））を作成し、Ｓ４切断効率の減少のＳ３切断効率への影響について検討を行った。その結果、Ｓ４切断部位変異体のうちＳ４切断活性を阻害したＬ１７３０－１７３３変異体では、Ｓ３切断効率が減少した。この結果は、Ｎｏｔｃｈ－１の膜内タンパク質分解において、Ｓ４切断に依存的なＳ３タンパク質分解によりNICDが産生されるタンパク質分解経路が存在することを示している。

つぎに、Ｓ４切断についてもＳ４切断部位変異体が同様の効果を発揮するのではないかと考えた。図１０（Ａ）中の三角矢印で示すように、ＮｏｔｃｈのＳ４切断部位は４つの連続するアラニン残基のちょうど中間に位置する。この４つのアラニン残基をグリシン残基またはロイシン残基に変異させたF-NEXT Ｇ１７３０－１７３３およびＬ１７３０－１７３３を作成した。Ｓ３変異体の場合と同様に、パルスーチェイス実験を行った。2時間チェイス後の細胞培養上清中の放射線標識されたF-Nβについて検討を行った。野生型およびＳ４変異型F-NEXTを発現させた細胞から、F-Nβの分泌が観察された（図１０（Ｂ））。しかしながら、新規のF-Nβ産生量は、野生型に比較してF-NEXT Ｇ１７３０－１７３３変異

体では殆ど変化がなかったが、F-NEXT Ｌ１７３０－１７３３変異体では減少しているように見えた（図１０（Ｂ））。

つぎに、対応する細胞沈査中に含まれるF-NEXTからの放射線標識されたNICD生成について検討を行った。その結果、Ｇ１７３０－１７３３変異体発現細胞では、野生型F-NEXT発現細胞と同程度のNICD生成が認められたのに対し、Ｌ１７３０－１７３３変異体発現細胞でのNICD生成は、野生型に比較して減少した（図１０（Ｃ）の上パネル）。このことから、Ｌ１７３０－１７３３変異体では、Ｓ３切断が阻害されていることが考えられた。

この結果を立証するために図８（Ｅ）と同様の方法でＳ４／Ｓ３効率を計算した。その結果、Ｓ４変異体のうち、Ｓ４活性にほとんど影響を与えなかったＧ１７３０－１７３３変異体は、Ｓ３切断活性に何の影響も与えなかった（図１０（Ｄ））。ところが、Ｓ４活性を阻害したＬ１７３０－１７３３変異体は、Ｓ３切断効率を減少させることが確認された（図１０（Ｄ））。また、PS/γ－セクレターゼ機構は、Ｓ３／Ｓ４のどちらの部位でも切断し、膜貫通部分の細胞膜近傍での切断であるＳ３切断とそのほぼ中央部分での切断であるＳ４切断との間の中間分解物が見つかっていないことから、Ｓ３部位とＳ４部位とが、ほぼ同時に切断されることが考えられた。これらのことから、Ｎｏｔｃｈ－１の膜内タンパク質分解において、Ｓ４切断に依存的なＳ３タンパク質分解によりNICDが産生されるタンパク質分解経路が存在すると考えられる。

（実施例９）

Ｓ４切断部位と活性との関係

続いて、F-Nβ Ｇ１７３０－１７３３およびF-Nβ Ｌ１７３０－１７３３のＣ末端を決定した。F-NEXT Ｇ１７３０－１７３３から放出されるF-Nβ量は、野生型F-NEXT発現細胞からのそれとほぼ同等であった（図１０（Ｂ））が、図１１（Ａ）の逆三角で示すように、Ｇ１７３０－１７３３変異体のＳ４切断部位は、グリシン１７３１とグリシン１７３２の間ではなかった。この変異体の主なＳ４切断部位は、４つ連続するグリシン残基のＣ末端側に移動し、フェニルアラニン１７３４とバリン１７３５の間、バリン１７３５とロイシン１７３６の間、フェニルアラニン１７３８とバリン１７３９の間に位置していた。すなわち、Ｓ４切断は、グリシン残基の前後で起こらず、副次的な切断部位が、４つのグリシンのＮ末端側に分布し、F-NEXT Ｇ１７３０－１７３３から放出されるF-Nβの分子量は増加した（図１０（Ｂ））。また、F-NEXT Ｌ１７３０－１７３３変異体の主要なＳ４切断部位は、図１１（Ｂ）の逆三角で示すように、野生型F-NEXTと同様のトポロジーの４つの連続するロイシン残基の中間、すなわちロイシン１７３１とロイシン１７３２の間であり、副次的な切断部位は、殆ど認められなかった。また、F-NEXT Ｌ１７３０－１７３３変異体から放出されるF-Nβの分子量は減少した（図１０（Ｂ））。

産業上の利用可能性

以上のように、本発明の新規ポリペプチドは、Ｎｏｔｃｈタンパク質由来であり、前記Ｎｏｔｃｈタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外におけるタンパク質分解に続く膜内タンパク質分解によりNICDが核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。この新規ポリペプチドをマーカーとすることにより、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達を検出することができ、例えば、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトー

シス、アルツハイマー病等を検出することもできる。

請求の範囲

1．　Ｎｏｔｃｈタンパク質由来の新規ポリペプチドであり、前記Ｎｏｔｃｈタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解によりNICD(Ｎｏｔｃｈ intracellular cytoplasmic domain)が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド。

2．　Ｎｏｔｃｈシグナル伝達に比例して細胞外に放出される請求の範囲１記載のポリペプチド。

3．　細胞外への放出が、プレセニリン依存的タンパク質分解により生ずる請求の範囲１または２記載のポリペプチド。

4．　Ｎｏｔｃｈタンパク質において、Ｓ３でのタンパク質分解と同時若しくはこれと前後しておこる、Ｓ３よりＮ末端側の細胞膜貫通部分でのタンパク質分解（Ｓ４切断）により、生じて放出される請求の範囲１から３のいずれかに記載のポリペプチド。

5．　Ｎｏｔｃｈタンパク質において、Ｓ３よりＮ末端側の部分でのタンパク質分解部位（Ｓ４）が、細胞膜貫通部分のアミノ酸残基部分である請求の範囲４記載のポリペプチド。

6．　配列番号１から配列番号１８の少なくとも一つの配列番号のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

７．　配列番号１から配列番号１８の少なくとも一つの配列番号のアミノ酸配列において、１個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、Ｎｏｔｃｈタンパク質由来であり、前記Ｎｏｔｃｈタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解によりNICDが核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド。

８．　Ｎｏｔｃｈシグナルに比例して細胞外に放出される請求の範囲７記載のポリペプチド。

９．　細胞外への放出が、プレセニリン（Presenilin）依存的タンパク質分解により生じる請求の範囲７または８記載のポリペプチド。

１０．　請求の範囲１から９のいずれかに記載のポリペプチドを含むバイオマーカー。

１１．　Ｎｏｔｃｈシグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病からなる群から選択される少なくとも一つを検出するための請求の範囲１０記載のバイオマーカー。

１２．　請求の範囲１から９のいずれかに記載のポリペプチドを認識可能な抗体。

１３．　モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体である請求の範囲１２記載の抗体。

１４．　Ｎｏｔｃｈシグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病からなる群から選択される少なくとも一つを検出する試薬であって、請求の範囲１２または１３記載の抗体を含む試薬。

１５．　請求の範囲１から９に記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

１６．　ＤＮＡ若しくはＲＮＡである請求の範囲１５記載の遺伝子。

１７．　請求の範囲１５または１６記載の遺伝子を組み込んだベクター。

１８．　請求の範囲１７記載のベクターにより形質転換された形質転換体。

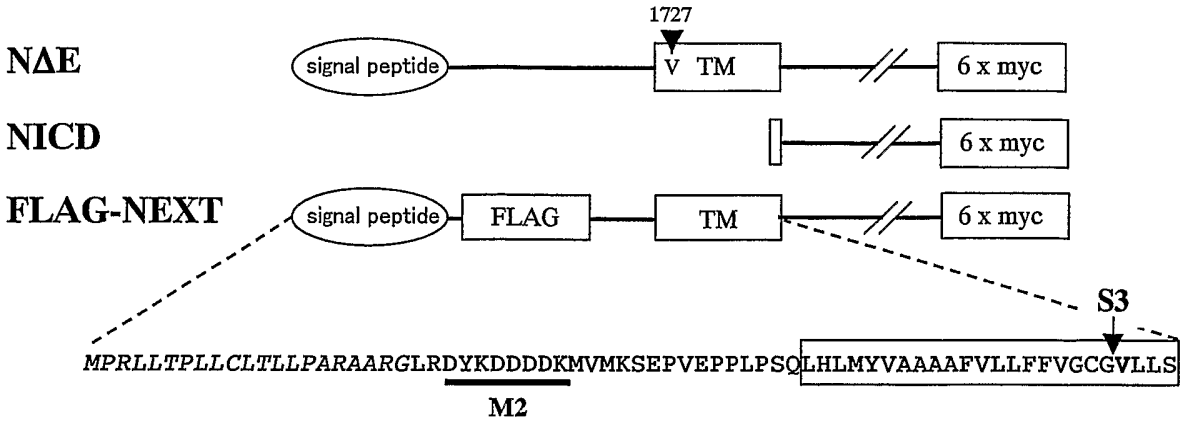


FIG.1A

FIG.1B

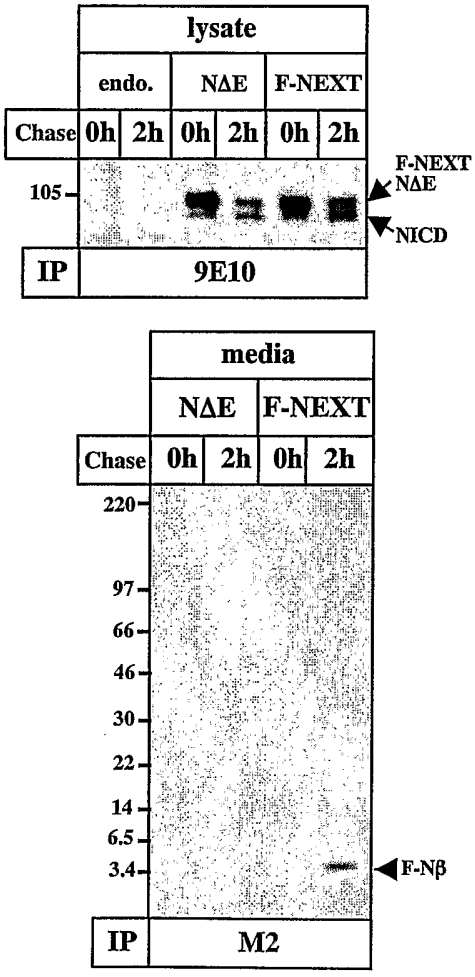
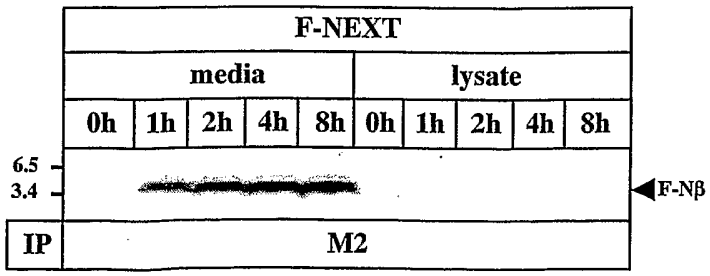


FIG.1C



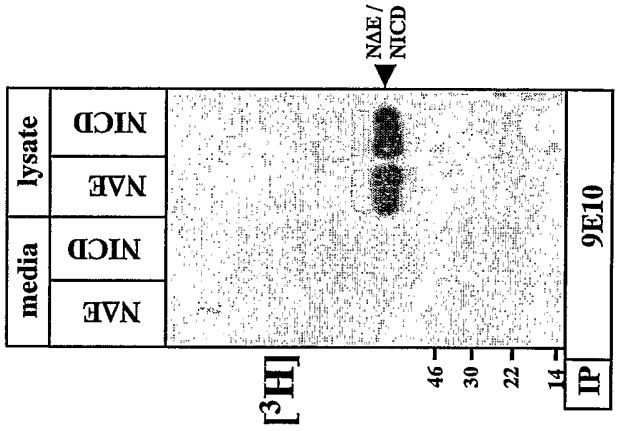

NΔE / NICD
lysate
media
NICD
NΔE
NICD
NΔE
[3H]
46
30
22
14
IP
9E10

FIG.2B

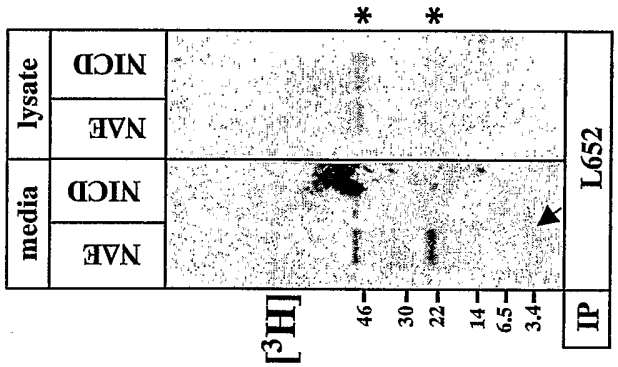

*
*
lysate
media
NICD
NΔE
NICD
NΔE
[3H]
46
30
22
14
6.5
3.4
IP
L652

FIG.2A

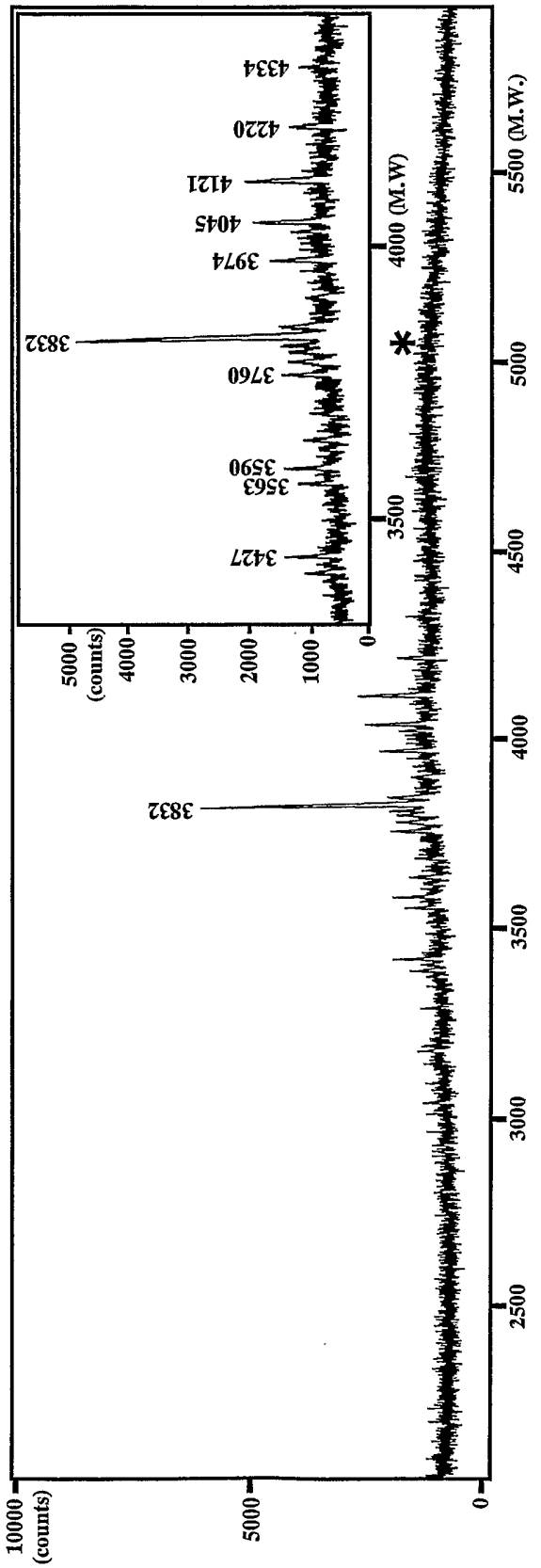

10000 (counts)
5000
0
2500
3000
3500
4000
4500
5000
5500 (M.W.)
3832
5000 (counts)
4000
3000
2000
1000
0
3500
4000 (M.W)
3427
3563
3590
3760
3832
3974
4045
4121
4220
4334

FIG.3A

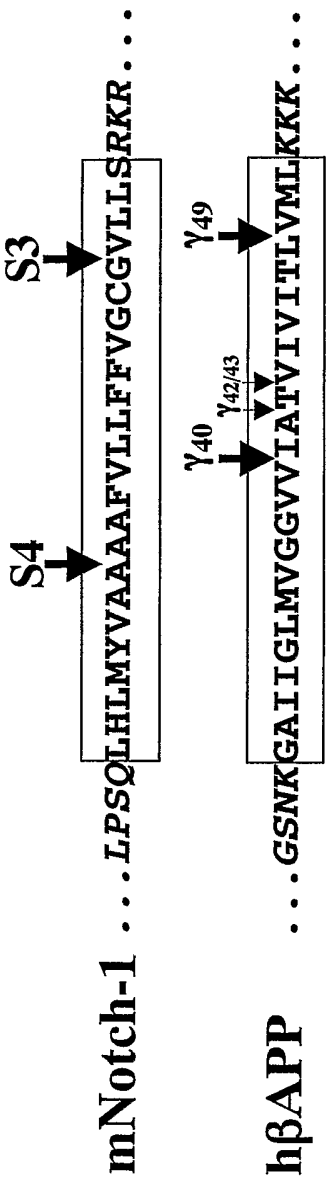

S3
S4
mNotch-1 ...LPSQLHLMYVAAAAFVLLFFVGCGVLLSRKR...
γ49
γ40
γ42/43
hβAPP ...GSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKK...

FIG.3B

FIG.4A

	TM	
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVAAAAFVLLFFVGCG^{1743}-C	(M.W.5057.67)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVAAAAFVL^{1736}-C	(M.W.4333.81)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVAAAAFV^{1735}-C	(M.W.4220.66)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVAAAAF^{1734}-C	(M.W.4121.53)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVAAAA^{1733}-C	(M.W.3974.36)
N-RGLRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVAA^{1731}-C	(M.W.4045.45)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	**LHLMYVAA^{1731}-C**	**(M.W.3832.22)**
N-DYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVAA^{1731}-C	(M.W.3562.89)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMYVA^{1730}-C	(M.W.3761.15)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLMY^{1728}-C	(M.W.3590.95)
N-LRDYKDDDDKMVMKSEPVEPPLPSQ	LHLM^{1727}-C	(M.W.3427.78)

FIG.4B

	TM
mNotch-1	LHLMYVAA▼AAFVLLFFVGCG-▼VLL
hNotch-1	LHFMYVAA-AAFVLLFFVGCG--VLL
mNotch-2	--LLYLLA-VAVVIILFFILLG-VIMA
hNotch-2	--LLYLLA-VAVVIILFIILLG-VIMA
mNotch-3	--LLPLLV-AGAVFLLIIFILG-VMVA
hNotch-3	--LLPLLV-AGAVLLLVILVLG-VMVA
mNotch-4	--ILCSPV-VG-VLLLALGALL-VLQLI
hNotch-4	--VLCSPV-AG-VILLALGALL-VLQLI
hβAPP	GAIIGLMVGGVV▼IATVI-VITL▼VML

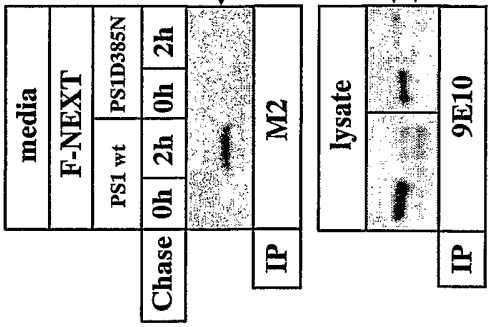

media
F-NEXT
PS1 wt
PS1D385N
Chase
0h
2h
0h
2h
IP
M2
F-Nβ
lysate
F-NEXT
NICD
IP
9E10

FIG.5A

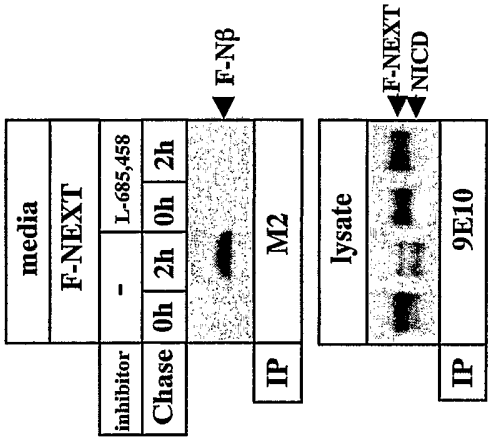

media
F-NEXT
inhibitor
-
L-685,458
Chase
0h
2h
0h
2h
IP
M2
F-Nβ
lysate
F-NEXT
NICD
IP
9E10

FIG.5B

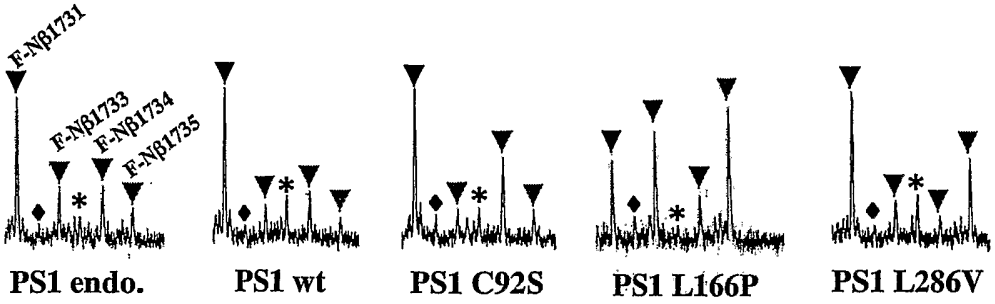


FIG.6A

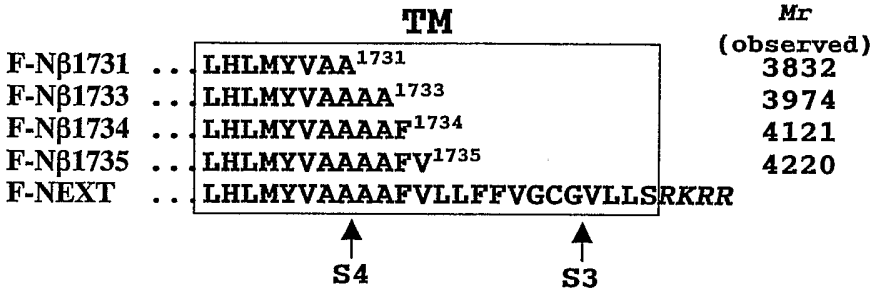


FIG.6B

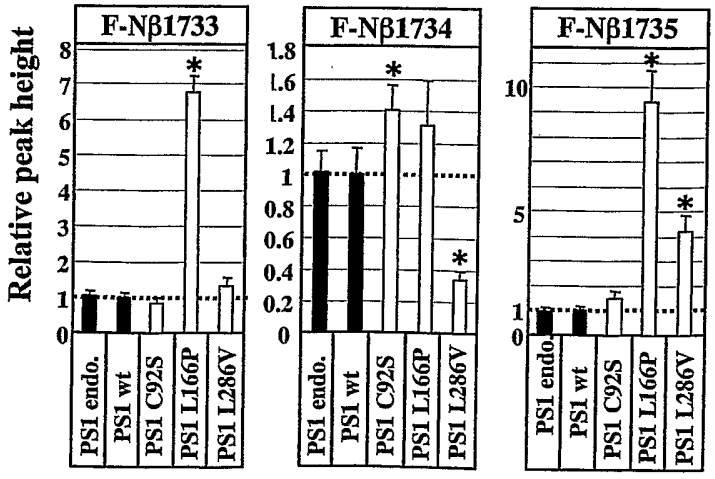


FIG.6C

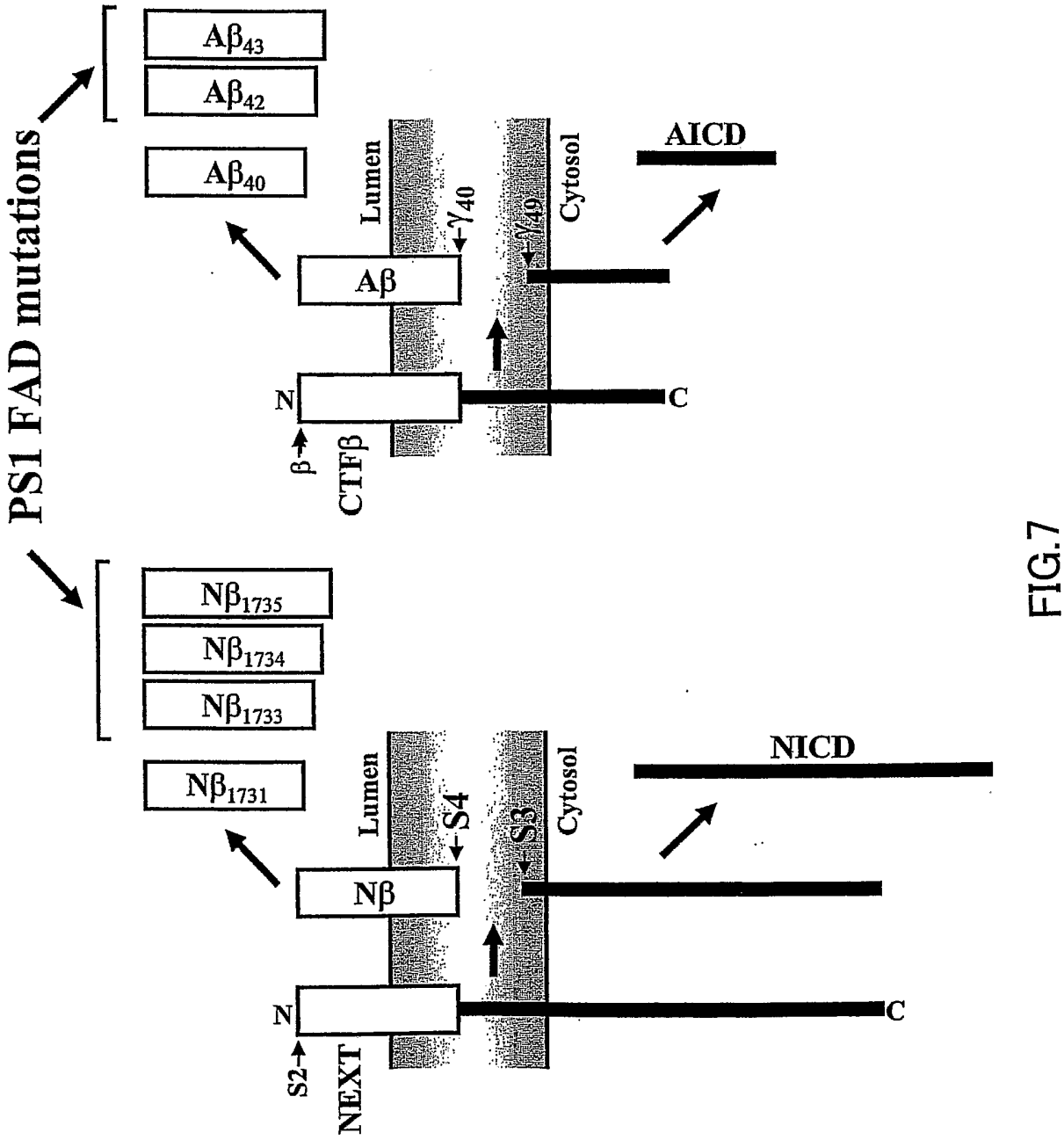

PS1 FAD mutations
Aβ43
Aβ42
Aβ40
Lumen
γ40
γ49
Cytosol
AICD
Aβ
N
C
β
CTFβ
Nβ1735
Nβ1734
Nβ1733
Nβ1731
S4
S3
NICD
Nβ
S2
NEXT

FIG.7

FIG.8A

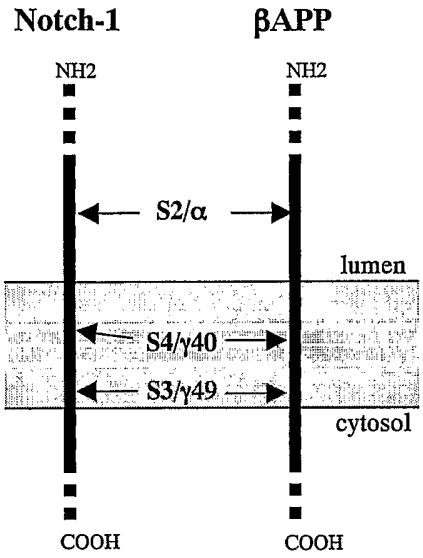


FIG.8B

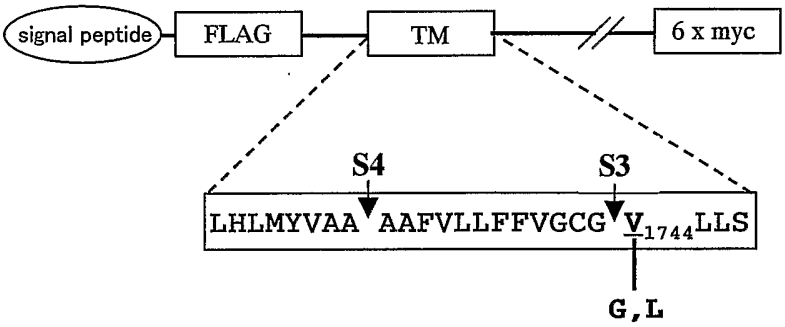


FIG.8C

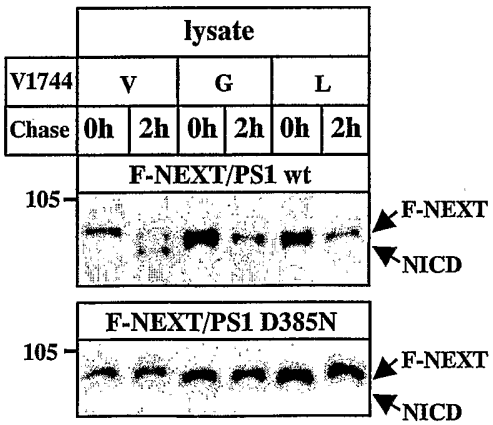
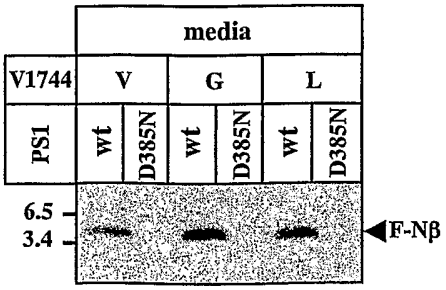


FIG.8D



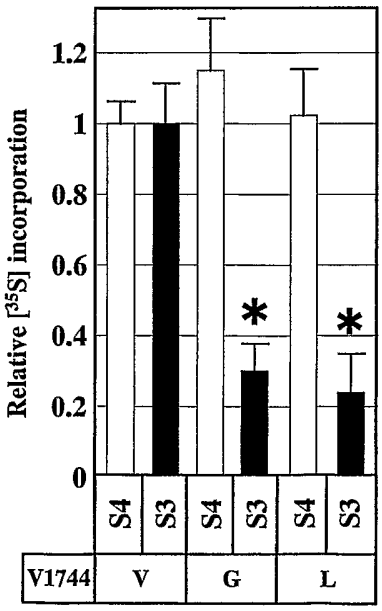


FIG.8E

FIG.9A

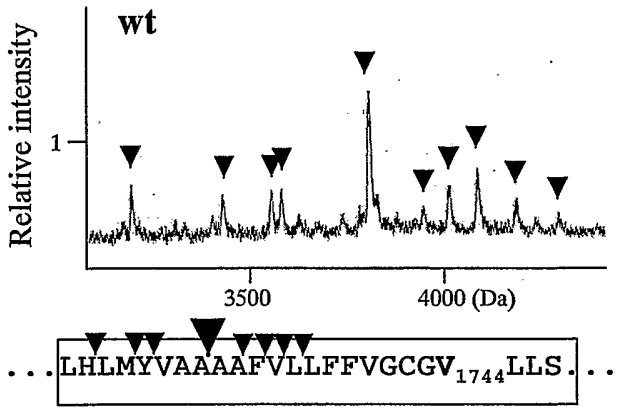


FIG.9B

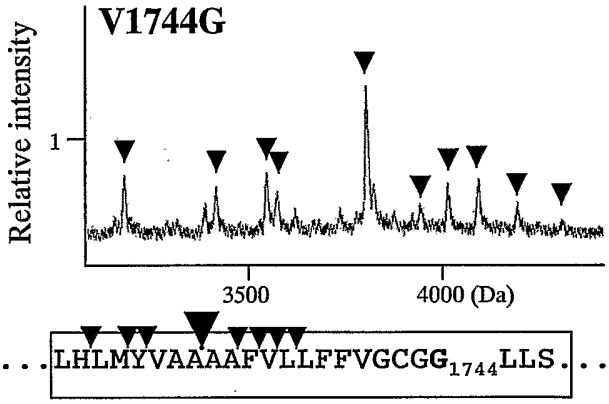
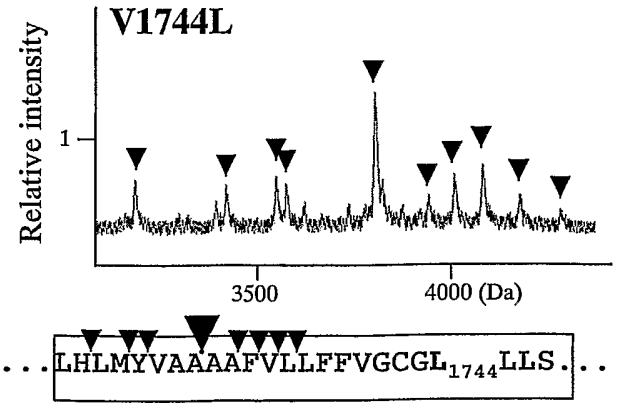


FIG.9C



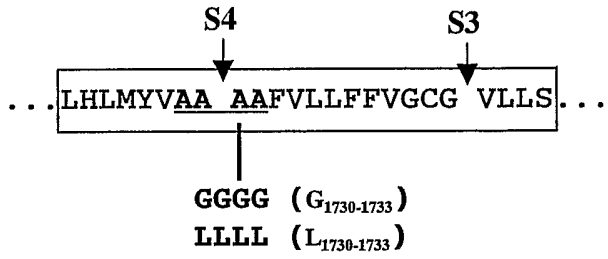


FIG.10A

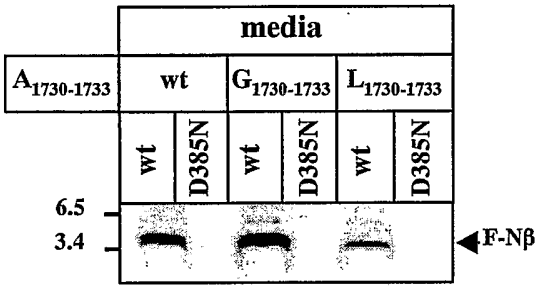


FIG.10B

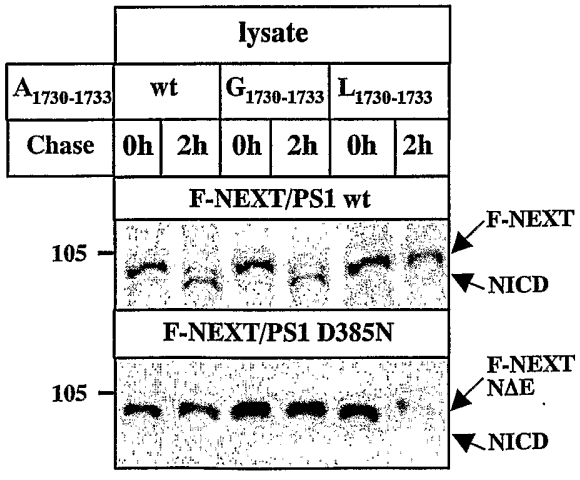


FIG.10C

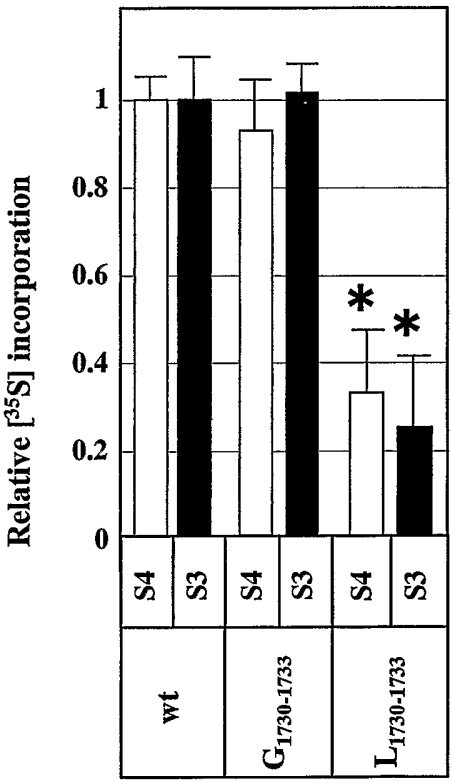


FIG.10D

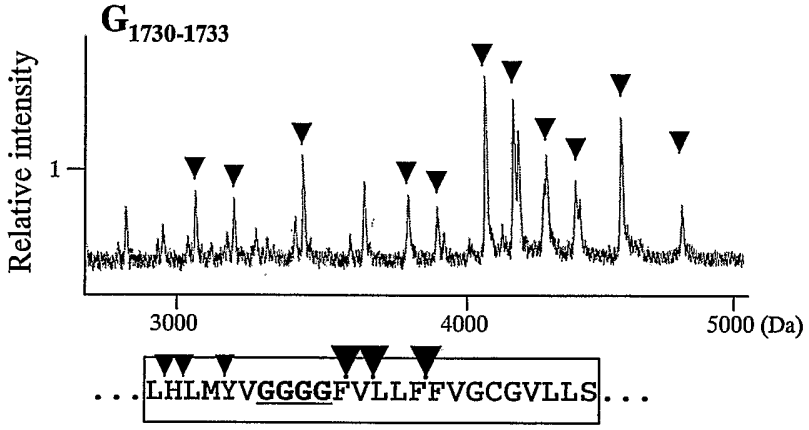


FIG.11A

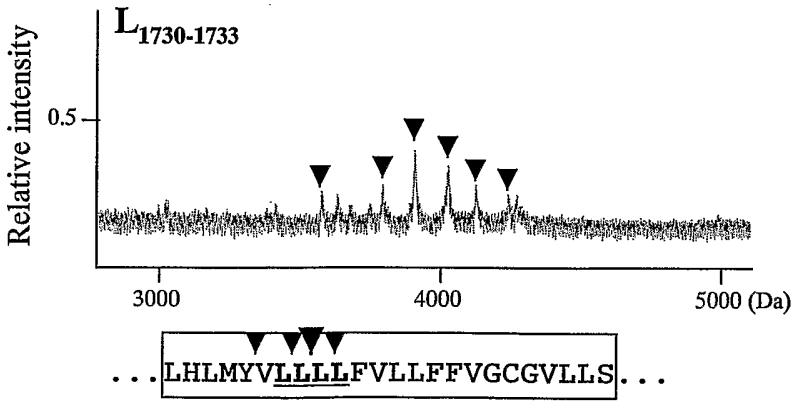


FIG.11B

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka Industrial Promotion Organization

<120> New polypeptide originated from Notch

<150> JP2002-210040

<151> 2002-07-18

<160> 22

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> mouse

<400> 1

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr
1 5 10 15

Val Ala Ala
20

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met

1 5 10 15

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala

20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> mouse

<400> 5

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala

20

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala

20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> mouse

<400> 7

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe

20

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> mouse

<400> 8

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val
20 25

<210> 9

<211> 26

<212> PRT

<213> mouse

<400> 9

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu
20 25

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> human

<400> 10

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met
1 5 10 15

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> human

<400> 11

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 12

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala

20

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> human

<400> 13

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala

20

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> human

<400> 14

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala

20

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> human

<400> 15

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala

20

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> human

<400> 16

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe
20

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> human

<400> 17

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val
20 25

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> human

<400> 18

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu
20 25

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 19

atcgtcgtcc ttgtagtctc tcaagcctct tgcgccgagc gcgggcagca gcgttag 57

<210> 20

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 20

gacaagatgg tgatgaagag tgagccggtg gagcctccgc tgccctcgca gctg 54

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 21

cctcgcagct gcacctcatg tacgtggcag cg 32

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 22

cgctgccacg tacatgaggt gcagctgcga 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

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)
Int.Cl[7] C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

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(DIALOG), WPI(DIALOG), CA(STN), REGISTRY(STN), JSTPlus(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Merlos-Suarez A. et al., Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing., J.Biol.Chem., 1998, Vol.273, No.38, p.24955-62	1-18
A	Schlondorff J. et al., Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding., J.Cell. Sci., 1999, Vol.112, No.Pt 21, p.3603-17	1-18
A	Chan YM et al., Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction., Cell, 1998, Vol.94, No.4, p.423-6	1-18

[X] 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 document 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	Date of mailing of the international search report
01 October, 2003 (01.10.03)	14 October, 2003 (14.10.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09059

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Brou C. et al., A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE., Mol.Cell., 2000, Vol.5, No.2, p.207-16	1-18

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０９０５９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int Cl[7]　C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

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[7]　C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

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（ＤＩＡＬＯＧ），ＷＰＩ（ＤＩＡＬＯＧ），ＣＡ（ＳＴＮ），ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ），
ＪＳＴＰｌｕｓ（ＪＯＩＳ）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Merlos-Suarez A et al, Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing., J Biol Chem., 1998, Vol. 273, No. 38, p. 24955-62.	１－１８
A	Schlondorff J et al, Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding., J Cell Sci., 1999, Vol. 112 , No. Pt 21, p. 3603-17.	１－１８

☒ 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	国際調査報告の発送日
０１．１０．０３	14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	六笠　紀子　印	４Ｂ	９７３５
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Chan YM et al, Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction., Cell, 1998, Vol. 94, No. 4, p. 423-6.	１－１８
A	Brou C et al, A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE., Mol Cell., 2000, Vol. 5, No. 2, p. 207-16.	１－１８