

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4504463号
(P4504463)

(45) 発行日 平成22年7月14日(2010.7.14)

(24) 登録日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 2

請求項の数 22 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-532055
(86) (22) 出願日	平成8年4月29日(1996.4.29)
(65) 公表番号	特表平11-504214
(43) 公表日	平成11年4月20日(1999.4.20)
(86) 國際出願番号	PCT/CA1996/000263
(87) 國際公開番号	W01996/034099
(87) 國際公開日	平成8年10月31日(1996.10.31)
審査請求日	平成15年3月12日(2003.3.12)
(31) 優先権主張番号	08/431,048
(32) 優先日	平成7年4月28日(1995.4.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	08/496,841
(32) 優先日	平成7年6月28日(1995.6.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	501422277 エイチエスシー リサーチ アンド ディ ベロップメント リミテッド H S C R e s e a r c h a n d D e v e l o p m e n t L i m i t e d カナダ国 エム5ジー 1エックス8 オ ンタリオ トロント ユニヴァーシティー アヴェニュー 555
(73) 特許権者	507253613 ザ ガバーニング カウンシル オブ ザ ユニバーシティ オブ トロント カナダ国 エム5エス 1エイ1 オンタ リオ, トロント, キングス カレッジ サークル 27, シンコー ホール 1 O 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アルツハイマー病に関連する遺伝子配列およびタンパク質、ならびにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) (a) 配列番号2のヒトプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質；
 (b) 配列番号4のヒトプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質；
 (c) 配列番号17のマウスプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質、
 から選択されるプレセニリン-1タンパク質、および
 (ii) タンパク質(a)、(b)または(c)のアミノ酸配列に少なくとも90%同一
 なアミノ酸配列からなるプレセニリン-1タンパク質、
 をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

【請求項 2】

タンパク質(a)、(b)または(c)のアミノ酸配列に少なくとも95%同一なアミノ
 酸配列からなるプレセニリン-1タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求
 項1に記載の単離された核酸。

10

【請求項 3】

前記核酸が、

- (a) 配列番号2のヒトプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする配列；
- (b) 配列番号4のヒトプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする配列；
- (c) 配列番号17のマウスプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする配

20

列；

(d) プレセニリン-1タンパク質をコードする配列であって、配列番号2のアミノ酸配列において残基257がアラニンにより置換されており、そして残基258～290が削除されているアミノ酸配列を含む、配列；

(e) プレセニリン-1タンパク質をコードする配列であって、配列番号4のアミノ酸配列において残基253がアラニンにより置換されており、そして残基254～286が削除されているアミノ酸配列を含む、配列；および

(f) プレセニリンタンパク質をコードする配列であって、そして高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で(a)～(e)の任意の配列に相補的な配列にハイブリダイズし得る配列；

からなる群より選択される、請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項4】

変異プレセニリン-1タンパク質をコードする単離された核酸であって、該核酸は、

(a) 配列番号2のヒトプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする配列；

(b) 配列番号4のヒトプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする配列；

(c) 配列番号17のマウスプレセニリン-1アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする配列；

(d) プレセニリン-1タンパク質をコードする配列であって、配列番号2のアミノ酸配列において残基257がアラニンにより置換されており、そして残基258～290が削除されているアミノ酸配列を含む、配列；

(e) プレセニリン-1タンパク質をコードする配列であって、配列番号4のアミノ酸配列において残基253がアラニンにより置換されており、そして残基254～286が削除されているアミノ酸配列を含む、配列；

(f) プレセニリンタンパク質をコードする配列であって、そして高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で(a)～(e)の任意の配列に相補的な配列にハイブリダイズし得る配列；

からなる群より選択されるヌクレオチド配列において、Ala79の別のアミノ酸への変異、V82L、V96F、Y115H、M139T、M139V、I143T、M146L、M146V、H163R、H163Y、L171P、G209V、I211T、A231T、A246E、A260V、C263R、P264L、P267S、E280A、E280G、A285V、L286V、291-319、G384A、L392V、およびC410Yからなる群より選択される配列番号2の変異に対応する変異からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

【請求項5】

配列番号1、配列番号3、配列番号16、およびこれらの任意の配列に相補的な配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項6】

前記核酸が、

配列番号1、配列番号3、配列番号16、およびこれらの任意の配列に相補的な配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列において、Ala79から別のアミノ酸への変異、V82L、V96F、Y115H、M139T、M139V、I143T、M146L、M146V、H163R、H163Y、L171P、G209V、I211T、A231T、A246E、A260V、C263R、P264L、P267S、E280A、E280G、A285V、L286V、291-319、G384A、L392V、およびC410Yからなる群より選択される配列番号2の変異に対応する変異からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有するヌクレオチド配列を含む、請求項2に記載の単離された核酸。

【請求項7】

単離された核酸であって、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、および配列番号15からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

単離された核酸であって、ATCC受託番号97124およびATCC受託番号97428からなる群より選択されるプラスミド内へのプレセニリン挿入によりコードされるポリペプチドをコードするスクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の単離された核酸を含む、組換えベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

プレセニリン - 1 タンパク質であって、

10

- (a) 配列番号 2 のヒトプレセニリン - 1 アミノ酸配列を含むタンパク質；
- (b) 配列番号 4 のヒトプレセニリン - 1 アミノ酸配列を含むタンパク質；
- (c) 配列番号 17 のマウスプレセニリン - 1 アミノ酸配列を含むタンパク質；
- (d) タンパク質 (a)、(b) または (c) のアミノ酸配列に少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列からなるタンパク質、

から選択される、タンパク質。

【請求項 12】

タンパク質 (a)、(b) または (c) のアミノ酸配列に少なくとも 95 % 同一なアミノ酸配列からなるタンパク質である、請求項 1_1 の (d) に記載のプレセニリン - 1 タンパク質。

20

【請求項 13】

前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において残基 257 がアラニンにより置換されており、そして残基 258 ~ 290 が削除されているアミノ酸配列を含む、プレセニリン - 1 タンパク質；および

(b) 配列番号 4 のアミノ酸配列において残基 253 がアラニンにより置換されており、そして残基 254 ~ 286 が削除されているアミノ酸配列を含む、プレセニリン - 1 タンパク質；からなる群より選択されるプレセニリンタンパク質を含む、請求項 1_1 に記載のタンパク質。

【請求項 14】

30

前記タンパク質が、

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 4 のアミノ酸配列；
- (c) 配列番号 17 のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 2 のアミノ酸配列において残基 257 がアラニンにより置換されており、そして残基 258 ~ 290 が削除されているアミノ酸配列；

(e) 配列番号 4 のアミノ酸配列において残基 253 がアラニンにより置換されており、そして残基 254 ~ 286 が削除されているアミノ酸配列；

からなる群より選択されるアミノ酸配列において、Ala79 の別のアミノ酸への変異、V82L、V96F、Y115H、M139T、M139V、I143T、M146L、M146V、H163R、H163Y、L171P、G209V、I211T、A231T、A246E、A260V、C263R、P264L、P267S、E280A、E280G、A285V、L286V、-319、G384A、L392V、および C410Y からなる群より選択される配列番号 2 の変異に対応する変異からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1_1 に記載のタンパク質。

40

【請求項 15】

プレセニリン - 1 遺伝子の発現を調節し得る化合物の同定方法であって、以下の工程：細胞を候補化合物と接触させる工程、ここで、該細胞がコード領域に作動可能に連結された請求項 1 ~ 1_4 のいずれか 1 項において規定されるプレセニリン - 1 遺伝子の調節領域を含む；および

該コード領域の発現の変化を検出する工程；

50

を包含する、方法。

【請求項 1 6】

プレセニリン - 1 タンパク質に選択的に結合し得る化合物の同定方法であって、以下の工程：

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項において規定される少なくとも 1 つのプレセニリン - 1 成分を含む調製物を提供する工程；

該調製物を、少なくとも 1 つの候補化合物を含有するサンプルと接触させる工程；および該候補化合物への該プレセニリン成分の結合を検出する工程；
を包含する、方法。

【請求項 1 7】

10

プレセニリン - 1 の活性を調節し得る化合物の同定方法であって、以下の工程：

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項において規定されるプレセニリン - 1 または変異プレセニリン - 1 遺伝子を発現する細胞を提供する工程；

該細胞を、少なくとも 1 つの候補化合物と接触させる工程；および該活性のマーカーの変化を検出する工程；
を包含する、方法。

【請求項 1 8】

被験体が請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項において規定される変異プレセニリン - 1 遺伝子を有するかどうかを決定するための診断の補助方法であって、以下の工程：

該被験体由来の生物学的サンプル中に変異プレセニリン - 1 核酸、変異プレセニリン - 1 タンパク質、または変異プレセニリン - 1 活性を検出する工程；
を包含する、方法。

20

【請求項 1 9】

(a) 請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項において規定されるプレセニリン - 1 タンパク質；

(b) 請求項 1 ~ 8 のいずれかにおいて規定されるプレセニリン - 1 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸；

(c) プレセニリン - 1 タンパク質を作動可能にコードし、請求項 1 ~ 8 のいずれかにおいて規定される核酸を含む発現ベクターであって、該発現ベクターはヒト被験体において該プレセニリン - 1 タンパク質を発現し得る、発現ベクター；および

30

(d) 請求項 1 ~ 8 のいずれかにおいて規定される核酸のプレセニリン - 1 アンチセンス配列を作動可能にコードする発現ベクターであって、該発現ベクターは、ヒト被験体において該プレセニリン - 1 アンチセンス配列を発現し得る、発現ベクター、
からなる群より選択される活性成分を含む、薬学的組成物。

【請求項 2 0】

哺乳動物プレセニリン - 1 タンパク質の生産方法であって、請求項 1 0 に記載の宿主細胞を、該プレセニリン - 1 タンパク質の発現に適切な条件下で培養する工程を包含する、方法。

【請求項 2 1】

被験体が変異プレセニリン - 1 遺伝子を有するかどうかを決定するための診断のためのキットであって、

40

(a) 請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかにおいて規定されるプレセニリン - 1 タンパク質；

(b) 請求項 1 ~ 8 のいずれかにおいて規定されるプレセニリン - 1 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸；

(c) プレセニリン - 1 タンパク質を作動可能にコードし、請求項 1 ~ 8 のいずれかにおいて規定される核酸を含む発現ベクターであって、該発現ベクターは、ヒト被験体において該プレセニリン - 1 タンパク質を発現し得る、発現ベクター；および

(d) 請求項 1 ~ 8 のいずれかにおいて規定される核酸のプレセニリン - 1 アンチセンス配列を作動可能にコードする発現ベクターであって、該発現ベクターは、ヒト被験体において該プレセニリン - 1 アンチセンス配列を発現し得る、発現ベクター、

50

から選択されるキット成分を含む、キット。

【請求項 22】

非ヒトトランスジェニック動物であって、該動物またはその祖先のゲノムが、

(a) 請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の核酸の挿入；

(b) 請求項 1 1 ~ 14 のいずれかに記載のタンパク質をコードする核酸の挿入；

(c) 請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の内因性プレセニリン遺伝子の不活性化、

からなる群より選択される改変の導入により改変されている、非ヒトトランスジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

関連出願の相互参照

10

本出願は米国特許出願第08/509,359号（1995年7月31日出願）の一部継続出願である。また、米国特許出願第08/509,359号は米国特許出願第08/496,841号（1995年6月28日出願）の一部継続出願である。また、米国特許出願第08/496,841号は米国特許出願第08/431,048号（1995年4月28日出願）の一部継続出願である。これらすべての出願が、「アルツハイマー病に関連する遺伝子配列およびタンパク質、ならびにその使用」（発明者：Peter H. St. George-Hyslop、Johanna M. RommensおよびPaul E. Fraser）と表題され、そしてこれらすべてが本明細書中で参考として援用される。

発明の分野

本発明は、一般的にアルツハイマー病に関連する神経学的および生理学的機能障害に関する。より詳細には、本発明はアルツハイマー病に関連する遺伝子の同定、単離、およびクローニング、ならびにそれらの転写物、遺伝子産物、関連する配列情報、および関連遺伝子に関する。本発明はまた、これらの遺伝子の正常および変異の対立遺伝子の保因者を検出および診断する方法、アルツハイマー病を検出および診断する方法、アルツハイマーの遺伝子およびタンパク質と関連または相互作用する遺伝子およびタンパク質を同定する方法、アルツハイマー病の潜在的治療法をスクリーニングする方法、アルツハイマー病の処置法、ならびにアルツハイマー病に潜在的に有用な治療法をスクリーニングおよび評価するために有用な細胞株および動物モデル、に関する。

20

発明の背景

種々の雑誌の論文の参照を容易にするために、本明細書の最後に論文のリストを提供する。

30

アルツハイマー病（AD）はヒトの中枢神経系の変性障害であり、中年から老年期における進行性の記憶障害ならびに認識力および知能の低下によって特徴付けられる（Katzman、1986）。この病気は一群の神経病理学的な特徴を伴い、その中で主要なものは、細胞外アミロイドまたは老人斑の存在および神経細胞の神経原線維の変性である。この病気の病因は複雑であるが、特定の家族においては常染色体優性の形質として遺伝するようにみえるものもある。しかしながら、これらの遺伝型のADにおいても、少なくとも3種の異なる遺伝子（この病気に遺伝感受性を与える）が存在する（St. George-Hyslopら、1990）。アポリポタンパク質E（ApoE）遺伝子の4（C112R）対立遺伝子多型は、一生のうち遅い時期に発症する症例のうちのかなりの割合の症例において、ADと関連した（Saundersら、1993; Strittmatterら、1993）。同様に、65歳前に発症する家族性の症例の非常にわずかな割合が、-アミロイド前駆体タンパク質（APP）遺伝子における変異に関連した（Chartier-Harlinら、1991; Goateら、1991; Murrellら、1991; Karlinskyら、1992; Mullanら、1992）。早期発症ADの症例のより多くの割合と関連する三番目の遺伝子座（AD3）が、最近、染色体14q24.3にマッピングされた（Schellenbergら、1992; St. George-Hyslopら、1992; Van Broeckhovenら、1992）。

40

染色体14q領域は、AD3と関連する変異部位の候補遺伝子と考えられ得るいくつかの遺伝子（例えば、cFOS、-1-抗キモトリプシン、およびカテプシンG）を有するが、これらの候補遺伝子のほとんどが、AD3領域外のそれらの物理的位置および/またはそれらのそれぞれのオープンリーディングフレーム中に変異が存在しないことに基づいて除外された（Schellenbergら、1992; Van Broeckhovenら、1992; Rogaevら、1993; Wongら、1993）。

50

アルツハイマー病の処置およびその診断に関して、いくつもの開発および商業化の傾向または計画があった。公開されたPCT出願WO 94 23049には、高分子量YAC DNAの、特定のマウス細胞へのトランスフェクションが記載されている。この方法は、大きな遺伝子複合体を解析するために用いられ得る。例えば、トランスジェニックマウスは、増大したAPP遺伝子量を有し得る。これは、ダウン症候群に蔓延するトリソミー状態を模擬し、そしてアルツハイマー病の個体に蔓延する -アミロイド症に似た、 -アミロイド症の動物モデルを产生する。公開された国際出願WO 94 00569には、大きなトランスジーン（例えばヒトAPP遺伝子を含むトランスジーン）を有するトランスジェニック非ヒト動物が記載されている。そのような動物モデルは、アルツハイマー病のようなヒトの遺伝病の、有用なモデルを提供し得る。

10

カナダ国特許出願第2096911号には、APP-切断プロテアーゼをコードする核酸（アルツハイマー病およびダウン症候群に関連する）が記載されている。染色体19から単離された遺伝子情報は、アルツハイマー病を診断するために使用され得る。カナダ国特許出願第2071105号は、遺伝性または後天性のアルツハイマー病の、YACヌクレオチド配列を用いた検出および処置について記載している。YACは、番号23CB10、2BCA12、および26FF3で同定される。

米国特許第5,297,562号には、染色体21のトリソミーに関連するアルツハイマー病の検出が記載されている。処置は、染色体21トリソミーの増殖を減少させる方法を包含する。カナダ国特許出願第2054302号には、モノクローナル抗体が記載され、これは、染色体21にコードされるヒト脳細胞核タンパク質を認識し、そしてアルツハイマー病またはダウン症候群による発現の変化を検出するために用いられる。そのモノクローナル抗体は、ヒト染色体21にコードされるタンパク質に特異的であり、そしてヒト脳組織の大きな錐体細胞中に見出される。

20

発明の要旨

本発明は、一部、2つの哺乳動物の遺伝子の、同定、単離、クローニングおよび配列決定に基づいている。これらの遺伝子は、プレセニリン（presenilin）-1（PS1）およびプレセニリン-2（PS2）と命名されている。これら2つの遺伝子、およびそれらの対応するタンパク質産物は、高度に保存された遺伝子（プレセニリン）のファミリーのメンバーであり、それらは他の哺乳動物種（例えば、マウス、ラット）にホモログまたはオーソログを、また無脊椎動物種（例えば、*C.elegans*、*D.melanogaster*）にオーソログを有する。これらの遺伝子の変異は、ヒトにおける家族性アルツハイマー病の形態の発生に関係し、そして同様の他の障害（例えば、他の認識的、知能的、神経学的、または心理学的障害（例えば、脳溢血、精神分裂症、鬱病、精神遅滞および癲癇など））の原因でもあり得る。本開示は、ヒトPS1（hPS1）およびヒトPS2（hPS2）遺伝子、マウスPS1ホモログ（mPS1）、ならびに*C.elegans*（sel-12、SPE-4）および*D.melanogaster*（DmPS）由来の関連する遺伝子のゲノムおよびcDNAヌクレオチド配列を提供する。本開示はまた、これらの遺伝子にコードされるプレセニリンタンパク質の予想アミノ酸配列、およびプレセニリンの構造の特徴付け（推定の機能的ドメインおよび抗原決定基を含む）を提供する。ヒトのアルツハイマー病（AD）の原因であるプレセニリン中の変異の多くもまた開示され、そしてそのタンパク質の機能的ドメインに関連づけられている。

30

従って、一連の実施様態において、本発明は、プレセニリン遺伝子を含むかまたはそれ由来のヌクレオチド配列を含む単離された核酸、および/またはプレセニリンタンパク質を含むかまたはそれ由来のポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。本発明のプレセニリン配列は、特定の開示された配列、これらの配列のスプライス変異体、これらの配列の対立遺伝子変異体、同義配列、およびこれらの配列の相同またはオーソロガス変異体を包含する。従って、例えば、本発明は、hPS1遺伝子、hPS2遺伝子、mPS1遺伝子およびDmPS遺伝子由来のゲノムおよびcDNA配列を提供する。本発明はまた、対立遺伝子変異体および相同またはオーソロガス配列を、このような変異体が通常得られ得る方法を提供することによって、提供する。本発明はまた、プレセニリンの変異または病気誘因変異体を、多くの特異的変異配列を開示することによって、そして、他のこのような変異体を通常

40

50

得ができる方法を提供することによって、特に提供する。本発明の核酸が、種々の診断、治療、および組み換えの適用に使用され得るので、プレセニリン配列の種々のサブセットおよびプレセニリン配列の異種配列との組合せもまた提供される。例えば、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションスクリーニングまたはPCR増幅技術における使用のためには、センス配列およびアンチセンス配列、正常配列および変異配列、ならびにイントロン配列、エキソン配列および非翻訳配列を含む、プレセニリン配列のサブセットが提供される。このような配列は、本明細書中で開示されるか、さもなければ実施可能とされる配列由来の少數の連續するヌクレオチドを含み得るが、好ましくは、プレセニリン配列由来の少なくとも8～10個の、より好ましくは9～25個の連續するヌクレオチドを含む。他の好ましいプレセニリン配列のサブセットは、プレセニリンタンパク質の機能的ドメインまたは抗原決定基の1つ以上をコードする配列を含み、そして特に、正常（野生型）配列または変異配列のいずれかを含み得る。本発明はまた、完全またはサブセットのいずれかのプレセニリン配列が、外因性の配列と作動可能に連結され、クローニングベクター、発現ベクター、融合ベクター、およびトランスジェニック構築物などを形成する種々の核酸構築物を提供する。従って、本発明の別の局面によれば、哺乳動物または無脊椎動物組織細胞を形質転換して、正常または変異プレセニリン配列を細胞中で発現する組換えベクターが提供される。

別の一連の実施形態において、本発明は、本発明の核酸の1つでトランスフェクトされたか、または形質転換された宿主細胞を提供する。細胞は、単に本発明の核酸構築物を増殖する目的のために形質転換され得るか、またはプレセニリン配列を発現するために形質転換され得る。本発明の形質転換された細胞は、タンパク質および/または正常または変異プレセニリン発現に影響を与える、正常または変異プレセニリンタンパク質と相互作用する、および/または正常または変異タンパク質の機能または効果を調節する他の化合物を同定するアッセイにおいて使用され得る。あるいは、本発明の形質転換された細胞は、プレセニリンタンパク質、融合タンパク質、機能的ドメイン、抗原決定基、および/または抗体を産生するアッセイにおいて使用され得る。形質転換された細胞はまた、ヒトを含む宿主に、治療または他の理由で移植され得る。好ましい宿主細胞は、神経、線維芽細胞、骨髄、脾臓、器官型のまたは混成の細胞培養物由来の哺乳動物細胞、ならびに細菌、酵母、線虫、昆虫および他の無脊椎動物細胞を包含する。以下に記載される使用のために、好ましい細胞はまた、胚幹細胞、接合、配偶子および生殖系列細胞を包含する。

別の一連の実施様態において、本発明は、ADおよび、プレセニリン遺伝子の変異に関連する他の病気または障害についての、トランスジェニック動物モデルを提供する。動物は、本質的に、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、およびヒトではない靈長類を含む任意の哺乳動物であり得る。さらに、線虫および昆虫を含む無脊椎動物モデルは、特定の適用に使用され得る。動物モデルは、マイクロインジェクション、トランスフェクション、または胚幹細胞、接合子、配偶子、および生殖系列細胞と、ゲノムもしくはcDNAフラグメントを含むベクター、ミニ遺伝子、相同組換えベクター、およびウイルス挿入ベクターなどの他の様式の形質転換を含む標準的な遺伝子組換え法によって產生される。適切なベクターは、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、リボソーム輸送体、神経親和性ウイルス、および単純ヘルペスウイルスを含む。動物モデルは、正常および変異の配列、イントロン、エキソン、および非翻訳の配列を含むプレセニリンを含むか、またはそれ由来の遺伝子組換え配列、および機能的ドメインのようなプレセニリンのサブセットをコードする配列を含み得る。提供される動物モデルの主要なタイプは、以下を包含する：（1）正常ヒトプレセニリン遺伝子が、動物のゲノムに、外因性または内因性プロモーターエレメントいずれかの調節下で、付加的な遺伝子として、およびミニ遺伝子または大きなゲノムフラグメントのいずれかとして、組換え的に導入された動物；正常ヒトプレセニリン遺伝子が、動物の相同プレセニリン遺伝子の1つまたは両方のコピーと、相同組換えまたは遺伝子標的化によって、組換え的に置換された動物；および/または動物の相同プレセニリン遺伝子の1つの1つまたは両方のコピーが、相同組換えまたは遺伝子標的化によりヒトホモ

10

20

30

40

50

ログをコードする配列を部分的に置換することによって、組換え的に「ヒト化」された動物。（2）変異ヒトプレセニリン遺伝子が、動物のゲノムに、外因性または内因性プロモーターエレメントのいずれかの調節下で、付加的な遺伝子として、およびミニ遺伝子または大きなゲノムフラグメントのいずれかとして、組換え的に導入された動物；変異ヒトプレセニリン遺伝子が、動物の相同プレセニリン遺伝子の1つまたは両方のコピーと、相同組換えまたは遺伝子標的化によって、組換え的に置換された動物；および/または動物の相同プレセニリン遺伝子の1つの1つまたは両方のコピーが、相同組換えまたは遺伝子標的化により変異ヒトホモログをコードする配列を部分的に置換することによって、組換え的に「ヒト化」された動物。（3）その動物のプレセニリン遺伝子の1つの変異バージョンが、動物のゲノムに、外因性または内因性プロモーターエレメントのいずれかの調節下で、付加的な遺伝子として、およびミニ遺伝子または大きなゲノムフラグメントのいずれかとして、組換え的に導入された動物；および/または、その動物のプレセニリン遺伝子の1つの変異バージョンが、動物の相同プレセニリン遺伝子の1つまたは両方のコピーと、相同組換えまたは遺伝子標的化によって、組換え的に置換された動物。（4）動物のプレセニリン遺伝子の1つの1つまたは両方のコピーが、相同組換えまたは遺伝子標的化によって部分的にまたは完全に欠失した、または外因性の配列の相同組換えまたは遺伝子標的化による挿入または置換によって不活化された「ノックアウト」動物。好ましい実施様態において、ADのためのトランスジェニックマウスマodelは、正常ヒトPS1またはPS2タンパク質、変異ヒトまたはマウスPS1またはPS2タンパク質、あるいはヒト化された正常または変異マウスPS1またはPS2タンパク質をコードするトランスジーンを有する。

10

別の一連の実施様態において、本発明は、実質的に純粹なタンパク質の調製物（プレセニリンタンパク質を含むか、またはそれ由来のポリペプチドを含む）を提供する。本発明のプレセニリンタンパク質配列は、特定の開示された配列、オルタナティブmRNAスプライシングから得られるこれらの配列の変異体、これらの配列の対立遺伝子変異体、およびこれらの配列の相同またはオーソロガス変異体を含む。従って、例えば、本発明は、hPS1タンパク質、hPS2タンパク質、mPS1タンパク質、およびDmPSタンパク質由来のアミノ酸配列を提供する。本発明はまた、対立遺伝子変異体および相同またはオーソロガスタンパク質を、このような変異体が通常得られ得る方法を提供することによって、提供する。本発明はまた、プレセニリンの変異または病気誘因変異体を、多くの特異的変異配列を開示することによって、そして他のこのような変異体を通常得ることができる方法を提供することによって、特に提供する。本発明のタンパク質は、種々の診断、治療および組換え適用に使用され得るので、プレセニリンタンパク質配列の種々のサブセットおよびプレセニリンタンパク質配列と異種配列との組合せもまた提供される。例えば、免疫原としての使用または結合アッセイにおいて、プレセニリンタンパク質配列のサブセットが、正常配列および変異配列の両方を含めて、提供される。このようなタンパク質配列は、本明細書中で開示されるか、さもなければ実施可能とされる配列由来の少数の連続するアミノ酸残基を含み得るが、好ましくは、プレセニリン配列由来の少なくとも4～8個、そして好ましくは少なくとも9～15個の連続するアミノ酸残基を含む。他の好ましいプレセニリンタンパク質配列のサブセットは、プレセニリンタンパク質の機能的ドメインまたは抗原決定基の1つ以上に対応する配列を含み、そして特に、正常（野生型）配列または変異配列のいずれかを含み得る。本発明はまた、完全かまたはサブセットのいずれかのプレセニリン配列が、外因性配列と結合し、融合タンパク質などを形成する種々のタンパク質構築物を提供する。これらの実施様態に従って、本発明はまた、プレセニリンを含むかまたはそれ由来の上記すべてのタンパク質を產生する方法を提供する。

20

別の一連の実施様態において、本発明はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の產生および使用を提供する。これらの抗体は、プレセニリンまたはプレセニリンの特定の抗原決定基に選択的に結合する、Fabフラグメント、F(ab')₂、および単鎖抗体フラグメントを包含する抗体フラグメントを包含する。この抗体はマウス、ウサギ、ヤギ、または他の適切な動物中で惹起され得るか、またはハイブリドーマ細胞株のような培養細胞中で組換え的に產生され得る。好ましくは、抗体は、プレセニリン配列由来の少なくとも4

30

40

50

～8個、そして好ましくは少なくとも9～15個の連続するアミノ酸残基を含むプレセニリン配列に対して惹起される。本発明の抗体は、本明細書中に記載の、種々の診断、治療、および技術適用に使用し得る。

別の一連の実施様態において、本発明は、プレセニリン遺伝子およびタンパク質（例えば、PS1またはPS2）の発現を誘発または阻害し得るタンパク質、低分子、または他の化合物をスクリーニングまたは同定する方法を提供する。アッセイは、インビトロで、非形質転換細胞株、不死化細胞株、もしくは組換え細胞株を用いて、またはインビボで、本明細書中の実施可能とされるトランスジェニック動物モデルを用いて行い得る。特に、アッセイはPS1、PS2、または他のプレセニリン関連遺伝子もしくはタンパク質の増加または減少した発現の存在を、増加または減少したmRNA発現、増加または減少したプレセニリン関連タンパク質産物レベル、または組換え構築物中のプレセニリン5'調節領域に作動可能に連結したマーカー遺伝子（例えば、-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、アルカリホスファターゼまたはルシファラーゼ）の増加または減少した発現レベルを基準に検出得る。特定のプレセニリンを発現することが知られた細胞、または特定のプレセニリンを発現するために形質転換された細胞は、インキュベートされ、そして1つ以上の試験化合物が培地に添加される。化合物がプレセニリンの発現を誘発または阻害するのに充分な時間（例えば、0～72時間）の経過後、確立したベースラインからの発現レベルの任意の変化が、上述の任意の技術を用いて検出され得る。特に好ましい実施様態において、細胞は、ヒト神経芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、またはハイブリドーマ細胞株のような不死化された細胞株由来であるか、または本発明の形質転換細胞である。

別の一連の実施様態において、本発明は、プレセニリンに結合するか、さもなくば直接相互作用するタンパク質および他の化合物を同定する方法を提供する。タンパク質および化合物は内因性の細胞成分を包含する。その細胞成分は、インビボでプレセニリンと相互作用し、従って、薬学的および治療的介入のための新しい標的、ならびに組換え化合物、合成化合物およびさもなくば外因性の化合物を提供する。それらの化合物は、プレセニリン結合能を有し得、従って、薬学的調製物の候補となり得る。従って、一連の実施様態において、細胞溶解物または組織ホモジネート（例えば、ヒト脳ホモジネート、リンパ球溶解物）は、正常または変異プレセニリンの一つに結合するタンパク質または他の化合物についてスクリーニングされ得る。あるいは、任意の種々の外因性の化合物は、天然に存在するおよび/または合成（例えば、小さな分子またはペプチドのライブラリー）の両方とも、プレセニリン結合能についてスクリーニングされ得る。これら各々の実施様態において、アッセイが、「プレセニリン成分」といくつかの他の部分との間の結合を検出するために行われる。これらのアッセイにおけるプレセニリン成分は、正常または変異プレセニリンタンパク質（プレセニリンのまたはプレセニリン融合タンパク質機能的ドメインまたは抗原決定基を含む）を含むかまたはそれ由来の任意のポリペプチドであり得る。結合は、非特異的測定（例えば、細胞内Ca²⁺、GTP/GDP比の変化）によって、または特異的測定（例えば、Aペプチド産生の変化、またはディファレンシャルディスプレイ、2Dゲル電気泳動、ディファレンシャルハイブリダイゼーション、またはSAGE法によってモニターされ得る他の下流遺伝子の発現の変化）によって検出され得る。好ましい方法は、以下の技術の改変を含む：（1）アフィニティクロマトグラフィーによる直接的抽出；（2）免疫沈降によるプレセニリン成分および結合タンパク質または他の化合物の同時単離；（3）生物分子相互作用アッセイ（Biomolecular Interaction Assay）（BIAcore）；および（4）酵母ツーハイブリッドシステム。

別の一連の実施様態において、本発明は、正常または変異プレセニリンの活性を調節し得るタンパク質、低分子および他の化合物を同定する方法を提供する。正常細胞または動物、本発明の形質転換細胞およびトランスジェニック動物モデル、または正常もしくは変異プレセニリン遺伝子を有する被験体から得られる細胞を使用して、本発明は、プレセニリンの発現、プレセニリンの細胞内局在性、細胞内Ca²⁺、Na⁺、K⁺または他のイオンレベルまたは代謝、アポトーシスまたは細胞死の頻度または割合、Aペプチド産生のレベルまたはパターン、微小管結合タンパク質のリン酸化の有無またはレベル、または正常および

10

20

30

40

50

変異プレセニリン配列を有する細胞を区別する他の生化学的、組織学的、または生理学的マーカーに影響を与えるそれら化合物の能力に基づき、このような化合物を同定する方法を提供する。本発明のトランスジェニック動物を用いて、このような化合物を同定する方法がまた、プレセニリンの変異に関連する挙動的、生理学的、組織学的表現型に影響を与えるこれらの化合物の能力に基づいて提供される。

別の一連の実施様態において、本発明は、ADに関連するプレセニリン対立遺伝子の保因者をスクリーニングする方法、ADの罹患者を診断する方法、および関連する初老期および老年期の痴呆、精神分裂病および鬱病のような精神医学病、ならびに脳卒中および脳溢血のような神経性の病気（これらはPS1またはPS2遺伝子の変異に関連する）をスクリーニングおよび診断する方法を提供する。スクリーニングおよび/または診断は、本明細書中で開示される、および実施可能な核酸（ゲノム配列およびmRNA/cDNA配列を含む）、タンパク質、および/または抗体に基づく方法によって達成され得る。その方法は、正常プレセニリン活性の減衰もしくは増大、および/または変異プレセニリンによって与えられる特定の新しい活性の存在を検出するよう設計された機能的アッセイを含む。従って、プレセニリンタンパク質に基づくスクリーニングおよび診断が提供され、それらは変異プレセニリンと正常プレセニリンとの間の電気泳動移動度、タンパク質分解の切断パターン、種々のアミノ酸残基のモル比、特異的な抗体を結合する能力の差異を検出する。さらに、核酸（gDNA、cDNA、またはmRNA）に基づくスクリーニングおよび診断が提供され、それらは、直接的ヌクレオチド配列決定、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーション、制限酵素消化およびマッピング（例えば、RFLP、REF-SSCP）、電気泳動移動度（例えば、SSCP、DGGE）、PCRマッピング、RNaseプロテクション、化学的ミスマッチ切断（chemical mismatch cleavage）、リガーゼ媒介検出（ligase-mediated detection）、ならびに種々の他の方法によってヌクレオチド配列の差異を検出する。PS1、PS2、APP、またはPS1、PS2、もしくはAPPと反応するタンパク質の異常なプロセシング（例えば、異常リン酸化、グリコシリ化、グリケーション、アミド化、またはタンパク質分解切断）；プレセニリンの転写、翻訳、および翻訳後修飾における変化；プレセニリン遺伝子産物の細胞内および細胞外のトラフィッキングにおける変化；またはプレセニリンの異常な細胞内局在を検出する他の方法もまた提供される。これらの実施様態に従って、診断キットもまた提供され、それらは上記の診断スクリーニングに必要な試薬を含む。

別の一連の実施様態において、本発明は、ADのようなプレセニリンに関連する病気の処置における使用のための方法および薬学的調製物を提供する。これらの方法および薬剤は以下に基づく：（1）正常PS1またはPS2タンパク質の投与、（2）変異遺伝子を補償または置換するための正常PS1またはPS2遺伝子による遺伝子療法、（3）変異PS1またはPS2遺伝子に対するアンチセンス配列に基づくかまたは変異遺伝子を「ノックアウト」する遺伝子療法、（4）PS1またはPS2の変異体の有害な効果を、ブロックするかまたは矯正するタンパク質をコードする配列に基づく遺伝子療法、（5）正常および/または変異のPS1もしくはPS2タンパク質に対する抗体に基づく免疫療法、または（6）PS1もしくはPS2の発現を変化させるか、PS1またはPS2の変異形態と他のタンパク質またはリガンドとの間の異常相互作用をブロックする低分子（薬物）、または、そうでなければ変異PS1もしくはPS2タンパク質の異常な機能を、変異タンパク質の構造を変化させるか、またはそれらの代謝クリアランス（clearance）を増強するか、もしくはそれらの機能を阻害することによってブロックする低分子（薬物）。

本発明の別の局面に従って、本発明のタンパク質は、リガンド、治療用薬物または他のタイプの小化学分子を提供する合理的なドラッグデザインのための出発点として使用され得る。あるいは、上記のスクリーニングアッセイによって同定される低分子または他の化合物は、合理的なドラッグデザインにおける「リード化合物（lead compounds）」として働き得る。

本発明で特に開示されたヌクレオチドおよびアミノ酸の配列は、配列番号1～25と番号付けされている。さらに、ブダペスト条約の約定に基づき、本明細書において開示された特定の核酸の生物的寄託が、ATCC（Rockville, MD）でなされた。これらの寄託物としては、

10

20

30

40

50

受託番号97124 (1995年4月28日寄託)、受託番号97508 (1995年4月28日寄託)、受託番号97214 (1995年6月28日寄託)、および受託番号97428 (1996年1月26日寄託)が挙げられる。

【図面の簡単な説明】

図1：この図は、hPS1ゲノムDNAの構造の構成を表す。非コードエキソンを、網状(solid shaded)の長方形で示す。コードエキソンを、白抜きの(open)長方形で、またはオルタナティブスプライシングされた配列を斜線のついた(hatched)長方形で示す。制限部位は：B=BamHI；E=EcoRI；H=HindIII；N=NotI；P=PstI；V=PvuII；X=XbaIである。制限部位間の水平な線のとぎれは、未決定のゲノム配列を表す。各エキソンを含むクローン化されたゲノムフラグメントを、水平な両端矢印で示す。ゲノムのサブクローンの大きさおよび各ゲノム配列の受託番号を提供する。

10

図2：この図は、推定のPS1タンパク質のハイドロパシープロットを表す。このプロットは、KyteおよびDoolittle(1982)の方法に従って計算された。

図3：この図は、hPS1およびmPS1のタンパク質配列の配列アラインメントを表す。垂直な線は、同じアミノ酸を示す。

図4：この図は、hPS1およびhPS2のタンパク質配列の配列アラインメントを表す。垂直な線は、同じアミノ酸を示す。

図5：この図は、PS1タンパク質の推定構造の模式図である。ローマ数字は、膜貫通ドメインを表す。推定のグリコシリ化部位は、アスタリスクで示され、そしてリン酸化部位のほとんどは、同じ膜表面上に2つの酸性親水性ループとして局在する。MAPキナーゼ部位は、残基115に存在し、PKC部位は、残基114に存在する。FAD変異部位を、水平な矢印で示す。

20

図6：この図は、PS2タンパク質の推定構造の模式図である。ローマ数字は、膜貫通ドメインを表す。推定のグリコシリ化部位は、アスタリスクで示され、そしてリン酸化部位のほとんどは、同じ膜表面上に2つの酸性親水性ループとして局在する。FAD変異部位を、水平な矢印で示す。

発明の詳細な説明

I. 定義

本発明の種々の実施様態の説明、ならびに本発明を実行および使用する際に用いられる種々の要素および成分の理解を容易にするために、本明細書の記載および添付の請求の範囲で用いられた特定の用語について以下に示す定義が提供される：

30

プレセニリン。 本明細書でさらなる修飾がなされずに用いられる、用語「プレセニリン(单数)」または「プレセニリン(複数)」は、プレセニリン-1(PS1)および/またはプレセニリン-2(PS2)の遺伝子/タンパク質を意味する。特に、修飾されない用語「プレセニリン(单数)」または「プレセニリン(複数)」は、哺乳動物のPS1および/またはPS2の遺伝子/タンパク質、そして好ましくは、ヒトPS1および/またはPS2の遺伝子/タンパク質を意味する。

プレセニリン-1遺伝子。 本明細書で用いられる、用語「プレセニリン-1遺伝子」または「PS1遺伝子」は、米国特許出願第08/431,048号(1995年4月28日出願)に最初に開示および記載され、そして後にSherringtonら(1995)に記載された哺乳動物遺伝子(任意の対立遺伝子変異体および異種特異的哺乳動物ホモログを含む)を意味する。一つのヒトプレセニリン-1(hPS1)cDNA配列が、本明細書で、配列番号1として開示される。hPS1 mRNAの転写物のオルタナティブスプライシングから得られる別のヒトcDNA配列は、配列番号3として開示される。以下に記載されるように、33残基をコードする領域が、いくつかの転写産物においてスプライスアウト(spliced-out)され得るさらなるヒトスプライス変異体もまた発見されている。マウスホモログ(mPS1)のcDNAは、配列番号16として開示される。用語「プレセニリン-1遺伝子」または「PS1遺伝子」は、主としてコード配列に関するが、いくつかまたは全ての隣接調節領域および/またはイントロンもまた包含し得る。用語PS1遺伝子は、特に、スプライス変異体に基づく組換え遺伝子を含むcDNAまたはゲノムDNAから作製された人工または組換え遺伝子を包含する。プレセニリン-1遺伝

40

50

子はまた、S182遺伝子（例えば、Sherringtonら、1995）として、またはアルツハイマー関連膜タンパク質（ARMP）遺伝子（例えば、米国特許出願第08/431,048号、1995年4月28日出願）として言及されている。

プレセニリン-1タンパク質。 本明細書中で用いられる、用語「プレセニリン-1タンパク質」または「PS1タンパク質」は、PS1遺伝子（対立遺伝子変異体および異種特異的哺乳動物ホモログを含む）によってコードされるタンパク質を意味する。1つのヒトプレセニリン-1（hPS1）タンパク質配列が、本明細書中で、配列番号2として開示される。hPS1 mRNA転写物のオルタナティブスプライシングから得られる別のヒトPS1タンパク質配列は、配列番号4として開示される。以下に記載されるように、33残基を含む領域がいくつかの転写物においてスプライスアウトされ得る、さらなるヒトスプライス変異体もまた発見されている。これらの変異体はまた、本明細書中で用いられる、用語プレセニリン-1タンパク質により包含される。マウスホモログ（mPS1）のタンパク質配列は、配列番号17として開示される。このタンパク質は、組換え細胞もしくは生物によって産生され得るか、天然の組織もしくは細胞株から実質的に単離され得るか、または化学的もしくは酵素的に合成され得る。従って、用語「プレセニリン-1タンパク質」または「PS1タンパク質」は、グリコシル化された、部分的にグリコシル化された、またはグリコシル化されていない形態、ならびにリン酸化された、部分的にリン酸化された、リン酸化されていない、硫酸化された、部分的に硫酸化された、または硫酸化されていない形態のタンパク質を包含することが意図される。この用語はまた、PS1アミノ酸配列の対立遺伝子変異体および他の機能的等価物（生物学的に活性なタンパク質分解フラグメントまたは他のフラグメントを含む）を包含する。このタンパク質はまた、S182タンパク質（例えば、Sherringtonら、1995）またはアルツハイマー関連膜タンパク質（ARMP）（例えば、米国特許出願第08/431,048号、1995年4月28日出願）として言及されている。

hPS1の遺伝子および/またはタンパク質。 本明細書中で用いられる、略語「hPS1」は、PS1の遺伝子および/またはタンパク質のヒトホモログおよびヒト対立遺伝子変異体をいう。ヒトPS1遺伝子の2つのcDNA配列が、本明細書中で、配列番号1および配列番号3として開示される。対応するhPS1タンパク質配列は、配列番号2および配列番号4として、本明細書中で開示される。有害な変異体を含む数多くの対立遺伝子変異体が、以下の記載を通して開示され、そして実施可能とされる。

mPS1の遺伝子および/またはタンパク質。 本明細書中で用いられる、略語「mPS1」は、PS1の遺伝子および/またはタンパク質のマウスホモログおよびマウス対立遺伝子変異体をいう。1つのマウスPS1遺伝子のcDNA配列が、本明細書中で、配列番号16として開示される。対応するmPS1タンパク質配列が、本明細書中で、配列番号17として開示される。有害な変異体を含む対立遺伝子変異体が、以下の記載において実施可能とされる。

プレセニリン-2遺伝子。 本明細書中で用いられる、用語「プレセニリン-2遺伝子」または「PS2遺伝子」は、米国特許出願第08/496,841号（1995年6月28日出願）に最初に開示および記載され、そして後に、Rogaevら（1995）およびLevy-Lahadら（1995）に記載された哺乳動物遺伝子（任意の対立遺伝子変異体および異種特異的哺乳動物ホモログを含む）を意味する。1つのヒトプレセニリン-2（hPS2）cDNA配列が、配列番号18として、本明細書中で開示される。以下に記載されるように、1つのコドンまたは33残基をコードする領域がいくつかの転写物においてスプライスアウトされ得るさらなるヒトスプライス変異体もまた、発見されている。用語「プレセニリン-2遺伝子」または「PS2遺伝子」は、主としてコード配列に関するが、いくつかまたは全ての隣接調節領域および/またはイントロンもまた包含し得る。用語PS2遺伝子は、特に、スプライス変異体に基づく組換え遺伝子を含む、cDNAまたはゲノムDNAから作製された人工または組換え遺伝子を包含する。プレセニリン-2遺伝子はまた、E5-1遺伝子（例えば、Rogaevら、1995；米国特許出願第08/496,841、1995年6月28日出願）として、またはSTM2遺伝子（例えば、Levy-Lahadら、1995）として、言及されている。

プレセニリン-2タンパク質。 本明細書中で用いられる、用語「プレセニリン-2タンパク質」または「PS2タンパク質」は、PS2遺伝子（対立遺伝子変異体および異種特異的哺乳

10

20

30

40

50

動物ホモログを含む)によってコードされるタンパク質を意味する。1つのヒトプレセニリン-2(hPS2)タンパク質配列が、本明細書中で、配列番号19として開示される。以下に示されるように、一つの残基または33残基を含む領域が特定の転写物においてスプライスアウトされ得るさらなるヒトスプライス変異体もまた、発見されている。これらの変異体はまた、本明細書中で用いられる、用語プレセニリン-2タンパク質により包含される。このタンパク質は、組換え細胞または生物によって產生され得るか、または天然の組織または細胞株から実質的に精製され得るか、または化学的にもしくは酵素的に合成され得る。従って、用語「プレセニリン-2タンパク質」または「PS2タンパク質」は、グリコシリ化された、部分的にグリコシリ化された、またはグリコシリ化されていない形態、ならびにリン酸化された、部分的にリン酸化された、リン酸化されていない、硫酸化された、部分的に硫酸化された、または硫酸化されていない形態のタンパク質を包含することが意図される。この用語はまた、PS2アミノ酸配列の対立遺伝子変異体および他の機能的等価物(生物学的に活性なタンパク質分解フラグメントまたは他のフラグメントを含む)をも包含する。このタンパク質はまた、E5-1タンパク質(例えば、Sherringtonら、1995;米国特許出願第08/496,841、1995年6月28日出願)またはSTM2タンパク質(例えば、Levy-Lahadら、1995)として言及されている。

hPS2の遺伝子および/またはタンパク質。 本明細書中で用いられる、略語「hPS2」は、PS2の遺伝子および/またはタンパク質のヒトホモログおよびヒト対立遺伝子変異体をいう。ヒトPS2遺伝子の一つのcDNA配列が、本明細書中で、配列番号18として開示される。対応するhPS2タンパク質配列は、配列番号19として、本明細書中で開示される。有害な変異体を含む数多くの対立遺伝子変異体が、以下の記載を通して開示され、そして実施可能とされる。

DmPSの遺伝子および/またはタンパク質。 本明細書中で用いられる、略字「DmPS」は、PS1およびPS2の遺伝子/タンパク質のDrosophilaホモログおよび対立遺伝子変異体をいう。この定義は、核酸およびアミノ酸配列多型のうち、遺伝子またはタンパク質配列中の置換、挿入、または欠失が、遺伝子産物の本質的機能に影響を与えないものを包含すると理解される。DmPS遺伝子の1つのcDNAのヌクレオチド配列が、本明細書中で、配列番号20として開示され、そして対応するアミノ酸配列が、配列番号21として開示される。用語「DmPS遺伝子」は、主として、コード配列に関するが、いくつかまたは全ての隣接調節領域および/またはイントロンもまた包含し得る。

正常。 本明細書中で遺伝子に関して用いられる、用語「正常」は、正常タンパク質をコードする遺伝子をいう。本明細書中でタンパク質に関して用いられる、用語「正常」は、通常のまたは正常な生理学的役割を演じ、かつ病理的な状況または状態に関連しないかまたはその原因となることのないタンパク質を意味する。従って、本明細書中で用いられる、用語「正常」は、本質的に、用語「野生型」の通常の意味と同義である。任意の所与の遺伝子または対応するタンパク質について、多数の正常対立遺伝子変異体が存在し得るが、そのうちのどれも病理的な状況または状態の発展に関連しない。このような正常対立遺伝子変異体は、1つ以上のヌクレオチド置換が、コードされるアミノ酸配列の変化をもたらさない変異体を包含するが、それらに限定されない。

変異。 本明細書中で遺伝子に関して用いられる、用語「変異」は、変異タンパク質をコードする遺伝子をいう。本明細書中でタンパク質に関して用いられる、用語「変異」は、通常のまたは正常な生理学的役割を演じず、かつ病理的な状況または状態に関連し、またはその原因となるタンパク質を意味する。従って、本明細書中で用いられる、用語「変異」は、用語「機能障害の」、「病理的な」、「病気誘因の」および「欠失の」と、本質的に同義である。本発明のプレセニリン遺伝子およびタンパク質に関して、用語「変異」は、1つ以上のヌクレオチド/アミノ酸置換、挿入および/または欠失を有するプレセニリン遺伝子/タンパク質をいい、それらは、ヒトにおいて発現されたとき、代表的には、アルツハイマー病および/または他の関連する遺伝的表現型(例えば、脳溢血、精神遅滞、精神分裂病、精神病、および鬱病)の症状の発症をもたらす。この定義は、生来存在する種々の変異を包含すると理解され、それらには本明細書中で開示された変異、およびヒトの

10

20

30

40

50

介入により產生された合成または組換え変異が包含されるが、それらに限定されない。用語「変異」は、プレセニリン遺伝子に適用されるときには、遺伝子コードの縮重によって、本明細書中で開示されるかまたはさもなくば実施可能とされる正常配列と同一のタンパク質をコードする配列変異体を包含すると意図されない。また、異なるタンパク質をコードするが、正常プレセニリンタンパク質と機能的に等価であるタンパク質をコードする配列変異体を包含することも意図されない。

機能的等価。 遺伝子配列およびアミノ酸配列の記載において、本明細書中で用いられる、用語「機能的等価」は、列挙された配列が、特に開示される配列番号何番の配列と同一である必要はないが、開示される配列の等価物として、生物学的および/または化学的に機能する配列を提供することだけが必要であることを意味する。

実質的に純粋。 タンパク質（抗体を含む）または他の調製物に関して本明細書中で用いられる、用語「実質的に純粋」は、少なくとも60重量%（乾燥重量）が目的の化合物である調製物を意味する。好ましくは、調製物は、少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも90重量%、そして最も好ましくは少なくとも99重量%が目的の化合物である。純度は、任意の適切な方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、またはHPLC分析によって、測定され得る。

タンパク質（抗体を含む）に関して、調製物が2つ以上の異なる目的の化合物（例えば、本発明の2つ以上の異なる抗体、免疫原、機能的ドメイン、または他のポリペプチド）を含有する場合、「実質的に純粋」な調製物は、全ての目的の化合物の全重量（乾燥重量）が、全乾燥重量の少なくとも60%である調製物を意味する。同様に、2つ以上の目的の化合物を含有する調製物については、目的の化合物の全重量が、調製物の全乾燥質量の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも99%であることが好ましい。

単離された核酸。 本明細書中で用いられる、「単離された核酸」は、リボ核酸、デオキシリボ核酸、またはその生物由来の天然に存在するゲノム中、直接隣接（5'末端のものおよび3'末端のもの）する配列から単離または分離されたポリヌクレオチド配列を含む核酸アナログである。この用語は従って、例えば、ベクター、自律的に複製するプラスミドもしくはウイルス、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた；あるいは、分離した分子（例えば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ処理によって產生されたcDNAまたはゲノムDNAフラグメント）として、他の配列とは独立して存在する組み換え核酸を包含する。また、さらなるポリペプチド配列をコードする、および/または外因性の調節エレメントを含むハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも包含される。

実質的に同一の配列。 本明細書中で用いられる、「実質的に同一」なアミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換、例えば、1つのアミノ酸の別の同じクラスのアミノ酸での置換（例えば、バリンの代わりにグリシン、アルギニンの代わりにリジンなど）のみが異なるか、または（アッセイされた、例えば、本明細書中で記載の）タンパク質の機能を破壊しないアミノ酸配列の位置に局在する、1つ以上の非保存的置換、欠失、挿入のみが異なるアミノ酸配列である。好ましくは、このような配列は、少なくとも85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%が、アミノ酸レベルで、比較されるタンパク質またはペプチドの配列と同一である。核酸については、比較配列の長さは、一般的に少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも60ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも75ヌクレオチド、そして最も好ましくは110ヌクレオチドである。「実質的に同一」な核酸配列は、上記のように定義される実質的に同一なアミノ酸配列をコードする。

形質転換細胞。 本明細書中で用いられる、「形質転換細胞」は、その中へ（または、その先代の中へ）組換えDNA技術を用いて、目的の核酸分子が導入された細胞である。目的の核酸は、ペプチドまたはタンパク質を代表的にコードする。形質転換細胞は、目的の配列を発現し得るか、またはその配列を増殖するためだけに使用され得る。用語「形質転換された」は、本明細書中で、外因性の核酸を導入する任意の方法（形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、およびウイルス媒介トランスフェクションなどを包含するが、これらに限定されない）を包含して用いられ得

る。

作動可能に連結された。 本明細書中で用いられるように、調節領域の影響または制御下で、コード配列の発現または転写が生じるよう、コード配列および調節領域が共有結合的に結合される場合、それらは「作動可能に連結された」といわれる。コード配列が機能的タンパク質に翻訳されることが望ましい場合、2つのDNA配列は、以下を満たせば、作動可能に結合されたといわれる：プロモーターの機能の誘発が、コード配列の転写をもたらす場合、および2つのDNA配列間の結合の性質が、（1）フレームシフト変異の誘導をもたらさない、（2）コード配列の転写を指向する調節領域の能力を妨害しない、または（3）対応するRNA転写物の、タンパク質に翻訳される能力を妨害しない場合。従って、調節領域は、調節領域がDNA配列の転写をなし得、得られた転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得た場合、作動可能にコード配列に結合される。

ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件。 ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、当業者によって理解される当該分野の用語である。任意の所与の核酸配列について、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、核酸配列のその相補的な配列への（実質的に異なる配列へではない）ハイブリダイゼーションを可能にする温度、カオトロピック（chaotrophic）酸、緩衝液、およびイオン強度を有する条件である。

「ストリンジエントな」条件を構成する正確な条件は、核酸配列の性質、配列の長さ、およびその配列のサブセットが他の非同一配列中に存在する頻度に依存する。ハイブリダイゼーション条件を、非特異的ハイブリダイゼーションが生じるストリンジエンシーのレベルから、特異的ハイブリダイゼーションのみ観察されるレベルへ変化させることによって、当業者は、過度の実験を伴わずに、所与の配列が相補的な配列とのみハイブリダイズし得る条件を決定し得る。このようなストリンジエンシー条件の適切な範囲は、KrauseおよびAaronson（1991）に記載されている。配列の長さおよび共通性に依存するハイブリダイゼーション条件は、20～65の温度および $5 \times \sim 0.1 \times$ SSCのイオン強度を包含し得る。高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、40～42の低い温度（ホルムアミドのような変性剤が含まれる場合）、または $0.1 \times$ SSCの低いイオン強度においては60～65までの温度を包含し得る。しかし、これらの範囲は、例示であるのみであって、標的配列の性質および可能な将来の技術的開発に依存して、必要であるよりもストリンジエントであり得る。ストリンジエント条件未満の条件が、任意の所与の配列と実質的に類似する、対立遺伝子的または相同な核酸配列を単離するために用いられる。

選択的に結合する。 抗体に関して本明細書中で用いられるように、抗体が目的の標的を認識および結合するが、サンプル（例えば、目的の標的を含む生物学的サンプル）中の他の分子を、実質的に認識および結合しない場合、抗体は標的に「選択的に結合する」といわれる。

II. プレセニリン

本発明は、部分的に、変異した場合、アルツハイマー病の進展に関連する、哺乳動物遺伝子のファミリーの発見に基づいている。プレセニリン-1およびプレセニリン-2と命名されたこれらの遺伝子の発見、ならびにこれらの遺伝子、そのタンパク質産物、変異体、および可能な機能的役割の特徴付けを以下に記載する。プレセニリンの無脊椎動物のホモログをまた、そのプレセニリンの機能を明らかにし得るように、そして以下に記載の様々な実施態様において有用であり得る程度に記載する。

1. ヒトプレセニリン-1遺伝子の単離

A. AD3領域の遺伝子マッピング

PS1遺伝子の最初の単離および特徴付け（次いでAD3遺伝子またはS182遺伝子といわれる）が、Sherringtonら（1995）中に記載された。アノニマスマイクロサテライトマーカーD14S43およびD14S53の近傍の、14q24.3へのAD3遺伝子座の最初の領域マッピング（Schellenbergerら、1992；St.George-Hyslopら、1992；Van Broeckhovenら、1992）の後、21個の家系が、ADを推定の常染色体の優性特性として分離するのに使用され（St.George-Hyslopら、1992）、そして高密度遺伝的連鎖地図に組み入れられた（Weissenbachら、1992；Gyapayら、1994）、14q24.3領域由来の18個のさらなる遺伝マーカーの分離を調べるために用い

10

20

30

40

50

られた。この14q24.3領域は、高密度遺伝的連鎖地図に組み入れられている (Weissenbachら、1992；Gyapayら、1994)。先に刊行されたペアワイズ最尤度分析 (pairwise maximum likelihood analyses) は、家族性アルツハイマー病 (FAD) と全てのこれらのマーカーとの間の連鎖に対する実質的な累積的証拠を確認した。しかし、これらのマーカーへの連鎖を支持する多くの遺伝的データは、6つの大きな初期発症家系 (FAD1 (Neeら、1983)、FAD2 (Frommeltら、1991)、FAD3 (Goudsmitら、1981；Pollen、1993)、FAD4 (Foncinら、1985)、TDR1.1 (Bergamini、1991)、および603 (Pericak-Vanceら、1988)) に由来し、これら各々は、14q24.3由来の少なくとも1つのアノニマス遺伝マーカーを提供する (St.George-Hyslopら、1992)。

14q24.3由来の遺伝マーカーの既知の位置に対するAD3遺伝子の位置をより正確に規定するために、組換えのランドマーク (recombinational landmark) を、染色体14に明確な連鎖を示す6つの家系の遺伝子型決定された冒されたメンバー由来の稀なハプロタイプの生のデータを、直接的な観察により探索した。この特定の例におけるこの選択的なストラテジーは、減少した冒されたメンバーの再構築された遺伝子型由来、ならびに古い無症候性の (elderly asymptomatic) 大きな家系のメンバー由来のデータをほぼ放棄し、および不確実な連鎖状態のより小さい家系は考慮に入れない。しかし、このストラテジーは非常に確実である。それはまた、非父方から生じる減少した冒されたメンバーの再構築された遺伝子型中のエラーを通して、または連鎖していない家系の包含、サンプリングエラーのいずれかを介して、潜在的に獲得された読み違えの遺伝子型データの獲得を避けるので、このストラテジーは非常に確実な根拠がある。

冒された被験体に対するハプロタイプのデータの観察に基づいて、その遺伝子型が直接決定された6つの大きな家系のメンバーは、D14S48およびD14S53、ならびにD14S258およびD14S63において必須の組換え体であることが明らかとなった。D14S53における単一組換え体 (FDA領域についてテロメリックな境界を描く) は、FAD1家系の同じADに冒された被験体中で生じた。このFAD1家系は、D14S48を包む、D14S53にテロメリックに位置するいくつかの他のマーカーにおいて組み換えられていることが既に見出されている (St.George-Hyslopら、1992)。逆に、D14S258における単一組換え体 (FAD領域のセントロメリックな境界をマークする) はFAD3家系の冒されたメンバーにおいて生じる。このFAD3家系はまた、D14S63を含む、D14S258に対してセントロメリックないくつかの他のマーカーにおいて組み換えられた。両方の組換え被験体は、そのファミリーの他の冒されたメンバー中の疾患についての標準的な臨床試験を通して確認されたアルツハイマー病の明白な証拠を有し、そして両方の組換え被験体の遺伝子型は、有益な情報を与え、そしてD14S53に対して中間でセントロメリックな、そしてD14S258に対してテロメリックなものの中の複数の遺伝子座において共分離する。

ハプロタイプ分析を、6つの大きな家系の減少した冒されたメンバーの再構築された遺伝子型ならびに0.95未満の連鎖に対する見込みを有する残りの15の家系由来のデータを含むように拡大すると、いくつかのさらなる組換え体が、D14S53とD14S258との中間の1つまたはそれ以上のマーカー遺伝子座で検出された。このように、1つのさらなる組換え体が、3つより大きなFAD家系 (FAD1、FAD2および他の関連ファミリー) のそれぞれの減少した冒されたメンバーの再構築された遺伝子型中に検出され、そして8つのさらなる組換え体が、5つより小さなFAD家系の冒されたメンバー中に検出された。しかし、これらの組換え体のいくつかは、さらに規定された標的領域内にAD3遺伝子を正確に配置したが、最初に議論した理由のためだけでなく、これらがD14S53-D14S258の間隔の間にAD3遺伝子に対して相互に一致しない位置を提供するために、これらの潜在的に近似である「内部組換え体」を信頼できないとみなすことは必要であった。

B . AD3領域にわたる物理的コンティグの構築

AD3遺伝子のクローニングに対する最初の工程として、酵母人工染色体ベクター、ファージ人工染色体ベクター、およびコスミドベクター中へクローン化された重複するゲノムDNAフラグメントのコンティグを構築した。YACクローン932c7および964f5由来のコスミドを用いるFISHマッピング研究は、AD3遺伝子を最も保有し得る間隔は、少なくとも5メガ塩

10

20

30

40

50

基のサイズであることを示唆した。この大きなサイズの最小共分離領域がポジショナルクローニングストラテジーを扱い難いものにしているために、D14S53およびD14S258により隣接されるインターバル内の1つまたはそれ以上のサブ領域に対するAD3遺伝子についての探索に焦点を合わせるさらなる遺伝的ポインターが求められている。D14S53とD14S258との間のマーカーでのハロタイプ分析は、この分析がFADの初期の発症形態を有する家系に制限されるか、または全ての家系を含むように一般化されるかどうかに無関係に、これらのマーカーのいずれかにおけるFAD形質と対立遺伝子との間の連鎖不均衡および／または対立遺伝子関連についての統計学的に有意な証拠を検出できない。この結果は、本発明者らの家系の多様な民族起源を考えれば意外ではなかった。しかし、同じ民族血統の家系を照合した場合、同じ民族起源の異なる家系において分離する疾患を有する染色体上で観察されたハプロタイプの直接観察は、マーカー遺伝子座の2つのクラスターを明らかにした。第1のこれらのクラスターはD14S77にセントロメリックに位置しており (D14S786、D14S277およびD14S268)、そしてYAC 78842においては含まれる0.95Mbの物理的インターバルにわたっている。第2のクラスターは、D14S77にテロメリックに位置しており (D14S43、D14S273、およびD14S76)、そしてオーバーラップするYACクローン964c2、74163、797d 11および854f5の一部の中に含まれる約1Mbの物理的インターバルにわたっている。同一の対立遺伝子が、同じ民族起源の少なくとも2つの家系中に観察された。ストラテジーの一部として、物理的にクラスター化したマーカー遺伝子座のこれらの1つの群において、共有する対立遺伝子の存在は、各種民族的集団において元々見出された染色体上のPS1遺伝子を取り囲む小さな物理的領域の同時遺伝を反映し得るということが解った。重要なことに、各共有された範囲のハプロタイプは、正常な白色人種集団ではまれであり、そして共有する対立遺伝子は、染色体14q24.3上の他の同様の遺伝的間隔にわたるマーカーの他の群においては観察されない。

C. 転写マッピングおよび候補遺伝子の分析

両方の重大な中間内にコードされる発現された配列を単離するために、ヒト脳mRNA由来の一次相補DNAプールから転写された配列を回収するために、ハイブリダイゼーション標的として、固定化され、クローニングされたヒトゲノムDNAを含む直接選択ストラテジーを用いた (Rommensら、1993)。大きさが100～600塩基対のおよそ900個の推定のcDNAフラグメントをこれらの領域より回収した。これらのフラグメントを、ヒトおよび他の哺乳動物由来のオーバーラップするYACクローンおよびゲノムDNAクローンのそれぞれ由来のゲノムDNAを含有するサザンプロットに対してハイブリダイズした。これにより進化的保存および／またはそれらがスプライスされたmRNA由来であることを示唆する複合体構造の証拠を示す151個のクローンのサブセットを同定した。このサブセット内のクローンを物理的 地図位置、クロス-ハイブリダイゼーションおよびヌクレオチド配列に基づいて照合しそしてこれらを用いてより長いcDNAのために従来のヒト脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。長さ1kbを超える少なくとも19個の独立したcDNAクローンを単離し、そして次にAD3領域の部分的転写地図に並べる。これらの転写物の内3個のみが既知の特徴付けされた遺伝子に対応した (cfOS、ジヒドロリポアミドスクイニルトランスフェラーゼ、および潜在的な形質転換増殖因子結合タンパク質2)。

D. 候補遺伝子の回収

候補遺伝子の各オープンリーディングフレーム部分を、正常コントロール被験体の死後の脳組織から、および染色体14に明らかに連鎖する6つの家系の冒されたメンバーの死後の脳組織、または培養した線維芽細胞株由来の単離されたmRNAのいずれかからRT-PCRにより回収した。次いで、RT-PCR産物を、化学的切断および制限エンドヌクレアーゼフィンガープリンティング一本鎖配列コンホメーション的多型法 (SaleebaおよびCotton、1993；LiuおよびSommer、1995) により、および直接的ヌクレオチド配列決定により、配列の相違についてスクリーニングした。1つの例外と共に、試験した全ての遺伝子（目的の物であるが）、冒された被験体に独特なまたは疾患と共に分離する配列内には変化を含まなかった。唯一の例外は、正常被験体中には観察されなかった一連のヌクレオチド変化を含むクローンS182により示される候補遺伝子であった。そしてこれは冒された被験体中のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を改変することが予測された。このクローンに対応する遺伝子をプレセニリン-1 (PS1) と称する。2つのPS1 cDNA配列 (以下に記載のオルタナティブスプライス変異体を示す) は、配列番号1および配列番号3として本明細書中に開示される。対応する予想されるアミノ酸配列を、それぞれ配列番号2および配列番号4として開示する。これらのcDNAクローンを有するBluescriptプラスミドは、ATCC, Rockville, Mdにおいて、ATCC受託番号97124および97508として、1995年4月28日に寄託されている。配列番号1および配列番号2に対応する配列はまた、GenBankデータベースに寄託されており、そして受託番号42110を通して検索され得る。

2. マウスプレセニリン-1 遺伝子の単離

ヒトPS1遺伝子のマウスホモログ (mPS1) を、hPS1遺伝子由来の標識化したヒトDNAプローブでマウスcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより回収した。この様式で、2 kb部分転写物 (遺伝子の3'末端を表す) および5'末端を表すいくつかのRT-PCR産物を回収した。マウスホモログのコンセンサスcDNA転写物の配列決定は、hPS1と実質的なアミノ酸同一性を明らかにした。重要なことに、以下に詳細に示すように、FAD家系中の変異した全てのアミノ酸は、マウスホモログと正常ヒト変異体との間に保存されていた。PS1遺伝子のこの保存は、マウス内に存在するオーソロガス (orthologous) な遺伝子の存在を示し (mPS1) 、そしてヒトPS1プローブを用いるゲノムまたはcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより他の哺乳動物のホモログまたはオートログをクローン化することを今や可能にする。従って、同様のアプローチは、他の種内でのPS1遺伝子を同定および特徴付けすることを可能にする。mPS1クローンの核酸配列を、配列番号16として本明細書中に開示し、そして対応するアミノ酸配列を配列番号17として開示する。両配列をGenBankデータベースに寄託し、そしてこれは受託番号42177を通して検索可能である。

3. ヒトプレセニリン-2 遺伝子の単離

今日プレセニリン-2 (PS2) と命名された、第2のヒト遺伝子を単離し、そしてPS1遺伝子と実質的な核酸およびアミノ酸相同性を共有することを実証した。この遺伝子の最初の単離は、Rogaevら (1995) に詳細に記載されている。ほぼ同一の方法によるヒトPS2遺伝子 (「STM2」と言われる) の単離がまた、Levy-Lahadら (1995) に報告されている。簡潔には、Altschulら (1990) のBLASTNパラダイムを用いる検索データベースに、PS1に対するcDNAのヌクレオチド配列を用いることにより、PS2遺伝子を同定した。受託番号T03796、R14600、およびR05907により同定された、実質的な相同性 ($p < 1.0 \times 10^{-100}$ 、少なくとも100の連続的な塩基対にわたる97%より大きい) のある、3つの発現された配列タグ化部位 (EST) を、位置付けた。

オリゴヌクレオチドプライマーを、これらの配列から作製し、そして逆転写酵素PCR (RT-PCR) によりPCR産物を生成するために用いた。これらの短いRT-PCR産物を部分的に配列決定してデータベース内の配列とのそれらの同一性を確認し、そして次いでハイブリダイゼーションプローブとして用いて全長cDNAライブラリーをスクリーニングした。1 kb ~ 2.3 kbの大きさにわたるいくつかの異なるcDNAをガン細胞cDNAライブラリー (Caco2) およびヒト脳cDNAライブラリー (E5-1, G1-1, cc54, cc32) から回収した。これらのクローンのヌクレオチド配列は、すべてが同じ転写物の誘導体であることを確認した。

転写物をコードする遺伝子である、PS2遺伝子は、物理的コンティグマップ (1q41に対するFISHによりマップされたYACクローン750g7、921d12；および1p36.1-p35に対してマップされたYACクローン787g12) 上に配置されたCEPH Mega YACクローンの2つのクラスターに対するハイブリッドマッピングパネルを用いてヒト染色体1にマップされた。hPS2クローンの核酸配列を配列番号18として本明細書中に開示し、そして対応するアミノ酸配列を配列番号19として開示する。両配列をGenBankデータベース中に寄託し、そしてこれらは受託番号L44577を通して検索し得る。hPS2クローンのDNA配列はまた、ベクター中に組み込まれ、そしてATCC、Rockville、MD., ATCC受託番号97214として1995年の6月28日に寄託されている。

4. *C.elegans* および *D.melanogaster* 中のホモログの同定

A. *C.elegans* のSPE-4

10

20

30

40

50

BLASTアライメントパラダイムを用いる利用可能なデータベースでのPS1の核酸配列および予想されるアミノ酸配列の比較は、*C.elegans*精子内在性膜タンパク質SPE-4と適度なアミノ酸類似性 ($p=1.5e-25$ 、少なくとも50残基の3群にわたる24~37%の同一性)、および哺乳動物クロモグラニンAおよび哺乳動物電圧依存性カルシウムチャンネルのサブユニットを含むいくつかの他の膜貫通タンパク質の部分とのより弱い類似性を明らかにした(Altschulら、1990)。推定の膜貫通ドメインを横切るアミノ酸配列類似性は、限られた数の疎水性アミノ酸から簡易に生じるアライメントをときには生じ得るが、しかしいくつかの親水性ドメインにおいてPS1とSPE-4との間には伸長された配列アライメントが存在する。両方の推定PS1タンパク質およびSPE-4は、同等の大きさ(それぞれ、467残基および465残基)であることが予想され、以下により十分に記載するように、最後の予想される膜貫通ドメインに先行する大きな酸性ドメインを有する少なくとも7つの膜貫通ドメインを含むことが予測される。PS1タンパク質は、N末端により長い予測された親水性領域を有する。

BLASTPアライメント分析はまたPS2と*C.elegans* SPE-4タンパク質との間の有意な相同意性 ($P=3.5e-26$ ；同一性=少なくとも22残基における5つのドメインにわたって20-63%)、および脳ナトリウムチャンネル(111サブユニット)ならびに種々の種由来の電圧依存性カルシウムチャンネルのサブユニットに対する弱い相同意性 ($P=0.02$ ；少なくとも35残基の2以上のドメインにわたって20~28%の同一性を)検出した(Altschul、1990)。これらのアライメントはPS1遺伝子についての上記のアライメントに類似している。

B. *C.elegans*のSel-12

*C.elegans*由来の461残基のSel-12タンパク質およびS182(配列番号2)が、460アミノ酸にわたり48%の配列同一性を共有することが見出された(LevitanおよびGreenwald、1995)。Sel-12タンパク質はまた複数の膜貫通ドメインを有すると考えられている。sel-12遺伝子(受託番号U35660)がin-12 gain-of-function変異の抑制についてのスクリーニングにより同定され、そして形質転換レスキューによりクローニングされた(LevitanおよびGreenwald、1995)。

C. *D.melanogaster*のDmPS

プレセニリン/Sel-12タンパク質の高度に保存された領域をコードする縮重オリゴヌクレオチドを調製し、そして成体および幼虫の*D.melanogaster*から関連したmRNAを同定するために用いた。これらのmRNAは配列決定され、そしてヒトのプレセニリンのアミノ酸配列に高度に相同意的な推定のアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームを含むことが示された。DmPS cDNAを配列番号20として同定する。

この配列は、ヒトのプレセニリンに対して約52%の同一性を有する541アミノ酸(配列番号21)のポリペプチドをコードする。

*D.melanogaster*ホモログの構造は、少なくとも7つの推定の膜貫通ドメインを有するヒトのプレセニリンの構造に類似する(15のウィンドウおよび1.5のカットオフを用いるKyte-Doolittle疎水性分析)。少なくとも1つのオルタナティブスプライス型の証拠が、541アミノ酸のORFを含むクローンpds13中に検出され(一方クローンpds7、pds14、およびpds1は、ヌクレオチド1300-1341を欠いている)。このオルタナティブスプライシングは、推定のTM6 7ループ内の残基384におけるGlyからAlaへの変換、およびより長いORFのコドン399におけるGlu残基に対するインフレーム融合の結果生じる。*D.melanogaster*とヒト遺伝子との間のアミノ酸配列の主要な相違は、N末端酸性親水性ドメイン内およびTM6 7ループの酸性親水性部分内に存在する。TM6 7ループを取り囲む残基は特に保存されており(残基220~313および451~524)、これらが機能的に重要なドメインであることを示唆している。20残基中16残基がヒトPS1およびPS2中で変異されており、そしてヒトFADは*D.melanogaster*ホモログ中で保存されていることが同定されている。

DmPS遺伝子のDNA配列はクローンとしてBluescriptプラスミド中に組み込まれている。安定なベクターはATCC受託番号97428の下に、1996年1月26日に、ATCC, Rockville, MD., に寄託された。

5. ヒトプレセニリン遺伝子の特徴付け

10

20

30

40

50

A . hPS1転写物および遺伝子構造

ノザンプロットへのPS1 (S182) クローンのハイブリダイゼーションは、主要な約2.8kbの転写物およびマイナーな約7.5kbの転写物としての、脳および末梢組織の多くの領域において広く発現した転写物を同定した（例えば、Sherringtonらの図2、1995を参照のこと）。PS1は脳のほとんどの領域において、および転写の低い肝臓を除くほとんどの末梢組織でわずかに一様に発現する。約7.5kbの転写物の同一性は不明確であるにもかかわらず、2つの観察は、約2.8kbの転写物がこの遺伝子の活性産物を示すことを示唆する。脳を含む、種々のマウス組織由来のmRNAを含むノーザンプロットへのPS1クローンのハイブリダイゼーションは、約2.8kbのヒト転写物に同一の大きさの単一の転写物のみを同定する。今日までに発見された、全てのより長いcDNAクローン（2.6～2.8kb）（5'および3'UTRの両方を含み、そしてノザンプロット上で約2.8kbのバンドを供給する）は、染色体14の同じ物理的領域に占有的にマップされている。
10

これらの実験から、約7.5kbの転写物は、稀な選択的にスプライシングされるかまたは約2.8kb転写物のポリアデニル化されたイソ型のいずれかを表し得るか、またはPS1に対する相同性を有する別の遺伝子を表し得る。PS1およびPS2両方を高レベルで発現するCaco2細胞株由来のcDNAライブラリーを、長い転写物についてスクリーニングした。2つの異なるクローン（GL40およびB53）を得た。配列決定により、両方のクローンが、類似の5'UTR、および脳内より短い2.8kbの転写物のORFと同一のORF含むことが明らかとなった。

両方のクローンは異常に長い3'UTRを含んでいた。この長い3'UTRは、さらに下流約3kbの別のポリアデニル化部位の使用を表す。この長い3'UTRは、パリンドロームまたはステムループ構造を生じる多くのヌクレオチド配列モチーフを含む。これらの構造は、mRNA安定性そしてまた翻訳効率に関係する。この観察の有用性は、上流のポリアデニル化部位が除去された組換え発現構築物および/またはトランスジーンを作製することを可能にし得、それにより下流のポリアデニル化部位およびより長い3'UTRの使用を強化することである。ある例において、これは標的化された細胞株において、またはさらに脳内のインビボで（生殖系列治療により、または遺伝子療法の形態用に変更されたヘルペス単純ウイルスベクターのようなウイルスベクターの使用のいずれかにより）、変異体対野生型転写物のバランスを変えることに利用され得る、優先的翻訳を用いて、選択されたmRNA種の安定性を促進し得る。
20

hPS1遺伝子は、Roswell Park PACライブラリー由来の200kb PAC1クローンRPCI-1 54D12内の少なくとも60kbのゲノム間、およびLos Alamos Chromosome 14コスミドライブラリー由来の3つの重複するコスミドクローン57-H10、1-G9、および24-D5にわたる。PS1遺伝子の転写物は、PACおよびコスミドクローンのサブクローン化された制限フラグメントへの、オリゴヌクレオチドおよび部分cDNAプローブの反復ハイブリダイゼーションにより、およびこれらのサブクローンの直接のヌクレオチド配列決定により同定されたエクソン13由来のRNAを含む。5'UTRは、その転写物の交互の5'末端を示すエクソン1および2と共に、エキソン1～4内に含まれる。そのORFは、エクソン4の一部またはエクソン9の全ての欠失をもたらすオールタネーティブスプライシング事象を用いて、エクソン4～13内に含まれる。
30

他に述べない限り、明瞭性および簡潔性のために、hPS1由来のヌクレオチド配列中のヌクレオチド位置に関する全ての参考は、配列番号1（L42110）（エクソン1で始まるhPS1 cDNA配列）の塩基番号を用いる。このcDNAにおいて、エクソン1はエクソン3に直接スプライシングされ、これはエクソン4～13にスプライシングされる。配列番号1において、エクソン1はヌクレオチド1～113位にわたり、エクソン3は114～195位にわたり、エクソン4は196～335位にわたり、エクソン5は336～586位にわたり、エクソン6は587～728位にわたり、エクソン7は729～796位にわたり、エクソン8は797～1017位にわたり、エクソン9は1018～1116位にわたり、エクソン10は1117～1203位にわたり、エクソン11は1204～1377位にわたり、エクソン12は1378～1496位にわたり、エクソン13は1497～2765位にわたる。同様に、他に述べない限り、hPS1由来のタンパク質配列中のアミノ酸残基位に関する全ての参考は、配列番号1の翻訳産物である、配列番号2の残基数字を用いる。
40
50

隣接するゲノム配列をエクソン 1 ~ 12について得、そしてそれらを配列番号 5 ~ 14中に示す（受託番号L76518 ~ L76527）。エクソン13の 5' のゲノム配列もまた決定し、そして配列番号15中に示す（受託番号L76528）。配列番号 5 ~ 14は完全なエクソン配列も含む。しかし、配列番号15は、エクソン13の 3' 末端を含まない。エクソン 1 および 2 に対応するゲノム配列は、2.6kbのBamHI-HindIIIフラグメント（配列番号 5）上で約240bp離れて位置する。エクソン 3 および 4（ATG開始コドンを含む）は、別の3 kbのBamHIフラグメント上に位置する。エクソン 2 の約850bp下流のBamHI部位と、エクソン 3 の約600bp上流のBamHI部位との間のインtron 2 の完全な配列はまだ同定されておらず、そして隣接するBamHI部位由来のプライマーを用いる拡張PCRにより即時に回収されておらず、このことは、インtron 2 が巨大であり得るという意味を含んでいる。

エクソン 1 および 2（配列番号 5）を取り囲むヌクレオチド配列の解析は、インtron 1 中のNotI制限部位を含む多くのCpGジヌクレオチドを明らかにした。アクチベータータンパク質-2（AP-2）の複数のクラスター、転写のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター（STAT3）（SchindlerおよびDarnell、1995）、ガンマアクチベーター配列（GASまたはSTAT1）、複数の開始部位エレメント下流（MED）（InceおよびScotto、1995）、およびGCエレメントを含むいくつかの推定の転写調節タンパク質に対するコンセンサス配列は、インtron 1 およびエクソン 1 の 5' 配列の両方の中に存在していた（配列番号 5 を参照のこと）。2つの推定のTATAボックスが、エクソン 1 の上流（配列番号 5 の bp 925 ~ 933bp および 978 ~ 987bp）に存在し、そしてこの後に2つの推定の転写開始（CAPまたはChambon-Trifonov）コンセンサス配列（配列番号 5 の 1002 ~ 1007bp および 1038 ~ 1043bp 488）が続く。対照的に、エクソン 2 のすぐ上流の配列はTATAボックスもCAP部位を欠くが、CpG島のクラスターに富んでいる。

hPS1遺伝子の構造的な構成の概略地図を図1として示す。非コードエクソンを黒四角で示す。コードエクソンを白四角またはオルタナティブスプライシングされた配列に対しては斜線四角で表す。制限部位を：B = BamHI；E = EcoRI；H = HindIII；N = NotI；P = PstI；V = PvuII；X = XbaIとして示す。制限部位の間の水平線中の不連続部分は未決定のゲノム配列を表す。各エクソンを含むクローニングされたゲノムフラグメントを、両端が矢印の水平線で示す。ゲノムサブクローンの大きさおよび各ゲノム配列に対する受託番号もまた提供する。

エクソン 1 の上流290bp内かつインtron 1 内のヌクレオチド配列に基づく約DNA 2 次構造の予測は、16kcal/molより大きい安定性を有するいくつかのパリンドームを明らかにする。これらの2次構造分析はまた、ヌクレオソーム（約76bp）を取り囲むのに十分なループサイズを有する3つの安定なステムループモチーフ（bp 1119 ~ 1129/1214 ~ 1224；bp 1387 ~ 1394/1462 ~ 1469；およびbp 1422 ~ 1429/1508 ~ 1515；全て配列番号 5 中）の存在を予測する。このようなステムループ構造は、TATA含有遺伝子の共通の特徴である（KollmarおよびFarnham、1993）。

これらの5'領域中の特徴の要約を表1に提示する。塩基位に対するすべての参照は、配列番号 5 に関する。

配列番号 1 中の最も長い予測されたオープンリーディングフレームは、467アミノ酸のタンパク質（配列番号 2）をコードする。このオープンリーディングフレームに対する開始コドンは、TGA停止コドンの下流に位置する最初の相内のATGである。最初の相内の2つのATGコドンの周囲には古典的なKozakコンセンサス配列は存在しない（Sherringtonら、1995）。古典的な「強力な」開始コドンを欠く他の遺伝子のように、ヒト転写物の推定の5' UTRはGCに富んでいる。

B . hSP1 5' UTRのオルタナティブ転写およびスプライシング

最初の3つのエクソンおよび第4のエクソンの部分が非翻訳領域を含むが、ヒト海馬cDNAライブラリー（Stratagene, La Jolla CA）からおよび結腸腺癌細胞株（J.Rommensからのaco2）から単離された複数の全長cDNAクローニングの分析が、多くのクローニングにおいて開始配列がエクソン 1 に由来し、そしてエクソン 1 が直接エクソン 3 にスプライシングされることを明らかにした（受託番号L42110、配列番号 1）。より頻繁でなく（9 クローニング中 1 クローニング）

10

20

30

40

50

ローン)、最初の転写された配列はエクソン2由来であり、そしてエクソン3上にスプライシングされた(受託番号L76517、配列番号3)。エクソン1中のプライマーを用いて単離した少なくとも40個の独立したRT-PCR転写物の直接的ヌクレオチド配列決定は、エクソン1およびエクソン2の両方を含むいかなるクローンを同定することにも失敗した。最終的に、エクソン2の上流のゲノム配列の観察は、3'スプライス部位配列を明らかにはしなかった。これらの観察は、エクソン2が、エクソン1中で開始する転写物のオルタナティブスプライス型またはcDNAクローニングの人工産物というよりはむしろ真の開始エクソンであることを主張する。さらに、エクソン2を含むクローン(cc44)は、同じモノクローナルCaco2細胞株から得られたので、エクソン1含有転写物およびエクソン2含有転写物の両方が同じ細胞に存在するようである。

エクソン1近接の5'上流領域のヌクレオチド配列に基づく転写開始部位についての予測を試験するために、本発明者らはエクソン1を含有する3つの独立した「全長」cDNAクローン(cc33、cc58およびcc48)。およびエクソン3中に位置するアンチセンスプライマーを用いてプライマー伸長することにより回収した3つの配列の5'末端配列を調べた。最も遠位の5'伸長がcDNA G40L中に見られ、これはエクソン1(配列番号5(L76518))を含有するゲノム配列中の1214bp位に最も近位の転写開始部位をマップし、従ってこれは配列番号1の-10位に対応する。2つのさらなるクローン(cDNA cc48および5'RACE産物#5)は、ゲノム配列(配列番号5)中の1259bp位の共通開始部位を共有し、これは配列番号1中の34位に対応する。2つの残りのcDNA、ならびに残りの5'RACEクローンは、エクソン1内により遠位の位置で開始した。5'RACEクローン#8は1224bpで開始し、これは配列番号1の1位に等しい。それゆえこれらのクローンは、いずれもエクソン1の上流の予想されたCAP部位まで伸長しなかった。エクソン2由来の開始配列を含有する転写物の低普及率により、これらの開始部位の類似の研究は行われていない。

C. hPS1 ORFのオルタナティブスプライシング

異なる開始配列を有する転写物に加えて、種々のライブラリーから回収された複数のcDNAクローンの分析がまた、ORFに影響するPS1転写物中の2つの変異を明らかにした。

これらの第1は、エクソン4の3'末端由来の12ヌクレオチドの比存在である(配列番号1のヌクレオチド324~335)。これはヌクレオチド335の後の代わりにヌクレオチド323の後での、エクソン4のスプライシングの結果生じる。エクソン4のこのオルタナティブスプライシングから生じる転写物は、配列番号2のアミノ酸残基Val26-Arg27-Ser28-Gln29をコードしない。エクソン4に対するこれらの2つのオルタナティブスプライシング事象から生じる転写物は、調査された全ての組織においてほぼ等しい頻度で検出された。マウスPS1転写物は、Ile26-Arg27-Ser28-Gln29に対するcDNA配列のみを含有し、そしてVal-Ar-g-Ser-Glnモチーフに対する配列は、Arg48-Ser49-Gln50としてヒトPS2中に部分的に保存されるのみであるということが現在までに調べられたクローンにおいて顕著である(Rogaevら、1995)。各々のこれらの観察は、これらの相違が適切なPS1機能には重要でないということを示唆する。

ORFに影響する第2のスプライシング変異は、エクソン9(配列番号1内のヌクレオチド1018~1116)の非存在を生じる。種々の組織のmRNA由来のRT-PCR産物の分析は、脳(ADにより代表的に影響される新皮質範囲を含む)およびいくつかの他の組織(筋肉、心臓、肺、結腸)がエクソン9を有する単一転写物を優先的に発現するということを示した。他方、白血球(リンパ芽球ではない)はまた、エクソン9を欠くより短い形態を発現した。エクソン9のオルタナティブスプライシングは、配列番号2中の257位のアスパラギン酸残基をアラニンに変化させ、次の33残基を排除し、そしてその結果エクソン10中にコードされた291位のトレオニンで開始する残りのタンパク質に対してインフレーム融合を生じることが予測される。

D. hPS2転写物

ヒトPS2遺伝子を含むゲノムDNAは、まだ完全には特徴付けされていない。それにもかかわらず、PS1遺伝子とPS2遺伝子との間の多くの類似性が明らかである。しかし、両方の遺伝子のイントロン/エクソン境界は、TM6~7ループの領域内を除いて非常に類似しているか

10

20

30

40

50

または一致しているようである。

ノザンプロットに対するPS2 cDNAクローンのハイブリダイゼーションは、脳の領域を含む多くの組織において約2.3kbのmRNAのバンド、ならびに筋肉、心筋および臍臓における約2.6kbのmRNAのバンドを検出した。PS2は、脳梁を除くほとんどの脳の領域において低レベルで発現し、脳梁では転写が高い。骨格筋、心筋および臍臓において、PS2遺伝子は、脳中におけるレベルよりも比較的高レベルでそして約2.3kbおよび約2.6kbの2つの異なる転写物として発現している。両方の転写物の大きさは、2.7kbのPS1転写物の大きさと明らかに区別されるサイズを有し、そして高ストリンジメントにおいて、PS1プローブとはクロスハイブリダイズしなかった。1つのhPS2対立遺伝子のcDNA配列は配列番号18（受託番号L44577）として同定される。

このPS2 cDNAコンセンサスヌクレオチド配列内の最も長いORFは、最初の相内のATGコドンから数えて448アミノ酸（配列番号19）を含むポリペプチド（配列番号18において366～368位）を予測し、これはKozakコンセンサス配列により取り囲まれた。停止コドンは、1710～1712位である。

PS1についてと同様にいくつかの組織（脳および筋肉を含む）のRNA由来のPS2 RT-PCR産物の分析は、その中で比較的大きなセグメントがスプライスアウトされ得る2つのオルタナティブスプライス変異体を明らかにした。従って、比較的低い頻度で、PS2転写物のヌクレオチド1152～1250（配列番号18）（配列番号19の残基263～295をコードする）がオルタナティブでスプライスされる転写物が産生される。以下で議論するように、このスプライシング事象は、PS1のエクソン9のオルタナティブスプライシングに密接に対応する（Rogaevら、1995）。

配列番号18中のヌクレオチド1338～1340位におけるGAAトリプレットを欠くPS2 cDNA配列のさらなるスプライス変異体がまた、調べた全ての組織において見出された。このオルタナティブスプライシングは、アミノ酸325位におけるGlu残基の削除を生じる。

6. プレセニリンタンパク質の構造

A. プレセニリンタンパク質ファミリー

プレセニリンは、多くの無脊椎動物および脊椎動物細胞に存在する推定の構造ドメインと関連する、共通の構造モチーフ、共通のオルタナティブスプライシングパターン、および共通の変異領域ホットスポットを有する高度に保存された膜内在性タンパク質の新規のファミリーとして開示される。HoppおよびWoodsアルゴリズムを用いるヒトプレセニリン遺伝子の推定アミノ酸配列の分析は、このタンパク質が、多岐にわたる膜内在性タンパク質（例えば、レセプター、チャンネルタンパク質、または構造膜タンパク質）であることを示唆する。推定上のhPS1タンパク質のKyte-Doolittleヒドロバシープロットを図2に示す。ヒドロバシープロットおよび構造分析は、これらのタンパク質が、親水性の「ループ」により分離されるおよそ7つの疎水性膜貫通ドメイン（TM1～TM7と称する）を有することを示唆する。他のモデルは、予測アルゴリズムにおいて用いられるパラメーターに依存して、5つ程度および10個程度の膜貫通ドメインを有すると予測され得る。しかし、7つの膜貫通ドメインの存在は、G-結合レセプタータンパク質のいくつかのクラスの特徴であるが、これはまた他のタンパク質（例えば、チャンネルタンパク質）で観察されている。認識可能なシグナルペプチドの非存在および少數のグリコシル化部位は注目すべきである。hPS1およびmPS1タンパク質のアミノ酸配列を図3において比較し、そしてhPS1およびhPS2タンパク質の配列を図4で比較する。各図において、同一のアミノ酸残基を垂直線により示す。7つの推定上の膜貫通ドメインを配列の上または下の水平線により示す。

このファミリーのメンバー間の主要な差異は、N末端における親水性、酸性ループドメインおよびプレセニリンタンパク質の推定上のTM6およびTM7ドメインの間（TM6～7ループ）のアミノ酸配列内にある。hPS1エクソン9（これはいくつかの非神経組織においてオルタナティブスプライシングされる）によりコードされる残基のほとんどは、推定上のTM6～7ループの一部を形成する。さらに、hPS2において同定された対応するオルタナティブスプライシング変異体はTM6～7ループの一部をコードするようである。この親水性ループの可変スプライシング、およびこのループのアミノ酸配列がこの遺伝子ファミリーのメンバー

間で異なるという事実は、このループがタンパク質の重要な機能的ドメインであり、そして個々のプレセニリンタンパク質の生理学的および病理学的相互作用に対するいくつかの特異性を付与し得ることを示唆する。N末端の親水性ドメインが、TM6 7親水性酸ループと同じ酸性電荷を共有し、そして7つの膜貫通ドメインモデルにおいて膜に関して同じ方向を有するようであり、そしてプレセニリン間で変化し得るので、これらの2つのドメインは、調和しているかまたは独立した様式のいずれかで機能性（例えば、同一のまたは異なるリガンドあるいは機能的特性）を共有するようである。従って、N末端はまた、このタンパク質の重要な機能的ドメインであり、そして個々のプレセニリンタンパク質の生理学的および病理学的相互作用に対していくつかの特異性を付与し得るようである。

以下に詳述されるように、PS1およびPS2クラスターにおける病理学的変異は、TM1 2ループおよびTM6 7ループのまわりに存在し、これらのドメインがこれらのタンパク質の機能的ドメインであることをさらに示唆する。図5および図6は、図面上に示された既知の変異部位とともに、それぞれ、PS1およびPS2遺伝子の予測される構造の模式図を示す。図面上に示されるように、TM1 2結合配列は、N末端およびTM6 7ループのそれに対して膜の反対側に存在することが推定され、そして膜貫通連絡において重要であり得る。このことは、早発性（30～40歳）の家族性ADを有する家系において観察されたPS1 Y115H変異により、そしてループを不安定化することが予測され得る、TM1/2らせんにおけるさらなる変異により支持される。TM1 2ループは比較的短く（PS1：残基101～132；PS2：残基107～134）、このことは、これらの配列に従来のペプチド合成をより受け入れ易くしている。7つのPS1変異領域は、コドン82とコドン146との間の領域に存在し、この領域はPS1における推定上の第1の膜貫通ドメイン（TM1）、TM1 2ループ、およびTM2ドメインを含む。同様に、PS2のコドン141における変異もまたTM2ドメインに位置する。これらの変異は、おそらく、TM1およびTM2におけるTM1 2ループドメインおよびのその固着ポイントを不安定化する。12個のPS1変異は、約コドン246とコドン410との間のアミノ酸の変化を生じ、これらの変異はTM6、TM6 7ループ、およびTM7ドメインに含まれる。これらの変異は、TM6 7ループの構造または安定性を（直接的か、あるいはTM6またはTM7のコンフォメーションを改変することによるかのいずれかで）改変し得る。

TM6 7ループに存在する重要な機能的役割に関するさらなる証拠は、プレセニリンタンパク質ファミリーの異なるメンバー間のTM6 7ループの中央部分（およそアミノ酸300～371）における配列相違である。同様に、プレセニリンタンパク質ファミリーのメンバーのN末端配列もまた互いに異なるので、わずかに異なる配列が各々の異なるプレセニリンタンパク質の機能に特異性を付与する役割を果たし、一方、保存された配列が共通の生物学的活性を付与するようである。これらの領域はリガンド結合部位を表し得る。そうである場合には、TM6 7領域中の変異は、リガンド結合活性を改変するようである。プレセニリンタンパク質ファミリーの異なるメンバー間で保存されているTM1 2ループは、おそらく、反対の膜面上のエフェクタードメインを表す。エクソン10スプライシング変異を除いて、他の（ミスセンス）変異のほとんどは、推定上の膜貫通ヘリックスの同じ表面上に整列する。このことは、それらがリガンド結合またはチャンネル機能に影響し得ることを示唆する。従って、これらのドメイン（例えば、TM6 7ループおよびTM1 2ループ）は、変異の効果を阻害し、そして/またはアルツハイマー病を有する被験体においてプレセニリンタンパク質の正常機能を回復させる特異的結合因子を開発するための部位として用いられ得る。

C.elegansSPE-4遺伝子の推定上の産物とPS1遺伝子の推定上の産物との間の類似性は、これらが類似した活性を有し得ることを暗示している。SPE-4タンパク質は、精子発生の間の線維体-膜オルガネラ（FBMO）複合体の形成および安定化に関与するようである。FBMOは特定化されたゴルジ由来オルガネラであり、平行したタンパク質線維の複合体に接着し、そしてこれを部分的に取り囲む膜結合小胞からなり、そして可溶性ポリペプチドおよび膜結合ポリペプチドの輸送および貯蔵に関与し得る。SPE-4における変異はFBMO複合体を解離させ、そして精子発生を停止させる。従って、SPE-4の病理学的機能は、膜内在出芽（budding）と融合事象との間の相互作用を安定化するか、または精子発生の間のFBMO複

10

20

30

40

50

合体の細胞内輸送の間に膜タンパク質と線維性タンパク質との間の相互作用を安定化するかのいずれかであり得る。匹敵する機能が、プレセニリンについて予想され得る。例えば、PS1は、APPのような他の膜結合タンパク質のドッキング、または（例えば、ゴルジ器官またはエンドソーム-リソソーム系における）タンパク質輸送の間の膜結合小胞の軸索輸送および融合出芽のいずれかに関与し得る。これらの仮説が正しい場合、変異は、APPの異常な輸送およびプロセシングならびに/または微小管会合タンパク質Tauのような細胞骨格タンパク質との異常な相互作用を生じることが予測され得る。APPおよびTauの両方の細胞内および細胞外配置における異常性は、実際、アルツハイマー病の神経病理学的特徴の必要不可欠な部分である。推定上のタンパク質の保存されたドメイン内の高度に保存された残基におけるPS1およびPS2変異の位置は、これらが病原性であることを示唆しているが、これらの変異のうちの少なくとも3つはそれら自身保存的であり、このことは成体生物における疾患の発症に対応する。発現または機能の完全な欠損を生じることが期待される欠失またはナンセンス変異は今日まで観察されていないで、本発明者らは、これらの変異が優性な機能獲得効果 (gain-of-function effect) を有し、従って、APPの異常なプロセシングまたは正常なAPPプロセシングの停止を生じる優性な機能喪失効果 (loss-of-function effect) を促進するかどうかを予測し得ない。エクソン10スプライシング変異は、エクソン9からエクソン10へのインフレーム融合を引き起こし、そして細胞内標的化またはリガンド結合を改変し得るPS1タンパク質における構造的効果を有し得るか、そうでなければPS1機能に影響し得る。

別の可能性は、PS1遺伝子産物がレセプターまたはチャネルタンパク質を表し得るということである。このようなタンパク質の変異は、脊椎動物（例えば、ヒトにおける悪性高熱、高カリウム血性周期性麻痺）および無脊椎動物細胞 (*C.elegans*におけるdeg-1 (d) 変異) の両方におけるいくつかの他の神経学的疾患に原因として関連する。これらの他の優性疾患の病理はアルツハイマー病の病理とは類似していないが、アルツハイマー病においてイオンチャネルの機能性異常に關する証拠がある。例えば、テトラエチルアンモニウム感受性113pSカリウムチャネルおよびカルシウムホメオスタシスにおける異常が報告されている。PS1と電位依存性カルシウムチャネルの-1Dサブユニットとの間の弱い相同性、および培養細胞における細胞内カルシウムの増大がアルツハイマー病の生化学的特徴のいくつか（例えば、Tau微小管結合タンパク質のリン酸化における改変およびAペプチドの増加した産生）を複製し得るという観察から、膜貫通カルシウムフラックスにおける混乱が特に関連し得る。

B. hPS1構造

配列番号2に示すように、ヒトPS1タンパク質の最も大きい既知の形態は467アミノ酸を含有し、そして約51.37kDaの推定分子量を有する。上述のエクソン4のオルタナティブスプライシング（配列番号2の26～29位に対応する残基が欠失される）を有する変異体は、アミノ酸が4個少なく、そして約50.93kDaの分子量を有する。同様に、上述のエクソン9のオルタナティブスプライシング（配列番号2の258～290位に対応する残基が欠失される）を有する変異体は、アミノ酸が33個少なく、そして約47.74kDaの分子量を有する。推定上のドメインの位置を表2に示す。残基位置の番号付けは、配列番号2に關与し、そしておよそ（すなわち、±2残基）であることにさらに留意されたい。

推定上のPS1構造の模式図を図5に示す。N末端はいくつかの潜在的なリン酸化ドメインを有する、高度に親水性の負に荷電したドメインであり、その後に順番に、約19残基の疎水性膜貫通ドメイン(TM1)、約32残基の荷電した親水性ループ(TM1-2)、短い(1～15残基)親水性ドメイン(TM2-3からTM5-6)が点在する5つのさらなる疎水性膜貫通ドメイン(TM2からTM6)、さらなるより大きな酸性親水性荷電ループ(TM6-7)、および少なくとも1つ(TM7)、おそらくは2つの他の疎水性の潜在的膜貫通ドメインが続き、C末端の極性ドメインに達する。

このタンパク質はまた、多数の潜在的なリン酸化部位を含有する。そのうちの1つはMAPキナーゼコンセンサス部位であり、この部位はまた、神経原線維濃縮体への正常Tauの変換の間のTauのリン酸化過剰に關与する。このコンセンサス配列は、アルツハイマー病の

10

20

30

40

50

他の生化学的局面にこのタンパク質の活性と連結した推定上のエレメントを提供し得、そして有望な治療的標的を表す。タンパク質構造の検閲により、MAPキナーゼコンセンサス配列である5/T-Pモチーフを表すYTPF（残基115～118、配列番号2）およびSTPE（残基353～356、配列番号2）の2つの配列が示される。いくつかの他のリン酸化部位は、プロテインキナーゼC（PKC）活性に対するコンセンサス配列とともに存在する。PKC活性がアルツハイマー病に関連するAPPの代謝における差異と関連するので、PS1タンパク質およびそのホモログ上のこれらの部位はまた、標的化療法のための部位である。予備的な証拠により、少なくともトランスフェクトされた細胞において、PS1タンパク質は微少な程度しかリン酸化されず、一方、PS2タンパク質は有意にリン酸化されることが示されている。少なくともPS2については、このリン酸化は、PKCに関与しない機構によりN末端ドメインのセリン残基上で起こるようである（Capelliら、1996）。 10

エクソン4の末端におけるオルタナティブスプライシングは、親水性N末端ドメインから4個のアミノ酸を除去し、そしてリン酸化コンセンサス配列を除去することが予期されることに留意されたい。さらに、エクソン9のオルタナティブスプライシングは、短縮されたイソ型のPS1タンパク質を生じる。ここで、TM6のC末端の5つの疎水性残基、およびTM6に対して直ぐC末端の親水性の負に荷電したTM6 7ループの一部は欠けている。このオルタナティブスプライシングされたイソ型は、N末端から配列番号2の256位におけるチロシンまでそしてこのチロシンを含む配列の保存、257位のアスパラギン酸のアラニンへの変化、およびこのタンパク質のチロシン291から（そしてそれを含む）C末端への配列のスプライシングによって特徴付けられる。このようなスプライシングの差異は、しばしばタンパク質の重要な機能的ドメインに関連する。このことは、この親水性ループ（従って、類似のアミノ酸電荷を有するN末端親水性ループ）がPS1産物の活性な機能的ドメインであり、従って治療的標的化のための部位であることを示している。 20

C. ヒトPS2構造

ヒトPS1とPS2タンパク質は全アミノ酸にわたって63%の同一性を示し、そしていくつかのドメインは事実上完全に同一であることを示している。従って、期待されるように、疎水性分析は、両方のタンパク質がまた同様の構造的機構を共有することを示唆する。従って、両方のタンパク質は7つの疎水性の推定上の膜貫通ドメインを有することが予測され、そして両方のタンパク質はN末端およびTM6とTM7との間に大きな酸性の親水性ドメインを有する。さらなる類似性が、脳および筋肉RNA由来のRT-PCR産物の上記の分析から明らかであり、これはPS2転写物のヌクレオチド1153～1250がオルタナティブスプライシングされることを明らかにした。これらのヌクレオチドはアミノ酸263～296をコードし、これらのアミノ酸は、推定上のPS2タンパク質のTM6 7ループドメイン内に位置し、そしてPS1中のオルタナティブスプライシングされたアミノ酸257～290と94%の配列同一性を共有する。 30

hPS2タンパク質の推定上の機能的ドメインの位置を表3に記載する。残基位置は配列番号19の残基位置を参照し、そしてその位はおよそである（すなわち、±2残基）であることに留意されたい。

推定上のPS2構造の模式図を図6に示す。hPS1とhPS2との間の類似性は、PS1タンパク質のTM1とTM6との間およびTM7からC末端までの間隔に対応するタンパク質のいくつかのドメインにおいて最も大きい。PS1とPS2との主要な差異は、負に荷電した親水性TM6 7ループのサイズおよびアミノ酸配列、ならびにN末端の親水性ドメインの配列にある。 40

2つの予測されるアミノ酸配列間の最も顕著な差異は、TM6 7親水性ループ（hPS1の残基304～374；hPS2の残基310～355）の中心部分のアミノ酸配列内、そしてN末端の親水性ドメイン内に現れる。類推により、このドメインはまた、マウスPS1遺伝子とヒトPS1遺伝子との間で高度には保存されておらず（同一性=47/60残基）、そしてSPE-4の相当する領域に対してなんら類似性を示さない。

7. プレセニリン変異体

A. PS1変異体

PS1遺伝子内のいくつかの変異が同定されており、これらは重篤なタイプの家族性アルツ

10

20

30

40

50

ハイマー病を引き起こす。これらの変異の1つまたは組み合わせは、この型のアルツハイマー病ならびにいくつかの他の神経学的疾患の原因であり得る。これらの変異は、予想されるアミノ酸配列中の変異を導くか、あるいは異常な転写物プロセシング、レベル、または安定性を導くヌクレオチド配列の置換、挿入、または欠損の任意の形態であり得る。又クレオチドの形態における変異および/またはアミノ酸欠損あるいは置換を引き起こす特異的な疾患が以下に記載されるが、さらなる変異が他のファミリーで見出されることが予測される。実際、8つの異なる家系間の5つの異なるミスセンス変異の最初の発見 (Sherringtonら、1995) の後、他の遺伝病 (例えば、Ca²⁺スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子中の変異と関連する筋萎縮性外側硬化症) での実験から、さらなる変異が同定されることが予測された。この予測は、プレセニリン中のさらなる変異の本発明者らの引き続く発見 (Rogaevら、1995) により、そして他者による同様の観察 (例えば、Crutsら、1995; Campionら、1995) により実現されている。従って、PS1遺伝子およびタンパク質に関して本明細書中で用いられるように、用語「変異体」はこれらの特定の変異体に限定されるよりは、むしろ上記で規定されたように解釈されるべきである。

第14染色体に連鎖した6つの大きな家系の発症したメンバーから単離された2.8kbのS182転写物にわたるオーバーラップRT-PCR産物の直接的な配列決定は、最初に、6つの家系の各々における5つのミスセンス変異の発見を導いた。これらの各変異は、それぞれの家系における疾患とともに同時に分離され、そしてFAD家系と同じ民族起源から抜き出された142人以上の無関係な神経学的に正常な被験体 (284個の無関係な染色体) には存在していなかった。AD3形質とともに分離する物理的間隔内のこの遺伝子の位置、第14染色体に最終的に連鎖した6つの家系における疾患形質とともに同時に分離する8つの異なるミスセンス変異の存在、および284人の個体の正常な染色体におけるこれらの変異の非存在は、PS1遺伝子がAD3座位であるということを累積的に確認する。この仮説に対するさらなる生物学的な支持は、FAD家系における変異した残基が進化において保存されている (例えば、hPS1 v. mPS1) という事実、それらの変異がまた、他の脊椎動物および非脊椎動物ホモログにおいて高度に保存されているタンパク質のドメインに位置するという事実、およびPS1遺伝子産物が脳のほとんどの領域 (ADが最も重篤に発症した領域を含む) において高レベルで発現しているという事実から生じる。

PS1遺伝子の最初の発見以来、ADの発生に関連した多くのさらなる変異がカタログに加えられている。表4は多数のこれらを特徴付ける。各々の観察されたヌクレオチド欠損または置換は、PS1転写物の推定上のORF内に生じ、そして示された位置でコードされたアミノ酸を変化させることが予想された。それらの変異は、配列番号1中のそのヌクレオチド位置に関して、そして配列番号2中のそのアミノ酸位置に関して列挙される。「NA」の記入は、データが入手可能でなかったことを示す。

次の節で議論されるように、多くのPS2変異がまた見出されている。hPS1配列とhPS2配列との比較は、図4に示され、そしてこれらの病理学的変異が、PS1タンパク質内に保存されているPS2タンパク質の領域内にあることを示す。それ故、PS1タンパク質内の対応する変異はまた、病理学的であることが予測され得、そして本明細書中で提供され、そして可能にされたPS1変異体中に含まれる。さらに、プレセニリン遺伝子の任意の保存された領域において同定される任意の病理学的変異は、その保存された領域を共有する他のプレセニリンの変異体を表すことが想像され得る。

興味深いことに、変異A260V、C263R、P264L、P267S、E280A、E280G、A285V、L286V、1-319、G384A、L392V、およびC410Yはすべて、推定上の膜貫通ドメインであるTM6とTM7との間の酸性親水性ループ中またはその近傍に生じる。これらの変異のうち8つ (A260V、C263R、P264L、P267S、E280A、E280G、A285V、L286V) はまた、オルタナティブスプライシングドメイン (配列番号2の残基257~290) 中に位置する。

これらすべての変異は、成熟mRNA/cDNA配列またはゲノムDNAを提示するRT-PCR産物を用いて、種々のストラテジー (直接的ヌクレオチド配列決定、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド、連結ポリメラーゼ連鎖反応、SSCP、RFLP、新規の「DNAクリップ」技術など) によりアッセイされ得る。

10

20

30

40

50

最終的に、明らかに有害な効果を有さないいくつかの多型がまた発見されていることに注意すべきである。これらのうちの1つは、配列番号1のヌクレオチド863のT G変化であり、これはTM4中のF205L多型を生じる。他のもの（1700bpにおけるC A；2603bpにおけるG A；2620bpの欠損）は

3'UTR

中に存在する。

B. PS2変異体

PS1遺伝子産物とPS2遺伝子産物との間の強い類似性は、PS2遺伝子が、第14染色体、第19染色体、および第21染色体を排除した遺伝的連鎖研究において、いくつかの週数の初期発病型のAD家系中における、疾患を引き起こす変異の部位であり得る可能性を生じた。RT-PCRを用いて、APPおよびPS1遺伝子における変異が直接配列決定研究によりすでに排除されている、初期発病型FADを有する8つの家系の発症したメンバーの、リンパ芽球、線維芽細胞、または死後の脳組織由来のPS2転写物に対応するcDNAが単離された。

これらのRT-PCR産物の調査により、初期発病型の、病理学的に確認されたFAD（50～70歳で発病）を有するイタリア人起源（Flo10）の拡張した家系のすべての4つの発症したメンバー中のヌクレオチド1080におけるヘテロ接合のA G置換が検出された。この変異はTM5中のコドン239におけるMet Valミスセンス変異を引き起こすことが予測される。

TM2中のコドン141におけるAsn Ile置換を引き起こす第2の変異（ヌクレオチド787におけるA T）が、Volga German祖先（細胞株AG09369、AG09907、AG09952、およびAG09905、Coriell Institute、Camden NJで示される）の関連家系の群の発症したメンバー中に見出された。意味ありげに、1つの被験体（AG09907）はこの変異に対してホモ接合であった。観察はこれらの家系の近交系の性質と矛盾しない。意味ありげに、この被験体はN141I変異体に対してヘテロ接合である被験体の臨床像と顕著に異なる臨床像を有さなかった。いずれのPS2遺伝子変異も284人の正常白色人種コントロールには見出されず、これらはADのAD3型を有する家系の発症したメンバー中にも存在しない。

これらのPS2変異の両方は、PS1/PS2遺伝子ファミリー内に高度に保存されている残基の置換を引き起こすことが予測される。

さらなるPS2変異は1624塩基対におけるT C置換により引き起こされ、これはC末端のコドン420におけるIleからThrへの置換を引き起こす。この変異は初期発病型（45歳）家族性ADのさらなるケースにおいて見出された。

これらのhPS2変異を、配列番号18中のそれらのヌクレオチド位置に関して、そして配列番号19中のそれらのアミノ酸位置に関して、表5中に列挙する。表中の「NA」の記述は、そのデータが入手不可能であったことを示す。

前のセクションで議論したように、多くのPS1変異がまた見出されている。hPS1配列とhPS2配列との比較を図4に示し、そしてこれらの病理学的変異はPS1タンパク質のPS2タンパク質中で大いに保存されている領域中に存在することを明らかにする。従って、PS2タンパク質中の対応する変異もまた病理学的であることが予測され得、そして本明細書中に提供され、かつ実施可能であるPS2変異体中に含まれ得る。さらに、プレセニリン遺伝子の任意の保存された領域において同定された任意の病理学的変異は、この保存された領域を共有する他のプレセニリンの変異体を表すことが予測され得る。

その産物が、PS1遺伝子産物と実質的なアミノ酸類似性および構造類似性を共有することが予測される遺伝子の発現は、これらのタンパク質が重複する機能について無関係なタンパク質として機能的に関与し得るが、多量体のポリペプチドの物理的に会合したサブユニットとして、または同じ経路において連続的な機能を行う無関係なタンパク質として、おそらくわずかに異なる特定の活性を有することを示唆する。

ADの家族型を有する被験体中のPS2タンパク質の保存されたドメインにおける3つの異なるミスセンス変異の観察は、これらの変異が、PS1遺伝子中の変異と同様にADの原因となることを示す。この結論は重要である。なぜなら、PS1遺伝子中の変異に関連する疾患表現型（30～50歳で発病、持続期間10年）がPS2遺伝子中の変異に関連する疾患表現型（40～70歳で発病、持続期間20年まで）と微妙に異なるので、一般的な類似性は、この遺伝子

10

20

30

40

50

ファミリーのメンバーにより包含される生化学的経路が少なくとも初期発病型ADの発生の中心であることを明確に主張する。疾患表現型における微妙な差異は、CNS中のPS2転写物の低レベルの発現を反映し得るか、またはPS2遺伝子産物に対する異なる役割を反映し得る。

PS1変異の効果に対する類似により、変異した場合のPS2は、APP（アミロイド前駆体タンパク質）からAペプチドへの異常なプロセシング、Tau微小管結合タンパク質の高リン酸化、および細胞内カルシウムホメオスタシスの異常性を引き起こし得る。これらの異常な相互作用の妨害は、ADにおける治療的介入を提供する。

最終的に、少なくとも1つのヌクレオチド多型は、コードされたアミノ酸配列中にいかなる変異も伴わないで、そのPS2 cDNAが配列番号18の626bpでT C変化を有する、ある正常な個体において見出されている。

III. 好ましい実施態様

本明細書中に開示および記載される発見に部分的に基づいて、本発明の以下の好ましい実施態様を提供する。

1. 単離された核酸

ある一連の実施態様において、本発明は、本明細書中に開示されるプレセニリンの核酸配列に対応または関連する、単離された核酸を提供する。以下でより十分に記載されるように、これらの配列としては、ヒトおよび他の哺乳動物種由来の正常PS1および正常PS2の配列、ヒトおよび他の哺乳動物種由来の変異PS1および変異PS2の配列、*Drosophila*および*C. elegans*のような非哺乳動物種由来の相同配列、プローブおよびPCRプライマーとして有用なこれらの配列のサブセット、プレセニリンタンパク質のフラグメントをコードするかまたは特定の構造ドメインもしくは多型領域に対応するこれらの配列のサブセット、プレセニリン遺伝子のフラグメントに対応する相補配列またはアンチセンス配列、プレセニリンコード領域が外因性調節領域に作動可能に結合されている配列、および発現のマーカーとして、精製のための「タグ」として、またはプレセニリンと相互作用するタンパク質についてのスクリーニングおよびアッセイにおいて有用な、他のタンパク質に融合したプレセニリンタンパク質の一部の融合タンパク質をコードする配列が挙げられる。

従って、第1の一連の実施態様において、正常バージョンまたは変異バージョンのPS1タンパク質およびPS2タンパク質をコードする、単離された核酸配列を提供する。このような核酸配列の例を、本明細書中に開示する。これらの核酸配列は、ゲノム配列（例えば、配列番号5～15）であり得るか、またはcDNA配列（例えば、配列番号1、3、16、および18）であり得る。さらに、核酸は、組換え遺伝子または「ミニ遺伝子」であり得、ここで全てまたはいくつかのイントロンの、イントロンの種々の組合せ、ならびにエキソンおよび局所的なシス作用性調節エレメントは、増殖または発現の構築物またはベクターにおいて操作され得る。従って、例えば、本発明は、本明細書中に記載されるオルタナティブスプライス変異体がDNAレベルで取り込まれてあり、従って、これらの配列を含む細胞が、各スプライシング部分で唯一のオルタナティブスプライス変異体を発現することを可能にする、核酸配列を提供する。一例として、PS1遺伝子のエキソン1の3'末端（配列番号5の1337bp）がエキソン3の5'末端（配列番号6の588bp）に直接連結され、その結果、優勢な転写物に対応する転写物のみが産生される、組換え遺伝子を産生し得る。明らかに、エキソン2およびエキソン3のオルタナティブスプライシングを「強制する」組換え遺伝子をまた作製し得る。同様に、PS1のエキソン4またはエキソン9のスプライス変異体（またはPS2の対応するTM6～7スプライス変異体）の1つがDNAに組み込まれた組換え遺伝子を作製し得、その結果、この組換え遺伝子を含む細胞は、これらの変異体のうちの1つのみを発現し得る。組換えプレセニリン遺伝子のサイズを減少させるために、cDNA遺伝子を使用し得るか、またはイントロンおよび非翻訳エキソンの種々の組合せをDNA構築物から除去し得る。最終的に、5'UTRが変化して、その結果、転写が2つの転写開始部位の一方または他方から必ず進行する、組換え遺伝子を作製し得る。このような構築物は、以下に記載するように、プレセニリンの発現を誘導または抑制し得る化合物の同定において特に有用であり得る。これらの実施態様の多くの改変はここで、本明細書中に提供される

10

20

30

40

50

プレセニリン遺伝子の詳細な説明によって可能になる。

開示されるプレセニリン配列に加えて、当業者は、現在、開示される配列の対立遺伝子であるプレセニリン遺伝子もしくはcDNA、または異種特異的ホモログであるプレセニリン遺伝子もしくはcDNAを表す核酸を同定しそして単離することが可能である。従って、本発明は、これらの対立遺伝子およびホモログ、ならびにこれらの配列由来の種々の上記の組換え構築物に対応する単離された核酸を、当該分野で周知の手段によって提供する。簡潔に記載すると、当業者は、現在、ゲノムまたはcDNAの調製物（個々の生物（例えば、ヒトAD患者またはそれらの家族の一員）ならびに細菌、ウイルス、酵母、または他のゲノムもしくはcDNAのライブラリーから調製したサンプルを含む）を、対立遺伝子配列または相同配列を同定するためのプローブまたはPCRプライマーを使用してスクリーニングし得る。A 10 Dまたは他の疾患の発達に寄与し得るさらなるプレセニリン遺伝子変異を同定することが望ましく、病原性でないさらなるプレセニリン多型を同定することが望ましく、そして、ADの研究および潜在的な治療のためスクリーニングに使用し得る種々の動物モデルの作製もまた望ましいので、さらなるプレセニリン配列が、ヒト核酸の他の調製物またはライブラリー、および動物（ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタおよび非ヒト靈長類を含む）由来の調製物またはライブラリーから単離されることが、特に意図される。さらに、酵母または無脊椎動物（*C.elegans*および他の線虫、ならびに*Drosophila*および他の昆虫を含む）由来のプレセニリンホモログは、薬物のスクリーニングに特に有用性を有し得る。例えば、迅速に生じて容易に評点される表現型（例えば、数日後の異常な外陰または眼の発達）を生じる変異プレセニリンホモログ（または哺乳動物のプレセニントランスジーン）を有する無脊椎動物を、変異遺伝子の効果をブロックする薬物のふるいとして使用し得る。このような無脊椎動物は、より大きな脊椎動物よりも大量のスクリーニングのためにはるかに迅速かつ有効であることを立証し得る。一旦、リード化合物が、このようなスクリーニングを通して見出されたら、これらは高等動物において試験され得る。

標準的なハイブリダイゼーションスクリーニングまたはPCR技術を、比較的短いプレセニリン遺伝子配列を使用して（例えば、mPS1遺伝子の同定において使用されたように）、このような対立遺伝子配列および相同配列を同定および／または単離するために使用し得る。配列は、標的配列の性質、使用する方法、および必要とされる特異性に依存する、8個以下のヌクレオチドを含み得る。将来の技術発展により、より短い配列の有利な使用ですら可能になるかもしれない。現在の技術では、9～50ヌクレオチド、および好ましくは約18～24の配列が好ましい。これらの配列は、本明細書中で開示された配列から選択され得るか、または本明細書中で可能になった他の対立遺伝子ホモログまたは異種特異的ホモログ由来であり得る。mRNAをプローブするかまたはcDNAライブラリーをスクリーニングする場合、コード配列（イントロンよりはむしろ）由来のプローブおよびプライマーを好ましくは使用し、そしてオルタナティブスプライシング変異体において削除される配列は、代表的には、これらの変異体を同定することが特に所望されない限り、避ける。プレセニリン遺伝子の対立遺伝子変異体は、本明細書中で規定されるように、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、開示された配列とハイブリダイズすると予想され得るが、一方で、より低いストリンジェントを使用して異種特異的ホモログを同定し得る。

別の一連の実施態様において、本発明は、プレセニリン配列またはそれらの相補物のサブセットを含む単離された核酸を提供する。上記で注意したように、このような配列は、プレセニリン遺伝子の対立遺伝子変異体および相同変異体の同定および単離におけるプローブおよびPCRプライマーとしての有用性を有する。上記のように、プレセニリンの多型領域に対応するサブ配列はまた、以下のように、診断目的のための個体のスクリーニングおよび／または遺伝子型決定における特別な有用性を有する。さらに、また以下に記載するように、このようなサブセットは、（1）融合タンパク質に含まれるプレセニリンタンパク質のフラグメント、（2）結合研究に使用するためのプレセニリンタンパク質の機能的ドメインを含むフラグメント、（3）プレセニリンタンパク質に対する抗体を生じるための免疫原として使用され得るプレセニリンタンパク質のフラグメント、および（4）競合

10

20

30

40

50

的インヒビターとして、またはプレセニリン模倣物として作用して、プレセニリンの生理学的機能を阻害または模倣し得るプレセニリンのフラグメント、をコードするために有用性を有する。最終的に、このようなサブセットは、プレセニリン遺伝子またはプレセニリンmRNA転写物に対して、これらの配列の転写または翻訳を阻害する生理学的条件下でハイブリダイズし得る相補的配列またはアンチセンス配列をコードまたは示し得る。それゆえ、意図される使用に依存して、本発明は、8～10ヌクレオチド（例えば、PCRプライマーとしての使用のため）から、プレセニリンのゲノムDNAまたはcDNAのほぼ全長のサイズまで変化する長さを有し得るプレセニリン遺伝子の核酸配列を提供する。従って、本発明は、本明細書中で開示されたかさもなければ可能にしたように、プレセニリン遺伝子の少なくとも8～10個、好ましくは15個、そしてより好ましくは少なくとも20個の連続するヌクレオチドまたはその相補物に対応する配列を含む、単離された核酸を提供する。しかし、上記で注意したように、異なる技術ではより短い配列が有用であり得る。
10

別の一連の実施態様において、本発明は、インtronを有するかもしくは有さない、または上記のように組換えにより操作されたプレセニリンのコード配列が、内因性または外因性の5'および/または3'調節領域に作動可能に連結されている核酸を提供する。hPS1遺伝子の内因性調節領域は、本明細書中に詳細に記載および開示される。本明細書の開示および標準的な遺伝的技術（例えば、PCR伸長、標的遺伝子ウォーキング）を使用して、当業者はまた、現在、対応するhPS2の5'および/または3'内因性調節領域をクローニングすることを可能にする。同様に、hPS1およびhPS2の内因性調節領域の対立遺伝子変異体、ならびに他の哺乳動物のホモログ由来の外因性調節領域は、同様に過度の実験を行うことなく可能になる。あるいは、外因性調節領域（すなわち、異なる同種遺伝子または異種特異的調節領域由来の調節領域）は、発現を駆動するためにプレセニリンのコード配列に作動可能に連結され得る。適切な5'調節領域としてはプロモーターエレメントが挙げられ、そしてまたはオペレーター配列またはエンハンサー配列、リボソーム結合配列、RNAキヤップ形成配列などのようなさらなるエレメントも挙げ得る。調節領域は、原核生物細胞または真核生物細胞、それらのウイルス、およびそれらの組合せの遺伝子の発現を制御する配列から選択され得る。このような調節領域として、lac系、trp系、tac系、およびtrc系； ファージの主要なオペレーター領域およびプロモーター領域； fdコートタンパク質の制御領域； SV40の初期または後期プロモーター； ポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルス、バキュロウイルス、およびシミアンウイルス由来のプロモーター； 3-ホスホグリセレートキナーゼプロモーター； 酵母の酸性ホスファターゼプロモーター； 酵母の-交配因子； ニューロンまたは他の細胞型において発現する他の真核生物遺伝子のプロモーターエレメント； およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。特に、これらの核酸で形質転換された細胞内でプレセニリン遺伝子の制御された、および/または操作可能な発現を可能にする誘導可能または抑制可能（例えば、-ガラクトシダーゼプロモーター）である調節エレメントを選択し得る。あるいは、プレセニリンのコード領域を、多細胞生物における組織特異的発現を提供する調節エレメントに作動可能に連結し得る。このような構築物は、適切な組織内でのみプレセニリン遺伝子の発現を生じるトランスジェニック生物の作製に特に有用である。適切な調節領域の選択は、当業者の能力および裁量の範囲内であり、そして多くのこのような調節領域の組換え体の使用は、現在当該分野で確立されている。
20

別の一連の実施態様において、本発明は、融合タンパク質の形態でプレセニリンタンパク質の全部または一部をコードする単離された核酸を提供する。これらの実施態様において、核酸調節領域（内因性または外因性）は、第2のコード領域にインフレームで共有結合的に連結されている第1のコード領域に作動可能に連結される。第2のコード領域は随意に、一つ以上のさらなるコード領域に共有結合的に連結され得、そして、最後のコード領域は、終止コドン、および随意に、適切な3'調節領域（例えば、ポリアデニル化シグナル）に連結される。

融合タンパク質のプレセニリン配列は、第1、第2、または任意のさらなるコード領域を示し得る。プレセニリン配列は、保存的ドメインまたは非保存的ドメインであり得、そし
30

10

20

30

40

50

て融合物の任意のコード領域に配置され得る。融合物の非プレセニリン配列を、実施者の要求および裁量に従って選択し得るが、本発明によっては制限されない。しかし、有用な非プレセニリン配列としては、得られる融合タンパク質の同定または精製を補助するために使用し得る抗原決定基またはポリHisタグのような短い配列の「タグ」が挙げられる。

あるいは、非プレセニリンコード領域は、タンパク質の同定および精製を補助し得るか、または以下に記載のようなアッセイにおいて有用であり得る、酵素または結合タンパク質のような大きなタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードし得る。特に意図されるプレセニリン融合タンパク質としては、プレセニリンの単離および精製に有用であるポリHisおよびGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)の融合物、および以下に記載の、プレセニリンと結合または相互作用する他のタンパク質を同定するためのアッセイにおいて有用である酵母のツーハイブリッド融合物が挙げられる。

別の一連の実施態様において、本発明は、マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子(例えば、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ)が、プレセニリン遺伝子の5'調節領域に作動可能に連結され、その結果、マーカー遺伝子の発現が、プレセニリン調節配列の制御下にある、組換えDNA構築物の形態の単離された核酸を提供する。本明細書中で開示されるかさもなければ可能にされるプレセニリン調節領域(ヒトおよび他の哺乳動物種から得たPS1遺伝子およびPS2遺伝子由来の調節領域を含む)を使用して、当業者は、現在、このような構築物を作成することが可能である。以下でより十分に議論するように、このような単離された核酸は、直接的または間接的に、差別的にプレセニリン発現に影響を与える化合物の同定に有用である、細胞、細胞株、またはトランスジェニック動物の作製に使用され得る。

最終的に、本発明の単離された核酸は、ベクターに含まれる場合、上記の任意の配列を含む。適切なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、エピソームなどを含む全ての型のクローニングベクターおよび発現ベクターならびに組込みベクターが挙げられる。ベクターはまた、それらで首尾よく形質転換された細胞の同定に有用である、種々のマーカー遺伝子(例えば、抗生物質耐性遺伝子または感受性遺伝子)を含み得る。さらに、ベクターは、本発明の核酸が作動可能に連結されている調節配列を含み得、そして/またはベクター中で適切に連結される場合、本発明の核酸が融合タンパク質として発現されるようなコード領域もまた含み得る。このようなベクターはまた、酵母「ツーハイブリッド」、バキュロウイルス、およびファージディスプレー系における使用のためのベクターを含み得る。ベクターは、特定の用途のために必要とされるかまたは所望されるような、原核生物、真核生物、またはウイルスの発現のために有用であるように選択され得る。例えば、SV40プロモーターを有するワクシニアウイルスベクターもしくはシミアンウイルスベクター(例えば、pSV2)、または単純ヘルペスウイルスまたはアデノ関連ウイルスは、培養中またはインビボでのニューロンを含む哺乳動物細胞のトランスフェクションに有用であり得る。そして、バキュロウイルスベクターは、昆虫細胞(例えば、チョウの細胞)のトランスフェクションに使用され得る。非常に多様な異なるベクターは、現在市販されており、そうでなければ当該分野で公知であり、そして適切なベクターの選択は、当業者の能力および裁量の範囲内である。

2. 実質的に純粋なタンパク質

本発明は、プレセニリンタンパク質、プレセニリンタンパク質のフラグメント、およびプレセニリンまたはそのフラグメントを含む融合タンパク質の実質的に純粋な調製物を提供する。タンパク質、フラグメント、および融合物は、本明細書中に記載されるように、正常プレセニリンおよび変異プレセニリンに対する抗体の生成、プレセニリン結合タンパク質の同定、ならびに診断方法および治療方法において有用性を有する。それゆえ、意図される用途に依存して、本発明は、完全なプレセニリンタンパク質のサブ配列であり、そして完全なプレセニリンタンパク質に対して、4~10アミノ酸(例えば、免疫原としての使用のため)または10~100アミノ酸(例えば、結合アッセイにおける使用のため)で変化する長さを有し得るアミノ酸配列を含む、実質的に純粋なタンパク質またはペプチドを提供する。従って、本発明は、本明細書中に記載するかそうでなければ可能とされるように

10

20

30

40

50

、プレセニリンタンパク質の少なくとも4～5、好ましくは6～10、そしてより好ましくは少なくとも50または100の連続するアミノ酸に対応する配列を含む、実質的に純粋なタンパク質またはペプチドを提供する。

本発明のタンパク質またはペプチドは、そのタンパク質配列によって明らかにされる特性に基づいて選択される、任意の種々の方法によって単離および精製され得る。プレセニリンは、細胞膜内タンパク質または膜貫通タンパク質の特性を有するので、プレセニリンが通常高度に発現される細胞（例えば、ニューロン、オリゴ денドログリア、筋肉、臍臓）の膜画分が単離され得、そしてタンパク質が、例えば、界面活性剤可溶化によって抽出され得る。あるいは、プレセニリンタンパク質、融合タンパク質、またはそれらのフラグメントは、以下の発現ベクターを用いて形質転換またはトランスフェクトされた細胞から精製され得る：例えば、pPbacおよびpMbacベクター（Stratagene, La Jolla, CA）のようなバキュロウイルス系；pYESHIS Xpressベクター（Invitrogen, San Diego, CA）のような酵母発現系；一定の構成的発現を有するpcDNA3（Invitrogen, San Diego, CA）または誘導可能であるLacSwitch（Stratagene, La Jolla, CA）のような真核生物発現系；またはpKK233-3（Clontech, Palo Alto, CA）のような原核生物発現ベクター。タンパク質またはフラグメントが、組換え細胞（例えば、不死化ヒト細胞株または他の真核生物細胞）の小胞体または原形質膜内に組み込まれる場合、タンパク質を膜画分から精製し得る。あるいは、タンパク質が組換え細胞（例えば、原核生物細胞）内の封入体において、適切に局在化しないか、または凝集する場合、タンパク質を、溶解細胞全体または可溶化された封入体から精製し得る。

精製を、標準的なタンパク質精製手順を使用して達成し得る。タンパク質精製手順としては、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC、イオン交換HPLC、サイズ排除HPLC）、高性能クロマトフォーカシングクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、免疫沈降、または免疫親和性精製が挙げられるが、これらに限定されない。ゲル電気泳動（例えば、PAGE、SDS-PAGE）を使用して、タンパク質またはペプチドの分子量、電荷特性、および疎水性に基づいてタンパク質またはペプチドをまた単離し得る。

プレセニリンタンパク質またはそのフラグメントはまた、例えば、抗原決定基またはポリHisタグ（例えば、QIAexpressベクター、QIAGEN Corp., Chatsworth, CA）、またはより大きなタンパク質（例えば、pGEX-27ベクター（Amrad, USA）を使用するGST）またはGreen Lanternベクター（GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD）を使用する緑色蛍光タンパク質）の別のペプチドに融合した所望のプレセニリン配列を含む融合タンパク質を作製することによって、好都合に精製され得る。融合タンパク質は、原核生物細胞または真核生物細胞から発現および回収され得、そして融合ベクター配列に基づく任意の標準的な方法によって精製され得る。例えば、融合タンパク質を、融合物の非プレセニリン部分に対する抗体を用いて免疫親和性または免疫沈降によって、またはポリHisタグの場合は、ニッケルカラムに対する親和性結合によって精製し得る。次いで、所望のプレセニリンタンパク質またはフラグメントを、融合タンパク質の酵素的切断によって融合タンパク質からさらに精製し得る。タンパク質の精製のためのこのような融合構築物の調製方法および使用方法は当該分野で周知であり、そしていくつかのキットが、現在、この目的のために市販されている。本発明の開示に照らせば、現在では、プレセニリンにこのような融合構築物を使用することが可能である。

3. プレセニリンに対する抗体

本発明はまた、プレセニリンタンパク質またはそのフラグメントに選択的に結合する抗体および抗体の作製方法を提供する。特に重要なことは、プレセニリンの機能的ドメインおよびADに関連する多型領域を同定することによって、本発明は、プレセニリンタンパク質の正常形態および変異（すなわち、病原性）形態に選択的に結合し、それゆえこれらを同定および/または識別する抗体およびそのような抗体の作製方法を提供する。本発明の抗体は、とりわけ、プレセニリンの免疫親和性精製、プレセニリンを発現する細胞または組織を同定するためのウェスタンプロッティング、およびこのタンパク質の細胞以下の位置

10

20

30

40

50

(subceller location) を確証するための免疫化学的技術または免疫蛍光技術のための研究室用試薬としての有用性を有する。さらに、下記のように、本発明の抗体は、ADに関連するプレセニリン対立遺伝子の保有者を同定するための診断手段として、またはインビボでプレセニリンタンパク質の病原性形態に選択的に結合して、これを阻害するための治療手段として使用され得る。

本発明の抗体は、本発明のプレセニリンタンパク質の全体を使用して、またはこのタンパク質の特徴であり、そしてこのタンパク質と他の宿主タンパク質とを実質的に区別する任意のプレセニリンエピトープを使用して作製され得る。このようなエピトープは、例えば、プレセニリン配列由来の 4 ~ 10 アミノ酸残基の配列と、関連する宿主由来のタンパク質配列のコンピューターデータベースとを比較することによって同定され得る。好ましくは、エピトープは、N 末端もしくは C 末端、またはこのタンパク質の膜貫通ドメインを連結するするループドメインから選択される。特に、多型 N 末端領域、TM1 ~ 2 ループ、または TM6 ~ 7 ループに対する抗体は、診断的および治療的の両方に最大の有用性を有すると期待される。一方で、高度に保存されたドメインに対する抗体は、プレセニリンの精製または同定に最大の有用性を有すると期待される。

IBI Pustell プログラムを使用して、アミノ酸残基の位置を、hPS1タンパク質における潜在的な抗原性部位として同定した。そして、これは、本発明の抗体の生成において有用であり得る。配列番号 2 における位置と対応するこれらの位置を表 6 に列記する。

抗原決定基を選択する他の方法はもちろん、当該分野で公知であり、そして使用される。さらに、これらのエピトープのいくつかを含む、より大きなフラグメント（例えば、8 ~ 20 残基、または好ましくは 9 ~ 15 残基）もまた使用し得る。例えば、109-112 エピトープを含むフラグメントは、残基 107-114、または 105-116 を含み得る。例えば機能的ドメイン全体または多数の機能的ドメイン（例えば、TM1、TM1 ~ 2、および TM2 または TM6、TM6 ~ 7、ならびに TM7）を含むさらに大きなフラグメントでさえまた好ましいかもしれない。他のプレセニリンタンパク質（例えば、mPS1 もしくは他の非ヒトホモログ、または PS2）については、相同部位が選択され得る。

同じ IBI Pustell プログラムを使用して、アミノ酸残基の位置を、hPS2タンパク質における潜在的な抗原性部位として同定した。そしてこれは、本発明の抗体の生成において有用であり得る。配列番号 19 における位置に対応するこれらの位置を表 7 に列記する。

PS1についてのように、抗原決定基を選択する方法はもちろん、当該分野で公知であり、そして使用される。さらに、これらのエピトープのいくつかを含む、より大きなフラグメント（例えば、8 ~ 20 残基、または好ましくは 9 ~ 15 残基）もまた使用され得る。例えば、310-314 エピトープを含むフラグメントは、残基 308-316 または 307-317 を含み得る。例えば機能的ドメイン全体または多数の機能的ドメイン（例えば、TM1、TM1 ~ 2、および TM2 または TM6、TM6 ~ 7、ならびに TM7）を含むさらに大きなフラグメントでさえまた好ましいかもしれない。他のプレセニリンタンパク質（例えば、mPS2 もしくは他の非ヒトホモログ、または PS1）については、相同部位が選択され得る。

プレセニリン免疫原調製物を、粗製抽出物（例えば、このタンパク質を高発現する細胞の膜画分）から、天然もしくは組換的にそれらを発現する細胞から実質的に精製されたタンパク質もしくはペプチドから、または短い免疫原については、化学的ペプチド合成によって生成し得る。プレセニリン免疫原はまた、非プレセニリン領域がそのアジュバント特性について選択される、融合タンパク質の形態であり得る。本明細書で使用される、プレセニリン免疫原は、本明細書中で開示されるかさもなければ可能にされるように、プレセニリンタンパク質の少なくとも 4 ~ 8 個、そして好ましくは少なくとも 9 ~ 15 個の連続するアミノ酸残基を含むペプチドを含有する調製物として定義されるべきである。もちろん、より少ない残基の配列もまた、意図される用途および将来の技術的発展に依存する有用性を有する。それゆえ、プレセニリンに対する抗体を生成するために使用されるプレセニリン由来の任意の配列は、プレセニリン免疫原と見なされるべきである。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体であり得、または Fab フラグメント、F(ab')₂、および单鎖抗体フラグメントを含む、抗体のフラグメントで

10

20

30

40

50

あり得る。さらに、本発明の方法によって有用な抗体を同定した後、上記で列記した任意の抗体フラグメント、ならびにプレセニリンタンパク質に対する非ヒト抗体に基づくヒト化抗体を含む、組換え抗体を生成し得る。プレセニリンタンパク質および本明細書中で可能になった他のプレセニリンの特徴付けの本開示に照らして、当業者は、当該分野で周知の任意の種々の標準的な手段によって上記の抗体を生成し得る。抗体技術の概観については、Antibody Engineering: A Practical Guide, Borrebaek編、W.H.Freeman & Company, NY (1992), またはAntibody Engineering, 第2版、Borrebaek編、Oxford University Press, Oxford (1995) を参照のこと。

一般的な事として、適切なキャリア中のプレセニリン免疫原で、マウス、ウサギ、ヤギ、または他の適切な動物を最初に免疫することによって、ポリクローナル抗体を生成し得る。調製物の免疫原性を増加させるために、免疫原をキャリアタンパク質にカップリングさせ得るか、またはアジュバント（例えば、Freundアジュバント）と混合し得る。必要ではないが、ブースター注射が、推奨される。体液性応答を発達させるに適切な期間の後（好ましくは数週間後）、動物から採血し、そして血清を精製してイムノグロブリン成分を単離し得る。

同様に、一般的な事として、適切なキャリア中のプレセニリン免疫原で、マウス、ウサギ、ヤギ、または他の適切な動物を最初に注射することによってモノクローナル抗プレセニリン抗体を生成し得る。上記のように、キャリアタンパク質またはアジュバントを利用し得、そしてブースター注射（例えば、8～10週間にわたって2または3週間おきに）が推奨される。体液性応答を発達させた後、動物を屠殺し、そして脾臓を取り出し、そして例えば、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中に再懸濁する。脾細胞を、リンパ球の供給源として供する。このリンパ球のいくつかは適切な特異性の抗体を産生する。次いでこれらの細胞を、不死化細胞株（例えば、ミエローマ）と融合し、そして融合産物を、HATのような選択的薬剤の存在下で多数の組織培養ウェルに播種する。ウェルを連続的にスクリーニングし、そして有用な抗体を産生する細胞を選抜したそれぞの時点で再播種する。代表的には、いくつかのスクリーニング手順および再播種手順を、90%を越えるウェルが、抗体産生について陽性である単一のクローナル抗体を含むまで実施する。このようなクローナルによって産生されるモノクローナル抗体を、プロテインAセファロースを使用するアフィニティークロマトグラフィーのような標準的な方法、イオン交換クロマトグラフィー、またはこれらの技術の改変または組合せによって精製し得る。

本発明の抗体を、診断的使用および/または治療的使用のために、他の化合物または材料で標識またはコンジュゲート化し得る。例えば、本発明の抗体を、画像化もしくは治療のために放射性核種、蛍光化合物、もしくは酵素と、または特定の組織位置にリポソーム中に含まれる化合物を標的化するためのリポソームと、カップリングし得る。

4. 形質転換細胞株

本発明はまた、原核生物および真核生物の両方の細胞または細胞株を提供する。これらの細胞は、本発明の核酸で形質転換またはトランスフェクトされており、その結果、これらの核酸のクローナル増殖および/またはそれらにコードされるタンパク質またはペプチドの発現を引き起こす。このような細胞または細胞株は、本発明の核酸およびタンパク質の増殖および生成の両方において有用性を有するだけでなく、本明細書中でさらに記載されるように、診断アッセイおよび治療アッセイのためのモデル系としても有用性を有する。本明細書で使用される用語「形質転換細胞」は、形質転換、トランスフェクション、感染、または他の手段のいずれかによって、本発明の任意の核酸が導入された、任意の細胞または任意の細胞の子孫を含むこと意図する。適切なベクターを作製する方法、それらのベクターで細胞を形質転換する方法、および形質転換体を同定する方法は、当該分野で周知であり、そして本明細書で簡潔にのみ概説される（例えば、Sambrookら、(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照のこと）。

本発明の形質転換細胞の作製に有用な原核生物細胞としては、Escherichia（例えば、E.coli）、Pseudomonas（例えば、P.aeruginosa）、およびBacillus（例えば、B.subtilis）

10

20

30

40

50

、B.stearothermophilus) の細菌属の一員、ならびに当該分野で周知であり、そしてしばしば使用されている他の多くのものが挙げられる。原核生物細胞は、本発明のタンパク質またはペプチド (例えは、正常プレセニリンまたは変異プレセニリン、プレセニリンのフラグメント、プレセニリンの融合タンパク質) の大量生産に特に有用である。細菌細胞 (例えは、E.coli) を、例えは、T7 RNAポリメラーゼ/プロモーター系、バクテリオファージ調節配列、またはM13ファージmGPI-2を有するプラスミドを含む、種々の発現ベクター系と共に使用し得る。細菌宿主はまた、例えは、lacZ、trpE、マルトース結合タンパク質、ポリHisタグ、またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質を生じる融合タンパク質ベクターで形質転換され得る。これらの全て、および多くの他の原核生物発現系は、当該分野で周知であり、そして、広範に市販されている (例えは、GST融合物については、pGEX-27 (Amrad,USA)) 。

本発明の形質転換細胞の作製に有用な真核生物の細胞および細胞株としては、哺乳動物の細胞および細胞株 (例えは、PC12、COS、CHO、線維芽細胞、ミエローマ、神経芽細胞腫、ハイブリドーマ、ヒト胚腎293、卵母細胞、胚幹細胞) 、昆虫細胞株 (例えは、pPbacまたはpMbac (Strategene, La Jolla, CA) のようなバキュロウイルスベクターを使用する) 、酵母 (例えは、pYESHIS (Invitrogen, CA) のような酵母発現ベクターを使用する) 、および真菌が挙げられる。真核生物細胞は、プレセニリンタンパク質またはその機能的ドメインが機能を果たすこと、および / または正常タンパク質または変異タンパク質のいずれかに関連する細胞内相互作用を受けることが必要である実施態様に特に有用である。従って、例えは、形質転換真核生物細胞は、プレセニリンの機能または相互作用のモデルとしての使用のために好ましく、そして候補の治療剤のスクリーニングのためのアッセイは、好ましくは、形質転換真核生物細胞を使用する。

真核生物細胞内での発現を達成するために、人工的なプロモーター要素の調節下で、プレセニリンヌクレオチド配列の誘導可能な (例えは、LacSwitch発現ベクター、Stratagene, La Jolla, CA) 、または同じ性質の (例えは、pcDNA3ベクター、Invitrogen, Chatsworth, CA) 発現を可能にする、広範な種類のベクターが開発されており、そして市販されている。このようなプロモーター要素は、しばしばCMVまたはSV40ウイルス遺伝子由来であるが、真核生物細胞内で活性な他の強いプロモーター要素もまた、プレセニリンヌクレオチド配列の転写を誘導するために使用し得る。代表的には、これらのベクターはまた、また外因性ウイルス遺伝子配列由来であり得るかまたは他の真核生物遺伝子由来であり得る、人工的なポリアデニル化配列および3' UTRを含む。さらに、いくつかの構築物において、人工的で、非コードの、スプライス可能なイントロンおよびエキソンがベクター中に含まれて、目的のヌクレオチド配列 (この場合プレセニリン配列) の発現を増強する。これらの発現系は、通常、市販であり、そしてpcDNA3およびpZeoSV (Invitrogen, San Diego, CA) のようなベクターによって代表される。後者のベクターの両方を首尾よく使用して、トランスフェクトされたCOS、CHO、およびPC12細胞 (Levesqueら、1996) 内でプレセニリンタンパク質の発現を生じる。無数の市販の発現ベクターおよび注文設計された発現ベクターは、市販であり、構成的にまたは特定の外因性刺激 (例えは、テトラサイクリンの使用中止またはIPTGへの曝露) への曝露後のいずれかで、多かれ少なかれ任意の所望の細胞型における任意の所望のプレセニリン転写物の発現を可能にする。

ベクターを、以下の当該分野で周知の種々の方法によって、レシピエントまたは「宿主」細胞に導入し得るが、これらに限定されない：リン酸カルシウムトランスフェクション、リン酸ストロンチウムトランスフェクション、DEAEデキストラントトランスフェクション、エレクトロポレーション、リポフェクション (例えは、Dosperリポソームトランスフェクション試薬、Boehringer Mannheim, Germany) 、マイクロインジェクション、マイクロビーズでの弾道挿入 (ballistic insertion) 、プロトプラスト融合、またはウイルスベクターまたはファージベクターについては、組換えウイルスもしくはファージでの感染による。

5. トランスジェニック動物モデル

本発明はまた、アルツハイマー病の研究のため、候補の薬学的化合物のスクリーニングの

10

20

30

40

50

ため、変異型もしくは野生型のプレセニリン配列が発現されるか、またはプレセニリン遺伝子が不活性化されている（例えば、「ノックアウト」消失）、外植した哺乳動物CNS細胞培養物（例えば、ニューロン、グリア、器官型、または混合した細胞の培養物）の作製のため、および潜在的な治療的介入の評価のための、トランスジェニック非ヒト動物モデルの作製を提供する。本発明により前に、アルツハイマー病についての部分的な動物モデルが、血小板由来増殖因子 レセプタープロモーターエレメントの調節下で、ミニ遺伝子としてヒトアミロイド前駆体タンパク質遺伝子の変異型を挿入し、そして過剰発現させることによって存在した（Gamesら、1995）。この変異体（APP₇₁₇Val 11e）は、高いコピー数でこのトランスジーンを有するトランスジェニック動物の脳において、シナプス病理学およびアミロイド ペプチドの沈着の出現を引き起こす。トランスジェニック動物の脳におけるこれらの変化は、ヒトADに見られる変化と非常に類似している（Gamesら、1995）。しかし、このような動物が痴呆になるかどうかはまだ明らかでないが、現在はマウスにおいてADの少なくともいくつかの局面を再現することは可能であるという一般的な総意が存在する。

本発明の動物モデルにおける使用に適切な動物種として、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、および非ヒト靈長類（例えばアカゲザル、チンパンジー）が挙げられるが、これらに限定されない。最初の研究のためには、トランスジェニック齧歯類（例えばマウス）が、維持が比較的容易であるため、および短い寿命のために好ましい。実際、上記で留意したように、トランスジェニック酵母または無脊椎動物（例えば線虫、昆虫）は、これらがさらにより迅速かつ安価なスクリーニングを可能するために、いくつかの研究のために好ましいかもしれない。しかし、トランスジェニック非ヒト靈長類は、それらのヒトに対するより顕著な類似性のため、およびそれらの高い認知能力のために、さらに長期間の研究に好ましいかもしれない。

本明細書中に開示されるかさもなければ可能とされる核酸を使用すれば、現在、アルツハイマー病のためのトランスジェニック動物モデルの作製のためのいくつかの利用可能なアプローチが存在する。従って、可能になった動物モデルとしては、以下が挙げられる。（1）外因性もしくは内因性のプロモーターエレメントのいずれかの調節下でのさらなる遺伝子として、およびミニ遺伝子もしくは大きなゲノムフラグメントのいずれかとして、正常なヒトプレセニリン遺伝子が動物のゲノム中に組換えにより導入されている動物；相同組換えもしくは遺伝子標的化によって、正常ヒトプレセニリン遺伝子が動物の相同的なプレセニリン遺伝子の1コピーもしくは両方のコピーと組換えにより置換されている動物；および／または動物の相同的なプレセニリン遺伝子の1コピーもしくは両方のコピーが、相同組換えもしくは遺伝子標的化による、ヒトホモログをコードする配列の部分的置換によって、組換えにより「ヒト化」されている動物。これらの動物は、トランスジェニック手順の効果、およびヒトプレセニリン遺伝子またはヒト化プレセニリン遺伝子の導入または置換の結果を評価するために有用である。（2）外因性もしくは内因性プロモーターエレメントのいずれかの調節下でのさらなる遺伝子として、およびミニ遺伝子もしくは大きなゲノムフラグメントのいずれかとして、変異（すなわち病原性）ヒトプレセニリン遺伝子が動物のゲノム中に組換えにより導入されている動物；変異ヒトプレセニリン遺伝子が、相同組換えもしくは遺伝子標的化によって動物の相同的なプレセニリン遺伝子の1コピーもしくは両方のコピーと組換えにより置換されている動物；および／または動物の相同的なプレセニリン遺伝子の1コピーまたは両方のコピーが、相同組換えもしくは遺伝子標的化による変異ヒトホモログをコードする配列の部分的な置換によって、組換えにより「ヒト化」されている動物。これらの動物は、生化学的、生理学的、および／または挙動的レベルのいずれかで、アルツハイマー病またはプレセニリン遺伝子の変異に関連する他の疾患の病原である、1つ以上の対立遺伝子を有するいくつかまたは全てのヒトの特徴を示すモデルとして有用である。（3）外因性または内因性のプロモーターエレメントのいずれかの調節下でのさらなる遺伝子として、およびミニ遺伝子または大きなゲノムフラグメントのいずれかとして、その動物のプレセニリン遺伝子の1つの変異バージョン（例えば、ヒトプレセニリンの病原性変異の1つに対応するもしくは類似する特異的変異を有する）が、

10

20

30

40

50

動物のゲノム中に組換えにより導入されている動物；および／もしくは相同組換えもしくは遺伝子標的化によって、その動物のプレセニリン遺伝子の1つの変異バージョン（例えば、ヒトプレセニリンの病原性変異の1つに対応するかもしくは類似する特異的変異を有する）が、動物の相同なプレセニリン遺伝子の1コピーもしくは両方のコピーと、組換えにより置換されている動物。これらの動物はまた、生化学的、生理学的、および／または拳動的レベルのいずれかで、アルツハイマー病の病原である1つ以上の対立遺伝子を有するいくつかまたは全てのヒトの特徴を示すモデルとして有用である。（4）この動物のプレセニリン遺伝子の1コピーもしくは両方のコピーが、相同組換えもしくは遺伝子標的化によって部分的または完全に欠失しているか、または外因性配列の（例えば、停止コドン、*lox p*部位）相同組換えもしくは遺伝子標的化による挿入または置換によって不活化されている、「ノックアウト」動物。このような動物は、プレセニリン遺伝子発現の損失が有し得る影響を研究するため、機能の損失が変異型の連続的な発現に好ましいかどうかを評価するため、およびADまたは他の疾患の処置として、変異プレセニリンを置換する（例えば、PS1をPS2で置換する）ため、またはADを引き起こす他の遺伝子（例えば、APPまたはApoE）の影響に介入するため他の遺伝子が補充され得るかどうかを試験するためのモデルとして有用である。例えば、正常プレセニリン遺伝子は、実際にADとして発現されるために変異APP遺伝子の作用に必要であり得、それゆえ、トランスジェニックプレセニリン動物モデルは、このような複遺伝子性相互作用の解明に有用であり得る。

動物モデル（例えば、トランスジェニックマウス）を作製するために、正常プレセニリン遺伝子もしくは変異プレセニリン遺伝子（例えば、正常または変異のhPS1、mPS1、hPS2、mPS2など）、またはプレセニリンの少なくとも1つの機能的ドメインをコードする正常バージョンまたは変異バージョン組換え核酸（例えば、ヒト変異配列に対応するヌクレオチド配列が置換されているmPS1配列を含む組換え構築物）を、卵母細胞マイクロインジェクションの標準的な技術、または胚幹細胞へのトランスフェクションもしくはマイクロインジェクションを使用して、生殖系列または幹細胞に挿入し得る。これらまたは同様の手順によって作製された動物を、トランスジェニックという。同様に、内因性プレセニリン遺伝子を不活化または置換することが所望される場合、胚幹細胞を使用する相同組換えが用いられ得る。これらまたは同様の手順によって作製された動物を、「ノックアウト」（不活化）または「ノックイン」（置換）モデルという。

卵母細胞注入のために、本発明の組換えDNA構築物の1つ以上のコピーを、受精直後の卵母細胞の前核に挿入し得る。次いで、この卵母細胞を、偽妊娠した養母に再移植する。この生産動物を、挿入された組換えトランスジーン配列の存在について、DNA（例えば、子孫マウスの尾静脈由来）分析を使用して成分をスクリーニングする。トランスジーンは、YAC、BAC、PAC、もしくは他の染色体DNAフラグメントとして注入された完全なゲノム配列、天然プロモーターまたは異種プロモーターのいずれかを有するcDNA、または全コード領域および最適な発現に必要であることが見出されている他のエレメントを含むミニ遺伝子のいずれかであり得る。

初期胚のレトロウイルス感染もまた、本発明の組換えDNA構築物を挿入するために行われ得る。この方法において、トランスジーン（例えば、正常または変異のhPS1またはPS2配列）を、キメラ（そのいくつかは、生殖系列への伝達を導く）を作製するために発達の初期段階の間に、直接、胚（例えば、マウスまたは非ヒト靈長類の胚）を感染させるために使用されるレトロウイルスベクター中に挿入する。

幹細胞を使用する相同組換えは、希少な相同組換え事象を同定するための遺伝子移入細胞のスクリーニングを可能にする。一旦同定されると、胚盤胞の注入によってキメラを作製するためにこれらを使用し得、そして得られる動物の割合は、組換え系列からの生殖系列伝達を示す。この方法論は、プレセニリン遺伝子の不活化が所望される場合に特に有用である。例えば、マウスにおけるmPS1遺伝子の不活化は、選択的マーカーに隣接するmPS1エキソン由来の配列を含むDNAフラグメントを設計することによって達成され得る。相同組換えは、エキソンの中央のマーカー配列の挿入を導き、mPS1遺伝子の不活化および／または内部配列の欠失を引き起こす。次いで、個々のクローニングDNA分析を使用して、相同組

10

20

30

40

50

換え事象を認識し得る。

トランスジェニックマウスの作製技術、および相同組換えまたは遺伝子標的化の技術は、現在、広範に受け入れられそして実施される。例えば、マウス胚の操作の実験マニュアルは、入手可能であり、トランスジェニックマウスの作製のための標準的な実験技術 (Hogalら、1986) に詳細に記載されている。トランスジーンを作製するために、目的の標的配列（例えば、変異型または野生型のプレセニリン配列）を、代表的には、プレセニリン配列からのRNAの発現を調節するいくつかのプロモーターエレメントの下流に位置するクローン化部位に連結する。プレセニリン配列の下流には、代表的には人工的なポリアデニル化配列が存在する。遺伝性のヒト神経変性性疾患の局面を模倣する動物を首尾よく作製するためには、使用されてきたトランスジェニックモデルにおいて、最もうまくいったプロモーターエレメントは、血小板由来増殖因子 遺伝子サブユニットプロモーターおよびハムスタークリオタンパク質遺伝子プロモーターであるが、中枢神経系細胞における発現を導く他のプロモーターエレメントもまた有用である。トランスジーンを作製するための別のアプローチは、プレセニントランスジーンの発現を駆動するための内因性のプレセニリンプロモーターおよび調節配列の使用である。最終的に、プレセニリン遺伝子全体およびその適切な調節配列を含むYACのような大きなゲノムDNAフラグメントを使用して、トランスジーンを作製することが可能である。このような構築物は、トランスジェニックマウスにおけるヒトAPP発現を駆動するために首尾よく使用されてきた (Lambら、1993)。

動物モデルをまた、内因性プレセニリン配列を変化させるために、内因性プレセニリン遺伝子を相同組換えによって標的化することにより作製し得る。これらの標的化事象は、内因性配列を除去（ノックアウト）する効果、または内因性配列を変化させて、ヒトの疾患に関連するアミノ酸の変化または他の異常配列（例えば、元の動物の配列よりもヒトの配列に似ている配列）を生じるという効果を有し得る（ノックイン動物モデル）。多数のベクターが、これを達成するために利用可能であり、そして標的化されるべきマウスおよび他の動物のゲノムについてのゲノムDNAの適切な供給源は、GenomeSystems Inc. (St. Louis, Missouri, USA) のような会社から市販されている。これらの標的化ベクター構築物の代表的な特徴は、2 ~ 4 kbのゲノムDNAが、選択マーカー（例えば、「ネオマイシンカセット」と呼ばれるネオマイシン耐性遺伝子自身のプロモーターエレメント下の細菌性ネオマイシン耐性遺伝子）の5'側に連結されていることである。次いで、目的の遺伝子由来の第2のDNAフラグメントを、ネオマイシンカセットの下流だが第2の選択マーカー（例えば、チミジンキナーゼ）の上流に連結する。ベクターに含まれる配列のいずれか1つによる内因性配列の相同置換によって、変異配列が標的化される動物の生殖系列に導入され得るように、このDNAフラグメントを選択する。あるいは、ネオマイシンカセットを取り囲むベクターの右のアームと左のアームの間に通常存在する配列の欠失を引き起こすために、配列を選択し得る。前者はノックインとして知られ、後者はノックアウトとして知られる。さらに、特に、神経変性性疾患に関連する遺伝子を含む遺伝子の標的化されたノックアウトのために、無数のモデル系が作製された（例えば、Zhengら、1995によるマウスAPP遺伝子の標的化された欠失；Buelerら、1996による成人発症性ヒトCNS変性に関連するマウスクリオタンパク質遺伝子の標的化された欠失）。

最終的に、トランスジェニック動物（変異または不活性化したプレセニリン遺伝子を有する動物を含む）の等価物を、接合子の化学的変異誘発またはX線変異誘発とその後の受精を使用して作製し得る。本明細書中に開示されるかまたは可能とされる単離された核酸を使用して、当業者は、得られた子孫を、例えば、変異体を検出するための直接的配列決定RFLP、PCR、もしくはハイブリダイゼーション分析、または量により1つの対立遺伝子の欠失を実証するためのサザンプロットティングによって、より迅速にスクリーニングし得る。

6. プレセニリン発現に影響を与える薬物についてのアッセイ

別の一連の実施態様において、本発明は、プレセニリン遺伝子およびタンパク質（例えば、PS1またはPS2）の発現を誘導または阻害し得る低分子または他の化合物を同定するためのアッセイを提供する。このアッセイを、非形質転換細胞、不死化細胞株、もしくは組換え細胞株を使用してインビトロで実施し得るか、または本明細書中で可能になったトラン

10

20

30

40

50

スジェニック動物モデルを使用してインピボで実施し得る。

特に、このアッセイは、mRNA発現の増大または減少に基づく、PS1、PS2、もしくは他のプレセニリン関連遺伝子またはタンパク質の発現の増大または減少（例えば、本明細書中で開示されるかまたは可能になった核酸プローブを使用して）、PS1、PS2、もしくは他のプレセニリン関連タンパク質産物のレベルの増大もしくは減少（例えば、本明細書中で開示されるかまたは可能になった抗プレセニリン抗体を使用して）、または組換え構築物においてプレセニリンの5'調節領域に作動可能に連結されたマーカー遺伝子（例えば、-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼ）の発現レベルの増大もしくは減少の存在を検出し得る。

従って、例えば、特定のプレセニリンを発現することが知られる細胞を培養し得、そして1つ以上の試験化合物の培養培地に添加し得る。化合物がプレセニリン発現を誘導または阻害するに十分な時間（例えば、0～72時間）を経た後、発現レベルにおける確立されたベースラインからのいかなる変化も、上記および当該分野で周知の任意の技術を使用して検出し得る。特に好ましい実施態様において、細胞は、ヒト神経芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、またはハイブリドーマ細胞株のような不死化細胞株由来である。本明細書中で開示されそして可能になった核酸プローブおよび/または抗体を使用して、プレセニリンの発現における変化の検出、従って、プレセニリン発現のインデューサーまたはリプレッサーとしての化合物の同定は、日常的な実験しか必要としない。

特に好ましい実施態様において、-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼのようなレポーター遺伝子がプレセニリン遺伝子の5'調節領域に作動可能に連結される、組換えアッセイを使用する。好ましいベクターとしては、Green Lantern 1ベクター (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD)、およびGreat EScA Pe pSEAPベクター (Clontech, Palo Alto) が挙げられる。本明細書中で開示されるhPS1調節領域または他のプレセニリン調節領域は、これらの遺伝子のコード領域についての本明細書の開示に照らして、当業者によって容易に単離およびクローニングされ得る。レポーター遺伝子および調節領域は、レポーター遺伝子の転写および翻訳が、プレセニリン調節エレメントの制御下で進行し得るようにインフレームで（または3つの可能なリーディングフレームの各々において）連結される。次いで、組換え構築物を任意の適切な細胞型（哺乳動物細胞が好ましく、そしてヒト細胞が最も好ましいが）中に導入し得る。形質転換細胞を培養して増殖し得、そしてレポーター遺伝子の発現レベルのベースラインを確立した後に、試験化合物を培地に添加し得る。レポーター遺伝子の発現の検出が容易であるため、プレセニリン遺伝子のインデューサーおよびリプレッサーの同定のための迅速で高処理量のアッセイが提供される。

この方法により同定された化合物は、PS1、PS2、または他のプレセニリン関連遺伝子の発現をインピボで改変するのに潜在的な有用性を有する。これらの化合物を、本明細書中で開示されそして可能になった動物モデルにおいてさらに試験し、最も強力なインピボでの効果を有する化合物を同定し得る。さらに、プレセニリン結合活性を有する低分子に関して本明細書中で記載したように、これらの分子は、例えば、連続的改変、分子のモデル化、および合理的なドラッグデザインにおいて使用される他の日常的な手順にこの化合物を供することによって、医薬品のさらなる開発のための「リード化合物」として役立ち得る。

7. プレセニリン結合性能力を有する化合物の同定

本開示に照らして、当業者は、プレセニリンに結合する、そうでなければ直接的に相互反応するタンパク質または他の化合物の同定に有用である新たなスクリーニング方法を実施し得る。タンパク質および化合物は、インピボでプレセニリンと相互作用し、従って、薬学的および治療的介入、ならびにプレセニリン結合能力を有し得、従って、薬学的薬剤についての候補であり得る、組換え、合成、およびそうでなければ内因性の化合物についての新たな標的を提供する内因性細胞成分を含む。従って、一連の実施態様において、細胞溶解物または組織ホモジネート（例えば、ヒト脳ホモジネート、リンパ球溶解物）を、正常または変異プレセニリンの1つに結合するタンパク質または他の化合物についてスクリ

10

20

30

40

50

ーニングし得る。あるいは、任意の種々の内因性化合物（天然に生じるおよび／または合成の両方（例えば、低分子またはペプチドのライブラリー））は、プレセニリン結合能力についてスクリーニングされ得る。低分子はこの意味で特に好ましい。なぜなら、それらは経口投与後により容易に吸収され、より少ない潜在的抗原決定基を有し、そして／あるいは核酸またはタンパク質のようなより大きい分子よりも、血液脳関門をより横断しそうであるからである。本発明の方法は、それらを用いて、（正常形態よりはむしろ）プレセニリンタンパク質の変異形態に選択的または優先的に結合する、従って、この優性常染色体疾患のヘテロ接合性の犠牲者の処置において特定の有用性を有し得る分子を同定し得る点で特に有用である。

PS1およびPS2の正常な生理学的役割はなお未知であるので、これらのプレセニリンの正常、変異または両方の形態に結合する化合物は、処置および診断に対して有用性を有し得る。正常プレセニリンにのみ結合する化合物は、例えば、その正常活性のエンハンサーとして作用し得、それにより、アルツハイマー病の犠牲者におけるプレセニリンの変異形態の失われたまたは異常な活性を少なくとも部分的に補い得る。プレセニリンの正常および変異の両方の形態に結合する化合物は、正常機能からの全体の逸脱を軽減するように、それらが2つの形態の活性にディファレンシャルに影響する場合、有用性を有し得る。あるいは、PS1またはPS2いずれかの正常および変異形態の両方の活性のブロックは、疾患の通常の進行よりも重篤でない生理学的および臨床的結果を有し得、従って、プレセニリンの正常および変異の両方の形態に結合し、そしてその活性を阻害する化合物は、治療的に有用であり得る。しかし、好ましくは、正常プレセニリンよりも変異プレセニリンに対して高い結合親和性を有し（例えば、少なくとも2～10倍は高い K_a ）、そして変異形態の活性を選択的または優先的に阻害する化合物が同定される。このような化合物は、本明細書中に記載の任意の技術を用い、次いで、PS1またはPS2の正常および変異形態に対して候補化合物（単数または複数）の結合親和性を比較することによって、同定され得る。

プレセニリン（正常または変異形態）に結合する薬剤の効果は、装置（例えば、BIAcore, LKB Pharmacia, Sweden）を用いてこの結合を直接モニターして、この結合を、例えば、可溶性相または基質-結合相のいずれかにおいて、結合薬剤またはプレセニリン成分のいずれかの蛍光、分子量、または濃度の変化によって検出することによって、モニターされ得る。

一旦上記の方法によって同定されると、次いで、候補化合物は薬学的投与または試験のために十分な量で（例えば、 μ gまたはmgまたはより大きい量）で生産され得、そして薬学的に受容可能なキャリア（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, A. 編, Mack Pub., 1990を参照のこと）中に処方され得る。次いで、これらの候補化合物は、本発明の形質転換細胞、本発明のトランスジェニック動物モデル、動物モデルまたはヒト患者由来の細胞株、またはアルツハイマー患者に投与され得る。本明細書中に記載されそして実施可能にされた動物モデルは、それらの治療効力について正常または変異プレセニリンに結合する候補化合物をさらに試験するのに特に有用である。

さらに、一旦上記の方法によって同定されると、候補化合物は、新たな医薬の設計および開発において「リード化合物」としても作用し得る。例えば、当該分野で周知であるように、低分子の連続的な修飾（例えば、ペプチドについてのアミノ酸残基置換；ペプチドまたは非ペプチド化合物についての官能基置換）は、新たな医薬の開発のための、医薬産業における標準的なアプローチである。一般に、このような開発は、所望の医薬の活性（例えば、PS1結合またはブロック活性）のうちの少なくともいくつかを有することが示されている「リード化合物」から進行する。特に、目的の少なくともいくつかの活性（例えば、プレセニリン活性の調節）を有する1以上の化合物が同定されると、分子の構造的比較は、保存されているはずであるリード化合物の部分、および新たな候補化合物の設計において変化され得る部分を示唆することによって、当業者に大いに情報を与え得る。従って、本発明は、順次に修飾され得、アルツハイマー病の処置における使用のための新たな候補化合物を生成するリード化合物を同定する手段も提供する。次いで、これらの新たな化合物は、プレセニリン-結合またはブロックについて（例えば、上記の結合アッセイにお

10

20

20

30

40

50

いて)、および治療効力について(例えば、本明細書に記載の動物モデルにおいて)の両方で試験され得る。この手順は、所望の治療活性および/または効力を有する化合物が同定されるまで、反復され得る。

本発明の一連の各々の実施態様において、アッセイを行って、「プレセニリン成分」とい 10 くつかの他の部位との間の結合を検出する。特に有用なのは、連続的なアッセイであり、ここで、化合物は、結合アッセイにおいて変異および正常プレセニリン成分を用いて、プレセニリンの機能的ドメインの正常形態のみまたは変異形態のみに結合する能力について試験される。このような化合物は、以下により詳細に記載するように、最大の治療的有用性を有すると予測される。これらのアッセイにおける「プレセニリン成分」は、プレセニリンタンパク質の完全に正常な形態または変異形態(例えば、hPS1またはhPS2変異体)であり得るが、そうである必要はない。むしろ、上記のように、プレセニリンの特定の機能的ドメインは、別々の分子としてまたは融合タンパク質の一部としてのいずれかで用いられ得る。例えば、これらの機能的ドメインと相互作用するタンパク質または化合物を単離するために、融合構築物および/またはこれらの領域に対応する合成ペプチドを用いてスクリーニングを行い得る。従って、PS2については、アミノ酸1~87(N末端)、または269~387(TM6 7ループ)に、あるいは目的の任意の他の保存ドメインにほぼ対応する配列を含めて、GST-融合ペプチドを作製し得る。より短い機能的ドメインについては、例えば、アミノ酸107~134(TM1 2ループ)にほぼ対応する合成ペプチドを生産し得る。同様に、PS1については、アミノ酸1~81(N末端)または266~410(TM6 7ループ)にほぼ対応する配列を含めて、GTS-または他の融合タンパク質を生産し得る。あるいは、アミノ酸101~131(TM1 2ループ)にほぼ対応する合成ペプチドが生産され得る。明らかに、融合タンパク質およびプレセニリン機能的ドメインの種々の組合せが可能であって、そしてこれらは例に過ぎない。さらに、機能的ドメインを変化させて、例えば、ドメインを基材上に固定化する(例えば、スルフヒドリル反応を用いて)ことを容易にする、反応性基またはアミノ酸残基(例えば、システイン)を、機能的ドメインに導入することによって、アッセイを補助し得る。従って、例えば、さらなるC末端システイン残基を含有する、PS1 TM1 2ループフラグメント(31マー)が合成された。このペプチドは、アフィニティークロマトグラフィー(Sulfo-link,Pierce)のためのアフィニティー基材を作製して、マイクロ配列決定のための結合タンパク質を単離するために使用される。同様に、修飾された残基を用いて、他の機能的ドメインまたは抗原性フラグメントを作製し得る(例えば、実施例10を参照のこと)。

これらの方法によって同定されるタンパク質または他の化合物は、当該分野で公知の任意の標準的方法によって、精製および特徴付けされ得る。タンパク質は、例えば、電気泳動(例えば、SDS-PAGE、2D PAGE)またはクロマトグラフィー(例えば、HPLC)技術を用いて精製および分離され得、次いで、マイクロ配列決定され得る。ロックされたN末端を有するタンパク質については、特定の結合タンパク質の切断(例えば、CNBrおよび/またはトリプシンによる)を用いて、ペプチドフラグメントを放出させ得る。HPLCによるさらなる精製および/または特徴付け、ならびに従来法によるミクロ配列決定および/または質量分析は、このようなロックされたタンパク質の内部配列データを提供する。非タンパク質化合物については、標準的有機化学分析技術(例えば、IR、NMRおよび質量分析;官能基分析;X線結晶解析)を用いて、それらの構造および正体(identity)を決定し得る。

細胞溶解物、組織ホモジネート、または低分子ライブラリーを、候補プレセニリン-結合分子についてスクリーニングする方法は、当該分野で周知であり、そして本開示に照らして、今や、それを用いて、正常または変異プレセニリン化合物に結合する、あるいは非特異的尺度(例えば、細胞内Ca²⁺、GTP/GDP比の変化)によって、または特異的尺度(例えば、Aペプチド産生の変化またはディファレンシアルディスプレイ、2Dゲル電気泳動、ディファレンシアルハイブリダイゼーション、またはSAGE方法によってモニターされ得る、他の下流遺伝子の発現の変化)によって定義される、プレセニリン活性を調節する化合物を同定し得る。好ましい方法は、以下の技術の変形を含む:(1)アフィニティークロ

10

20

30

40

50

マトグラフィーによる直接的抽出；(2)免疫沈降によるプレセニリン成分および結合タンパク質または他の化合物の同時単離；(3)Biomolecular Interaction Assay (BIAcore)；ならびに(4)酵母ツーハイブリッドシステム。これらおよび他のものを、以下に別々に議論する。

A. アフィニティーコロマトグラフィー

本開示に照らして、当該分野で周知の種々のアフィニティー結合技術を用いて、本明細書において開示されたまたは実施可能にされたプレセニリンに結合するタンパク質または他の化合物を単離し得る。一般に、プレセニリン成分は、基材（例えば、カラムまたはフィルター）上に固定化され得、そして試験化合物（単数または複数）を含む溶液を、結合に許容性の条件下でプレセニリンタンパク質、融合体またはフラグメントと接触させる。次いで、基材を溶液で洗浄して、非結合のまたは弱く結合した分子を除去する。次いで、第2の洗浄により、固定化された正常または変異プレセニリン成分に強力に結合するこれらの化合物を溶出させ得る。あるいは、試験化合物を固定化し得、そして1つ以上のプレセニリン成分を含有する溶液を、カラム、フィルターまたは他の基材と接触させ得る。プレセニリン成分が試験化合物に結合する能力は、上記のように測定され得るか、またはプレセニリン成分の標識形態（例えば、放射性標識されたまたは化学ルミネセンス性の機能的ドメイン）を用いて、基材-固定化化合物への結合をより迅速に評価し得る。さらに、PS1およびPS2の両方は膜会合タンパク質であると考えられているので、プレセニリンタンパク質、融合体またはフラグメントを脂質二重層（例えば、リポソーム）に組み込んで、これらの適切な折り畳みを促進することが好ましくあり得る。これは特に、少なくとも別の膜貫通ドメインを含むプレセニリン成分を使用する場合に真である。このようなプレセニリン-リポソームは、基材に固定化され得（直接的またはリポソーム膜中の別のエレメントによる）、固定化された試験化合物で基材を通過され得るか、あるいは膜タンパク質のための任意の他の周知の種々の結合アッセイにおいて使用され得る。あるいは、プレセニリン成分は、成分を産生する細胞由来の膜画分中に単離され得、そしてこの膜画分は結合アッセイにおいて使用され得る。

B. 免疫共沈

プレセニリン成分およびそれらの関連タンパク質または他の化合物の単離のための、別の十分に特徴付けられた技術は、抗体を用いる直接的免疫沈降である。この手順は、例えば、多くのシナプス小胞関連タンパク質を単離するために首尾よく用いられた（PhizickyおよびFields, 1994）。従って、正常または変異、遊離または膜結合のいずれかのプレセニリン成分を、結合に許容性の条件下で候補化合物（単数または複数）と溶液中で混合し得、そしてプレセニリン成分を、免疫沈降させ得る。次いで、プレセニリン成分と免疫共沈するタンパク質または他の化合物を、上記の標準的な技術によって同定し得る。免疫沈降のための一般的な技術は、例えば、HarlowおよびLane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYに見出され得る。

このアッセイにおいて使用される抗体は、本明細書において記載されそして実施可能にされたように、ポリクーナルまたはモノクローナルであり得、そして種々の抗体フラグメント（例えば、Fab、F(ab')₂）および单鎖抗体などを含む。

C. Biomolecular Interaction Assay

結合タンパク質の検出および単離のための別の有用な方法は、Pharmacia Biosensorによって開発され、そして製造者のプロトコルに記載されている（LKB Pharmacia, スウェーデン）Biomolecular Interaction Assayまたは「BIAcore」システムである。本開示に照らして、当業者は、今や、このシステム、または実質的な等価物を使用して、プレセニリン結合能力を有するタンパク質または他の化合物を同定し得る。BIAcoreシステムは、アフィニティー精製抗GST抗体を用いて、GST融合タンパク質をセンサーチップ上に固定化させる。明らかに、他の融合タンパク質および対応する抗体は、置換され得る。センサーは、屈折率の変化を検出する光学的現象である表面プラズモン共鳴を利用する。目的の組織のホモジネートを固定化融合タンパク質に通し、そしてタンパク質-タンパク質相互作用を屈折率の変化として記録する。このシステムを用いて、結合の反応速度を測定し得、そし

10

20

30

40

50

て全ての観察された結合が生理学的関連であるか否かを評価し得る。

D. 酵母ツーハイブリッドシステム

酵母「ツーハイブリッド」システムは、2つの物理的に分離可能な、機能的ドメインからなる転写因子を利用する (PhizickyおよびField, 1994)。最も一般に使用されるのは、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインよりなる酵母GAL4転写アクチベーターである。

2つの異なるクローニングベクターを用いて、潜在的な結合タンパク質をコードする遺伝子に対するGAL4ドメインの別々の融合体を生じさせる。融合タンパク質を同時発現させ、核に標的化し、そしてもし相互作用が起これば、レポーター遺伝子 (例えば、lacZ) の活性化により検出可能な表現型を生じる。例えば、Clontech Matchmaker System-2を、プレセニリン - GAL4結合性ドメイン融合クローンを用いて、Clontech 脳cDNA GAL4活性化ドメイン融合ライブセリーとともに用い得る (Clontech, Palo Alto, CA)。本明細書における開示に照らして、当業者は、今や、プレセニリンタンパク質の正常または変異機能的ドメインのいずれかを含む融合を含む、種々のプレセニリン融合体を生産し、そしてプレセニリン結合タンパク質を同定するためにこのような融合ライブセリーをスクリーニングすることが実施可能である。

E. 他の方法

これらの核酸の変異形態および正常形態の両方、ならびにそれらの対応するタンパク質を含むヌクレオチド配列およびタンパク質産物を、前記技術とともに用いて、他の相互作用性タンパク質を単離し、そしてその発現が正常プレセニリン配列の過剰発現によって、正常プレセニリン配列の過小発現によって、または変異プレセニリン配列の発現によって変化される他の遺伝子を同定し得る。これらの相互作用性タンパク質の同定、および (例えば) その発現レベルが変異プレセニリン配列に直面して変化される他の遺伝子の同定により、その臨床的または病理学的形態においてこの疾患の病状に対して直接的関連を有する他の遺伝子標的が同定される。詳細には、それ自体がアルツハイマー病を引き起こす他の変異の部位であり得る、あるいはこの疾患のための潜在的処置としてそれ自体が治療的に標的化され得る (例えば、それらの発現レベルを正常まで低下させるため、またはそれらの過剰発現の影響を薬理学的にブロックするために)、他の遺伝子が同定される。詳細には、これらの技術は、PCRに基づくおよび/またはハイブリダイゼーションに基づく方法に依存して、2つの条件 (変異プレセニリン配列を発現する同一細胞型と比較しての、正常プレセニリンを発現する細胞株) の間でディファレンシャルに発現される遺伝子を同定する。これらの技術は、ディファレンシャルディスプレイ、遺伝子発現の連続的分析 (SA GE)、およびタンパク質2D - ゲルの質量分析、およびサブトラクティブハイブリダイゼーションを含む (Nowak, 1995およびKahn, 1995に概説される)。

当業者に明白なように、正常または変異プレセニリン成分に結合する分子を同定するための、個々のタンパク質または他の化合物、あるいはタンパク質または他の化合物の大きなライブラリー (例えば、Stratagene, La Jolla, カリフォルニアからのファージディスプレイライブラリーおよびクローニングシステム) をスクリーニングする多数の他の方法が存在する。これらの方法の全ては、正常または変異のプレセニリンタンパク質、融合体、またはフラグメントを試験化合物と混合し、結合させ (もしあれば)、そして結合複合体についてアッセイする工程を包含する。全てのこのような方法が、今や、実質的に純粋なプレセニリン、実質的に純粋なプレセニリン機能的ドメインフラグメント、プレセニリン融合タンパク質、プレセニリン抗体、およびそれらを作製しそして使用する方法の本開示によって、実施可能にされる。

8. プレセニリン活性を調節する化合物を同定する方法

別の一連の実施態様において、本発明は、正常および変異のプレセニリンの活性を調節する能力を有する化合物を同定する方法を提供する。この一連の実施態様に関して用いられる、用語「活性」は、遺伝子およびタンパク質発現、プレセニリンタンパク質翻訳後プロセシング、トラフィックингおよび局在化、ならびに任意の機能的活性 (例えば、酵素、レセプター - エフェクター、結合、チャンネルの)、ならびに任意のこれらの下流影響を広く含む。プレセニリンは、通常は小胞体および/またはゴルジ装置と会合した内在性膜

10

20

30

40

50

タンパク質であるようであり、そしてAPPの輸送またはトラフィッキングおよび／または細胞内カルシウムレベルの調節に関する機能を有し得る。さらに、プレセニリン変異は、Aペプチドの生産の増大、アミロイド斑および神経細線維もつれの出現、認識機能の低下、およびアポトーシス細胞死に関連することが知られている。従って、本発明の形質転換細胞およびトランスジェニック動物モデル、変異プレセニリン遺伝子を有する被験体または天然に生じるプレセニリン変異を有する動物もしくはヒトの被験体から得られた細胞を用いて、今や、正常または変異のプレセニリン発現の1つ以上のこれらの機能的特徴または表現型発現の変化を検出することによって、候補医薬および処置を、それらの治療的効果についてスクリーニングし得る。

従って、本発明は、細胞をインビトロまたはインビトロで候補化合物と接触させ、そして正常または変異のプレセニリン活性に関連したマーカーの変化についてアッセイすることによって、プレセニリン活性を調節するタンパク質、低分子、または他の化合物をスクリーニングまたはアッセイする方法を提供する。プレセニリン活性に関連したマーカーは、プレセニリン発現に関連する、任意の測定可能な生物学的、生理学的、組織学的、および／または拳動的特徴であり得る。特に、有用なマーカーは、それらの正常なカウンターパートから、少なくとも1つの変異プレセニリン遺伝子を有する細胞、組織、動物、または個体を区別する、任意の測定可能な生物学的、生理学的、組織学的、および／または拳動的特徴を含む。さらに、マーカーは、任意のプレセニリン活性の特異的または非特異的尺度であり得る。プレセニリン特異的尺度は、本発明の核酸プローブまたは抗体を使用し得る、プレセニリン発現の尺度（例えば、プレセニリンmRNAまたはタンパク質レベル）を含む。非特異的尺度は、cytosensor microphysiometer (Molecular Devices Inc., United States) のようなデバイスでモニターされ得る、pH、細胞内カルシウム、サイクリックAMPレベル、GTP/GDP比、ホスファチジルイノシトール活性、タンパク質リン酸化などのような細胞生理学の変化を含む。その変異形態または正常形態におけるプレセニリン活性の活性化または阻害はまた、アルツハイマー病に至るプレセニリン経路に特異的な他の遺伝子の発現の変化を検討することによってモニターされ得る。これらは、ディファレンシャルディスプレイ、ディファレンシャルハイブリダイゼーション、およびSAGE（遺伝子発現の連続的分析）のような技術によって、ならびに細胞溶解物の二次元ゲル電気泳動によって、アッセイされ得る。各場合において、ディファレンシャルに発現される遺伝子は、候補化合物の適用の前後の同一の研究の点検によって確認され得る。さらに、他所で記載するように、その発現が候補化合物の投与によって調節される特定の遺伝子は、クローニング、スクレオチド配列決定、アミノ酸配列決定、または質量分析によって確認され得る（Nowak, 1995に概説される）。

一般に、細胞を候補化合物と接触させ、そして適切な期間の後（例えば、培養細胞のほとんどの生化学的尺度については0～72時間）、プレセニリン活性のマーカーをアッセイし、そしてベースライン測定値と比較し得る。ベースライン測定値は、細胞と候補化合物との接触の前になされ得、または他の実験によって確立されたもしくは当該分野で公知の外部ベースラインであり得る。細胞は、本発明の形質転換細胞であり得、または動物もしくは個体由来の外植片であり得る。特に、細胞は、プレセニリン変異の保因者（例えば、アルツハイマー病を有するヒト被験体）または本発明の動物モデル（例えば、変異プレセニリン遺伝子を有するトランスジェニック線虫またはマウス）由来の外植片であり得る。A

経路に対するプレセニリン変異の効果を増大させるためには、増加したA産生を有するトランスジェニック細胞または動物が使用され得る。好ましい細胞は、ニューロン細胞、神経膠細胞または混合細胞の培養物のような神経組織；および培養線維芽細胞、肝臓、腎臓、脾臓、または骨髄由来の細胞を含む。細胞は、インビトロにおいて培養物中の候補化合物と接触され得るか、またはインビトロにおいて生存動物もしくはヒト被験体に投与され得る。生存動物またはヒト被験体については、試験化合物を経口または化合物に適切な任意の非経口経路によって投与し得る。ヒト被験体の臨床試験については、測定は数ヶ月または数年の間定期的に（例えば、毎日、毎週、または毎月）行い得る。

プレセニリン変異の保因者のほとんどはヘテロ接合型であるので（すなわち、1つの正常

10

20

30

40

50

および1つの変異プレセニリン対立遺伝子を有する)、化合物を正常およびプレセニリン活性を調節するそれらの能力について試験し得る。従って、例えば、正常プレセニリンの機能を増強する化合物は、アルツハイマー病のようなプレセニリン関連障害の処置において有用性を有し得る。あるいは、ヘテロ接合型個体における正常および変異プレセニリンの両方の活性の抑制は、関連疾患の進行よりも低い重篤度の臨床的結果を有し得るので、全ての形態のプレセニリンを不活性または抑制する化合物を同定することが所望され得る。しかし、好ましくは、正常プレセニリンの遺伝子またはタンパク質の機能を破壊することなく、変異プレセニリンの活性を選択的または特異的に不活性または抑制する化合物が同定される。

本発明のプレセニリンの遺伝子およびタンパク質の本明細書中における同定、特徴付け、および開示、プレセニリンの核酸プローブおよび抗体、ならびにプレセニリン形質転換細胞およびトランスジェニック動物に照らして、当業者は、今や、候補化合物によるプレセニリン活性の調節を検出する非常に多様なアッセイを行うことが実施可能にされる。特に好ましいそして意図される実施態様は、以下にいくぶん詳しく議論される。

A. プレセニリン発現

一連の実施態様において、プレセニリン発現の特異的尺度が、プレセニリン活性に影響するそれらの能力について候補化合物をスクリーニングするために使用される。従って、本明細書において開示された、そして実施可能にされたプレセニリンの核酸および抗体を用いて、mRNAレベルまたはタンパク質レベルを、プレセニリン活性を調節する候補化合物の能力のためのマーカーとして使用し得る。このようなプローブおよび抗体の、遺伝子およびタンパク質発現を測定するための使用は当該分野で周知であり、そして本明細書中の他所で議論される。特に目的とするのは、プレセニリンの異なるスプライス変異体の相対的レベルを変化させ得る化合物の同定であり得る。例えば、アルツハイマー病に関連したプレセニリン変異の多くは、いくつかの末梢組織(例えば、白血球)におけるオルタナティブスプライシングに供される推定TM6_7ループの領域に位置する。従って、このスプライシング事象の相対的頻度を増加させ得る化合物は、この領域における変異の発現を妨げるのに有効であり得る。

B. 細胞内局在化

別の一連の実施態様において、プレセニリンのトラフィッキングおよび細胞内局在化に対するこれらの効果に基づいて、プレセニリンの活性を調節するそれらの能力について、化合物をスクリーニングし得る。プレセニリンは免疫細胞化学的に、小胞体およびゴルジ装置と会合する膜構造に局在化されると見られ、そして1つのプレセニリン変異体(H163R)(他は違う)は未知の機能の小さい細胞質小胞中で可視化された。従って、変異および正常プレセニリンの局在化の差異は、プレセニリン関連疾患の病因に寄与し得る。従って、プレセニリンの局在化に影響し得る化合物は、潜在的治療剤として同定され得る。当該分野で公知の標準的技術を用いて、プレセニリンの局在化を検出し得る。一般に、これらの技術は、本発明の抗体、特に1つ以上の変異プレセニリンに選択的に結合するが、正常プレセニリンには選択的に結合しない抗体を使用する。当該分野で周知のように、このような抗体は、プレセニリンの細胞内位置を可視化することを補助するために、任意の種々の技術(例えば、蛍光または放射性タグ、標識二次抗体、アビジン-ビオチンなど)によって標識され得る。当該分野で公知のように、プレセニリンは、これらの構造のマーカーに対する抗体(例えば、ゴルジに対するTGN38、ゴルジ後輸送小胞に対するトランスフェリンレセプター、リソソームに対するLAMP2)を用いて、特定の構造に共局在化(co-localize)され得る。異なる細胞内膜結合オルガネラ(例えば、リソソーム、シナプトソーム、ゴルジ)についての富化された細胞溶解物由来の精製画分のウェスタンプロットもまた使用され得る。さらに、細胞ドメインを横切るプレセニリンの異なるドメインの相対的方向は、例えば、電子顕微鏡およびそれらのドメインに対して惹起された抗体を用いてアッセイされ得る。

B. イオン調節 / 代謝

別の一連の実施態様において、化合物を、細胞内Ca²⁺、Na⁺またはK⁺レベル、あるいは代

10

20

30

40

50

謝における尺度に基づいて、プレセニリンの活性を調節するそれらの能力についてスクリーニングし得る。上記のように、プレセニリンはイオンレセプターまたはイオンチャンネルとして作用し得る、あるいはそれと相互作用し得る膜会合タンパク質である。従って、化合物を、インビボまたはインビトロのいずれかでプレセニリン関連のカルシウムまたは他のイオン代謝を調節するそれらの能力について、パッチクランプ、電圧クランプおよび細胞内カルシウムまたは膜貫通電圧に感受性の蛍光色素を用いて、イオンチャンネルフラックスおよび/または膜貫通電圧または電流フラックスの測定によって、スクリーニングし得る。イオンチャンネルまたはレセプター機能はまた、サイクリックAMP、cGMPチロシンキナーゼ、リン酸、細胞内 Ca^{2+} レベルの増加などのようなセカンドメッセンジャーの活性化の測定によってアッセイされ得る。また、組換えにより作製されたタンパク質を人工膜系中に再構築して、イオンチャンネルコンダクタンスを研究し得、そして従って、このようなアッセイで使用される「細胞」は人工膜または細胞を含み得る。イオン調節または代謝の変化についてのアッセイは、内因性正常または変異プレセニリンを発現する培養細胞に対して行われ得る。このような研究は、正常形態または変異形態の、プレセニリンの1つを、またはプレセニリンの1つの機能的ドメインを発現し得るベクターでトランスフェクトされた細胞に対して行い得る。さらに、このようなアッセイにおいて測定されたシグナルを増強させるために、細胞をイオンチャンネルタンパク質をコードする遺伝子で同時トランスフェクトし得る。例えば、*Xenopus*卵母細胞またはラット腎臓(HEK293)細胞を、正常または変異プレセニリン配列およびラット脳 Na^+ 1サブユニット、ウサギ骨格筋 Ca^{2+} 1サブユニット、またはラット心臓 K^+ 1サブユニットをコードする配列で同時トランスフェクトし得る。プレセニリン関連またはプレセニリン媒介性イオンチャンネル活性の変化は、卵母細胞における2-ミクロ電極電圧クランプ記録によって、またはHEK293細胞における全細胞パッチクランプ記録によって測定され得る。

C. アポトーシスまたは細胞死

別の一連の実施態様において、化合物を、プレセニリン関連またはプレセニリン媒介性アポトーシスまたは細胞死に対するそれらの効果に基づき、プレセニリンの活性を調節するそれらの能力についてスクリーニングし得る。従って、例えば、アポトーシスまたは細胞死のベースライン率を、培養物中の細胞について確立し得るか、または特定の年齢におけるニューロン損失のベースライン度を、動物モデルまたはヒト被験体について、死後に確立し得、そしてアポトーシスまたは細胞死を抑制するまたは阻害する候補化合物の能力を測定し得る。細胞死は標準的な顕微鏡技術(例えば、光学顕微鏡)によって測定され得、あるいはアポトーシスは、ヌクレオソームラダーを生じる特徴的な核形態またはDNAフラグメント化パターンによって、より特異的に測定され得る(例えば、Gavieら, 1992; Jacobsonら, 1993; Vitoら, 1996を参照のこと)。TUNELも、脳における細胞死を評価するために用いられ得る(例えば、Lassmannら, 1995を参照のこと)。好ましい実施態様において、化合物を、本発明のトランスジェニック動物モデルにおけるニューロン損失を抑制または阻害するそれらの能力について、スクリーニングし得る。例えば、変異ヒト、変異マウス、またはヒト化変異プレセニリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを使用して、アルツハイマー病に関連する神経変性を遅延または停止し得る化合物を同定または評価し得る。変異APP遺伝子を有する同様のトランスジェニックマウスモデルが、Gamesら(1995)によって最近報告されている。

D. A ペプチド産生

別の一連の実施態様において、化合物を、APPプロセシングのプレセニリン関連またはプレセニリン媒介性変化を調節するそれらの能力について、スクリーニングし得る。APPプロセシングにおける差違から生じたいくつかのイソ型で、Aペプチドを産生する。Aペプチドは、散在性および老人性斑において、およびADを有する被験体の血管において、進行性に沈積するAPPの39~43アミノ酸の誘導体である。ヒト脳において、AペプチドはNおよびC末端の両方において不均質である。しかし、いくつかの観察は、全長形態および、残基42または43で終結する長テールAペプチドのN末端短縮型(すなわち、A-1-42/43およびA-x-42/43)の両方が、残基40で終結するペプチドよりも、ADにおいてより重

10

20

30

40

50

要な役割を有することを示唆する。従って、A -42/43およびA x-42/43は、老人性斑および散在性斑の両方の初期かつ突出した特徴であるが、残基40で終結するペプチド（すなわち、A 1-40およびA x-40）は、成熟斑のサブセットおよびアミロイド性血管に優勢に関連する（例えば、Iwatsuboら，1995；Gravinaら，1995；Tamokaら，1995；Podlisnyら，1995を参照のこと）。さらに、長テールイソ型は、原線維形成に対してより大きい傾向を有し、そしてA 1-40ペプチドよりも神経毒性であると考えられる（Pikeら，1993；Hilbichら，1991）。最後に、初期発症FADに関連する APP遺伝子のコドン717におけるミスセンス変異は、冒された変異体保因者の脳において、冒されそして前症候性の両方の保因者の末梢細胞および血漿において、ならびに APP₇₁₇変異cDNAでトランスフェクトされた細胞株において、長テールA の過剰産生を生じる（Tamaokaら，1994；Suzukiら，1994）。下記の実施例18に記載のように、本発明者らは、今や、A ペプチドの長形態の産生の増大もまた、プレセニリン遺伝子における変異に関連することを開示する。

従って、一連の実施態様において、本発明は、候補化合物を、変異プレセニリン遺伝子を発現する細胞またはトランスジェニック動物における、A ペプチドの長イソ型の産生の増大をブロックまたは阻害するそれらの能力について、スクリーニングする方法を提供する。特に、本発明は、脳細胞または線維芽細胞のような培養哺乳動物細胞が、本明細書に開示された方法に従って形質転換された、あるいは齧歯類または非ヒト霊長類のようなトランスジェニック動物が、本明細書に開示される方法によって生産されて、比較的高レベルの変異プレセニリンを発現する、このような方法を提供する。任意に、このような細胞またはトランスジェニック動物はまた、APPタンパク質の正常形態を比較的高レベルで発現させるように形質転換され得る。

この一連の実施態様において、候補化合物を細胞株またはトランスジェニック動物に投与し得（例えば、培養物中の細胞の培地に添加することによって；あるいは動物に経口または非経口投与することによって）、そして適切な期間の後（例えば、培養物中の細胞については0～72時間、動物モデルについては数日または数カ月）、生物学的サンプルを収集し（例えば、培養物中の細胞由来の細胞培養上清または細胞溶解物；動物由来の組織ホモジネートまたは血漿）、そしてA ペプチドの長イソ型のレベルについて試験する。絶対的な意味において（例えば、nMol/ml）または相対的意味において（例えば、短A イソ型に対する長イソ型の比）、ペプチドのレベルを決定し得る。A イソ型は、当該分野で公知の任意の手段によって（例えば、電気泳動分離および配列決定）検出され得るが、好ましくは、長イソ型に対して特異的な抗体を使用して、A 1-42/43またはA x-42/43ペプチドの絶対的または相対的レベルを測定する。これらの長A イソ型の絶対的または相対的レベルを低下させる（特に、本発明のトランスジェニック動物モデルにおいて）候補医薬または治療は、アルツハイマー病、あるいはプレセニリン変異またはAPP代謝における異常によって引き起こされる他の障害の処置において治療的有用性を有するようである。

E. 微小管関連タンパク質のリン酸化

別の一連の実施態様において、候補化合物を、Tauのような微小管関連タンパク質（MAP）のリン酸化レベルに対する化合物の効果を評価することによって、プレセニリン活性を調節するそれらの能力についてスクリーニングし得る。アルツハイマー病の犠牲者の脳におけるTauおよび他のMAPの異常リン酸化は、当該分野において周知である。従って、MAPの異常リン酸化を防止するまたは阻害する化合物は、ADのようなプレセニリン関連疾患を治療することにおいて有用性を有し得る。上記のように、正常または変異動物または被験体、あるいは本発明の形質転換細胞株および動物モデルを使用し得る。好ましいアッセイは、変異ヒトまたはヒト化変異プレセニリン遺伝子で形質転換された細胞株または動物モデルを使用する。これらの細胞におけるMAPのベースラインリン酸化状態を確立し得、次いで、候補化合物の変異体に関連する過剰リン酸化を防止、阻害または中和するそれらの能力について試験し得る。MAPのリン酸化状態は、当該分野で公知の任意の標準的方法によって測定され得るが、好ましくは、リン酸化されたまたはリン酸化されていないエピトープに選択的に結合する抗体が使用される。Tauタンパク質のリン酸化エピトープに対するこのような抗体は、当該分野において公知である（例えば、ALZ50）。

10

20

30

40

50

9. アルツハイマー病についてのスクリーニングおよび診断

A. 一般的診断方法

本明細書中で開示されまたは実施可能なプレセニリン遺伝子および遺伝子産物、ならびにプレセニリン由来のプローブ、プライマーおよび抗体は、アルツハイマー病に関連する対立遺伝子の保因者のスクリーニング、アルツハイマー病の罹患者の診断、ならびに関連する早老性および老人性の痴呆症、精神分裂病および鬱病のような精神医学的疾患、ならびに脳卒中および脳溢血のような神経学的疾患（これらの全ては、PS1またはPS2の遺伝子またはAPP遺伝子における変異を有する症候的ヒト被験体において多かれ少なかれ見られる）のスクリーニングおよび診断において有用である。アルツハイマー病の危険がある個体（例えば、家系に存在するADを有する個体）、あるいは危険があることが従前には知られていない個体を、種々の技術によって変異プレセニリン遺伝子またはタンパク質の存在を検出するためのプローブを用いて日常的にスクリーニングすることができる。これらの病気の遺伝の症例の診断は、正常なプレセニリン活性の欠損または増加、および／または変異プレセニリンによって付与された新しい特定の活性の存在を検出するように設計された機能的アッセイを含む、本明細書中で開示されまたは実施可能な（ゲノム配列およびmRNA／cDNA配列を含む）核酸、タンパク質、および／または抗体に基づく方法によって達成することができる。好ましくは、本明細書中で開示されまたは実施可能であるように、本方法および産物は、ヒトのPS1またはPS2の核酸、タンパク質、または抗体に基づく。しかしながら、当業者に明らかかなように、ヒト、マウス、*C.elegans*、および*Drosophila*のような広い種においてさえ、PS1およびPS2のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の大きな割合の有意の進化的保存は、当業者に、ヒトまたは他の動物被験体に向けられた適用についてさえ、このような非ヒトプレセニリンホモログの核酸、タンパク質、および抗体を利用することを可能とする。従って、本発明の範囲を限定することなく説明を簡単にするために、以下の記載は、PS1およびPS2のヒトホモログの使用に焦点を当てる。しかしながら、本明細書に開示するものを含む他の種からの相同配列は、多くの目的のためには同等であることが理解される。

当業者によって認識されるように、本発明の診断方法の選択は、テストすべき利用可能な生物学的サンプルの性質および必要とされる情報の性質によって影響される。例えば、PS1は、脳組織で高度に発現される。しかし、脳バイオプシーは、特に日常的なスクリーニングでは、侵襲的であって費用のかかる手順である。しかしながら、有意なレベルでPS1を発現する他の組織（例えば、リンパ球）は、オルタナティブスプライシングを示し得る。従って、このような細胞からのPS1のmRNAまたはタンパク質は、あまり有益ではあり得ない。従って、被験体のゲノムPS1 DNAに基づくアッセイが好ましいかもしれない。なぜなら、どの情報も、オルタナティブスプライシングに依存せず、そして本質的に、任意の有核細胞は使用可能なサンプルを供し得るからである。他のプレセニリン（例えば、hPS2、mPS1）に基づく診断は、同様の考慮：組織の利用性、種々の組織における発現のレベル、およびオルタナティブスプライシングにより得られる別のmRNAおよびタンパク質産物を対象とする。

B. タンパク質に基づくスクリーニングおよび診断

診断アッセイがプレセニリンタンパク質に基づくべき場合、種々のアプローチが可能である。例えば、診断は、正常タンパク質と変異タンパク質との電気泳動移動度における差異をモニターすることによって達成できる。このようなアプローチは、荷電置換が存在する変異体、あるいは挿入、欠失、または置換の結果得られたタンパク質の電気泳動移動が有意に変化した変異体を同定するにおいて特に有用である。あるいは、診断は、正常タンパク質と変異タンパク質とのタンパク質分解切断パターンの差異、種々のアミノ酸残基のモル比の差異に基づくものであり得、あるいは遺伝子産物の変化した機能を示す機能的アッセイによるものであり得る。

好ましい実施態様において、タンパク質に基づく診断は、正常および変異プレセニリンタンパク質（特に、hPS1またはhPS2）に結合する抗体の能力の差異を使用する。このような診断テストは、正常タンパク質に結合するが変異タンパク質には結合しない、あるいはそ

10

20

30

40

50

の逆である抗体を使用できる。特に、複数のモノクローナル抗体（各々が、変異エピトープに結合できる）を使用できるアッセイ。テスト被験体から得られるサンプルにおける抗変異体抗体の結合のレベル（例えば、放射性標識、ELISA、または化学ルミネセンスにより可視化される）が、コントロールサンプルへの結合のレベルと比較され得る。あるいは、正常プレセニリンには結合するが変異プレセニリンには結合しない抗体を使用することができ、そして抗体結合のレベルの減少を用いて、ホモ接合の正常個体を、変異したヘテロ接合体またはホモ接合体から区別することができる。このような抗体診断は、神経線維の絡みおよびアミロイド斑などのこれらの病気に関連する神経病理学的構造体を含む、生前または死後に得られるCNS組織のバイオプシーサンプルを用いるインサイチュ免疫組織化学のために使用し得るか、あるいは脳脊髄液のような液体サンプル、あるいは白血球のような末梢組織を用いて使用し得る。

10

C. 核酸に基づくスクリーニングおよび診断

診断アッセイがサンプルからの核酸に基づく場合、アッセイは、mRNA、cDNA、またはゲノムDNAに基づくことができる。サンプルからのmRNAを使用する場合、多くの同じ考慮が、供給源組織およびオルタナティブスプライシングの可能性に関してなされる。すなわち、適切な組織供給源が選択されず、またはそれが入手可能でなければ、転写物の発現はほとんどまたは全くなく、そしてオルタナティブスプライシングの結果、いくつかの情報が失われるか、あるいは解釈が困難となる。しかしながら、本発明者らは、5' UTR、3' UTR、オープンリーディングフレーム、ならびにPS1およびPS2の双方のスプライス部位における変異は、白血球および/または皮膚線維芽細胞から単離されたmRNA / cDNAで信頼性よく同定できることを既に示した（Sherringtonら, 1995; Rogaev, 1995）。mRNA、cDNA、またはゲノムDNAをアッセイするか否かにかかわらず、当該分野で周知の標準的な方法を用いて、インサイチュまたはインビトロのいずれかで特定の配列の存在を検出することができる（例えば、Sambrookら, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと）。しかしながら、一般的には、有核細胞を持つ任意の組織を調べることができる。

20

診断のために用いられるゲノムDNAは、血液、組織バイオプシー、手術検体、またはオートプシー材料に存在するもののような身体細胞から得ることができる。DNAを単離し、そして特異的配列の検出に直接使用するか、あるいは分析に先立って、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することができる。同様に、RNAまたはcDNAはまた、PCR増幅と共にまたはそれなしで用いることができる。特異的な核酸配列を検出するに、直接的ヌクレオチド配列決定、特異的オリゴヌクレオチドを用いるハイブリダイゼーション、制限酵素消化およびマッピング、PCRマッピング、RNaseプロテクション、化学的ミスマッチ切断、リガーゼ媒介検出、および種々の他の方法が使用できる。特定の配列に対して特異的なオリゴヌクレオチドを化学的に合成し、放射性または非放射性標識（例えば、ビオチンタグ、エチジウムプロミド）し、そして（例えば、ドットプロットまたは電気泳動後にゲルからの転写により）膜または他の固体支持体に固定化された、あるいは溶液中の個々のサンプルにハイブリダイズさせることができる。次いで、標的配列の存在または不存在を、オートラジオグラフィー、フルオロメトリー、または比色法のような方法を用いて可視化することができる。これらの手順は、高密度でシリコンチップに固定化された既知配列の縮重した短いオリゴヌクレオチドを用いて自動化できる。

30

（1）適切なプローブおよびプライマー

ハイブリダイゼーション、RNaseプロテクション、リガーゼ媒介検出、PCR増幅、または本明細書中に記載されそして当該分野で周知の任意の他の標準的な方法のいずれにせよ、本明細書中で開示されまたは実施可能なプレセニリン配列の種々のサブ配列は、プローブおよび/またはプライマーとして有用である。これらの配列またはサブ配列は、正常なプレセニリン配列および有害な変異配列の両方を含む。一般に、有用な配列は、プレセニリンのイントロン、エキソン、またはイントロン/エキソン境界からの、少なくとも8~9、より好ましくは10~50、そして最も好ましくは18~24の連続するヌクレオチドを含む。標的配列、必要な特異性、および将来の技術開発に応じて、より短い配列もまた有

40

50

用性を有し得る。従って、プレセニリン配列を単離し、クローン化し、増幅し、同定し、または操作するのに使用される任意のプレセニリン由来の配列は、適切なプローブまたはプライマーとみなすことができる。有用と特に考えられるのは、疾患原因の変異が存在するところが知られているプレセニリン遺伝子のヌクレオチド位置を含む配列、あるいはこれらの位置に隣接する配列である。

(a) PS1のプローブおよびプライマー

前記で考察したように、今や、種々の疾患原因の変異が、ヒトPS1遺伝子で同定された。これらおよび他のPS1変異の検出は、今や、正常または変異のPS1遺伝子に由来する単離された核酸プローブまたはプライマーを用いて可能である。有用と特に考えられるのは、N末端、TM1 - TM2領域、およびTM6 - TM7領域をコードする配列に由来するプローブまたはプライマーである。しかしながら、前記に開示するように、PS1タンパク質の他の領域に影響する変異は既に検出されており、本明細書中で開示する方法を用いて、さらに疑いもなく検出される。従って、本発明は、アルツハイマー病の発症に関連することを示し得る、イントロンならびに5'および3'UTRを含むPS1遺伝子のいずれかの部分からの正常配列および変異配列に対応する単離された核酸プローブおよびプライマーを提供する。

単に例として、かつ本発明を限定することなく、丁度C410Yの変異付近のhPS1 DNAセグメントに由来するプローブおよびプライマーを、スクリーニングおよび診断方法で使用することができる。この変異は、少なくとも特定の個体において、配列番号1の1477位におけるGからAへの置換から生じる。従って、この潜在的な変異部位を含むオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いて、個体の末梢血液サンプルから獲得されたゲノムDNA、mRNA、またはcDNAをスクリーニングできる。この変異用のハイブリダイゼーションプローブには、変異部位をまたぐ、8～50、より好ましくは18～24塩基のプローブ（例えば、配列番号1のbp 1467～1487）が使用できる。もしプローブがmRNAとともに使用されるならば、それは、勿論、mRNAに相補的であるべきである（従って、PS1遺伝子の非コード鎖に対応する）。ゲノムDNAまたはcDNAとともに使用すべきプローブは、プローブは、いずれかの鎖に相補的であり得る。PCR方法によるこの変異を含む配列を検出するために適切なプライマーは、いずれかの側の変異に隣接する領域に由来する、8～50、好ましくは18～24の長さのヌクレオチドの配列を含む。それは、変異部位から除去された、1～1000bp、好ましくは1～200bpの任意の位置に対応する。（コード鎖上の）変異の5'側にあるPCRプライマーは、配列において、PS1遺伝子のコード鎖に対応すべきであり、他方、（コード鎖上の）変異部位の3'側にあるPCRプライマーは、非コード鎖もしくはアンセンス鎖に対応すべきである（例えば、配列番号1のbp 1451～1468に対応する5'プライマー、および配列番号14の719～699の相補物に対応する3'プライマー）。

同様のプライマーを、他のPS1変異、または一般に変異の「ホットスポット」について選択することができる。例えば、M146L変異（bp 684におけるA C）についての5'PCRプライマーは、配列番号1のほぼbp 601～620に対応する配列を含むことができ、そして3'プライマーは、配列番号8のほぼbp 1328～1309の相補物に対応し得る。この例は、イントロン配列およびエキソン配列の双方からのプライマーを使用することに注意されたい。別の例として、A246E変異（bp 985におけるC A）についての適切な5'プライマーは、配列番号1のほぼbp 907～925に対応する配列、または配列番号1のほぼbp 1010～990の相補物に対応する3'プライマーを含み得る。別の例として、配列番号9のほぼbp 581～559の相補物に対応する3'プライマーと共に、配列番号9のほぼbp 354～375に対応する配列を含むH163R変異（配列番号1のbp 736または配列番号9のbp 419におけるA G）についての5'プライマー。同様に、イントロン配列またはエキソン配列を使用して、例えば、配列番号11のほぼbp 249～268または配列番号1のbp 1020～1039に対応する配列を含むL286V変異（配列番号1のbp 1104または配列番号11のbp 398におけるC G）についての5'プライマーおよび配列番号11のほぼbp 510～491の相補物に対応する3'プライマーを生成させることができる。

プローブおよびプライマーが特異的変異ヌクレオチドを含み得ることに注意すべきである。従って、例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたは5'プライマーは、正常な対

10

20

30

40

50

立遺伝子をスクリーニングもしくはそれを増幅するために、配列番号1のほぼbp 1468～1486に対応する配列、あるいは変異した対立遺伝子をスクリーニングするかもしくはそれを増幅するために、同一であるが変異したbp 1477 (G → T)に対応するbpを有する配列に対応する配列を含むC410Y変異のために作製することができる。

(b) PS2のプローブおよびプライマー

PS1についてのプローブおよびプライマーに関する前記の同じ一般的の考慮は、PS2についてのプローブおよびプライマーに同等に適用される。特に、プローブまたはプライマーは、イントロン、エキソン、またはイントロン／エキソン境界配列に対応してもよく、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖からの配列に対応してもよく、そして正常または変異配列に対応してもよい。

単に例として、PS1 N141I変異 (bp 787におけるA → T) を、配列番号1 8のほぼbp 733～751に対応する5'プライマーおよび配列番号1 8のほぼbp 846～829の相補物に対応する3'プライマーを用い、周囲のDNA断片のPCR増幅によってスクリーニングすることができる。同様に、M239V変異 (bp 1080におけるA → G) についての5'プライマーは、ほぼbp 1009～1026に対応する配列を含むことができ、そして3'プライマーは配列番号1 8のほぼbp 1118～1101の相補物に対応し得る。別の例として、I420T変異 (bp 1624におけるT → C) の周囲の領域をコードする配列を、配列番号1 8のほぼbp 1576～1593に対応する5'プライマーおよび配列番号1 8のほぼbp 1721～1701の相補物に対応する3'プライマーを用いて、ゲノムDNAのPCR増幅によってスクリーニングして、146塩基対の産物を生成させることができる。次いで、この産物を、例えば、野生型（例えば、配列番号1 8のbp 1616～1632）および／または変異体（例えば、bp 1624におけるT → Cを有する配列番号1 8のbp 1616～1632）の配列について対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドでプローブすることができる。

(2) ハイブリダイゼーションスクリーニング

正常または変異のPS1、PS2、または他のプレセニリン関連核酸配列のインサイチュ検出には、標準的な技術によって組織のサンプルを調製することができ、次いで、1つ以上の前記のプローブ、好ましくは検出を容易とするために標識されたプローブと接触させ、そして核酸ハイブリダイゼーションのためのアッセイを、プローブと高度にまたは完全に相補的な配列との間でのみハイブリダイゼーションを可能とするストリングエントな条件下で行う。現在までに検出されたPS1およびPS2の変異のほとんどは、1つのヌクレオチド置換よりなるので、高いストリングエンシーのハイブリダイゼーション条件が、多くの変異配列から正常配列を区別するのに必要である。被験体の親のプレセニリン遺伝子型が知られている場合、それに従ってプローブを選択することができる。あるいは、種々の変異体に対するプローブを、連続的または組み合わせて使用することができる。プレセニリン変異体を有する個体の多くははヘテロ接合性であるので、正常配列に対するプローブも使用することができ、そしてホモ接合の正常個体を、（例えば、放射能シグナルの強度により）接合の量によって変異したヘテロ接合体から区別することができる。別の変形において、競合結合アッセイを使用することができる。この場合、正常および変異の両方のプローブを使用するが、1つのみを標識する。

(3) 制限マッピング

配列の変化をまた用いて、適切な酵素消化、続いてのゲル・プロットハイブリダイゼーションの使用によって明らかにされる偶発的な制限酵素認識部位が生成または破壊され得る。部位（正常または変異）を有するDNA断片は、サイズにおけるその増加または減少によって、あるいは対応する制限断片数の増加または減少によって検出される。このような制限断片長多型分析（RELP）、または制限マッピングは、ゲノムDNA、mRNAまたはcDNAを用いて使用することができる。プレセニリン配列は、制限に先立って前記のプライマーを用いるPCRによって増幅することができ、この場合、PCR産物の長さは、特定の制限部位の存在または非存在を示すことができ、および／または増幅後に制限に供し得る。プレセニリン断片は、任意の便宜な手段によって可視化することができる（例えば、エチジウムプロミドの存在下におけるUV光下）。

単に例として、PS1のM146L変異（配列番号1のbp 684におけるA → C）はPspHI部位を破壊し；H163R変異（bp 736におけるA → G）はNlaIII部位を破壊し；A246E変異（bp 985におけるC → A）はDdeI部位を生じ；およびL286V変異（bp 1104におけるC → G）はPvuIII部位を生じることに任意される。当業者は、多くの市販の制限酵素から容易に選択し、本明細書中で開示されそしてそうでなければ実施可能となる正常および変異配列に基づいて、いざれかのプレセニリン変異を実際に検出する制限マッピング分析を行うことができる。

(4) PCRマッピング

別の一連の実施態様において、一塩基置換変異を、異なるPCR産物の長さまたはPCRにおける産生に基づいて検出することができる。従って、変異部位にまたがる、あるいは好ましくは変異部位に3'末端を有するプライマーを使用して、被験体からのゲノムDNA、mRNA、またはcDNAのサンプルを増幅することができる。変異部位におけるミスマッチは、ポリメラーゼ反応を促進し、それにより、正常な被験体と、ヘテロ接合および/またはホモ接合のプレセニリン変異体との間で異なる産物プロフィールが得られる、正常プライマーまたは変異プライマーの能力を変更することができる。正常遺伝子および変異遺伝子のPCR産物は、異なって分離され、ポリアクリルアミドまたはアガロースゲル電気泳動、および標識プローブ、エチジウムプロミド等を用いた可視化のような標準的な技術によって検出できる。変異部位の可能な非特異的プライミングまたは読み通しのため、ならびに変異対立遺伝子の保因者のほとんどがヘテロ接合であるとの事実のため、この技術の効果は低いかもしれない。

10

(5) 電気泳動移動度

DNA配列差異に基づく遺伝子テストはまた、ゲルにおけるDNA、mRNA、またはcDNAの断片の電気泳動移動度の変化の検出によって達成することができる。例えば、小さな配列の欠失および挿入は、一本鎖または二本鎖のDNAの高分解能ゲル電気泳動によって、あるいは非変性ゲル電気泳動におけるDNAヘテロ二重鎖の移動パターンの変化として可視化することができる。プレセニリン変異体または多型はまた、mRNAまたは一本鎖DNAの二次構造に関連した一本鎖コンフォメーション多型（SSCP）による移動度シフトを利用する方法によって検出することができる。

20

(6) ミスマッチの化学的切断

プレセニリンの変異はまた、ミスマッチの化学的切断（CCM）方法を使用することによって検出できる（例えば、SaleebaおよびCotton, 1993, およびその中の引用文献を参照のこと）。この技術では、プローブ（約1 kbまで）は、被験体から得たゲノムDNA、cDNA、またはmRNAのサンプルと混合され得る。サンプルおよびプローブを混合し、そして（もしあれば）ヘテロ二重鎖の形成を可能とする条件に付す。好ましくは、プローブおよびサンプル核酸は共に二本鎖であるか、あるいはプローブおよびサンプルと一緒にPCR増幅して、全ての可能なミスマッチヘテロ二重鎖の生成を確実にし得る。ミスマッチT残基は四酸化オスミウムに対して反応性であり、ミスマッチC残基はヒドロキシルアミンに対して反応性である。各ミスマッチAにはミスマッチTが伴い、そして各ミスマッチGにはミスマッチCが伴うので、プローブとサンプルとの間の任意のヌクレオチド差異（小さい挿入または欠失を含む）は、少なくとも1つの反応性ヘテロ二重鎖の形成に至る。いざれかのミスマッチ部位を修飾するための四酸化オスミウムおよび/またはヒドロキシルアミンでの処理の後、混合物を、例えば、ペリジンとの反応によっていざれかの修飾されたミスマッチ部位での化学的切断に付す。次いで、混合物をゲル電気泳動のような標準的な技術によって分析して、プローブとサンプルとの間のミスマッチを示す切断産物を検出し得る。

30

(7) 他の方法

本明細書中で開示され、そしてそうでなければ実施可能なプレセニリン配列に基づいて、プレセニリン変異を検出する種々の他の方法は、当業者に明らかである。これらのいざれも本発明に従って使用され得る。これらは、限定されるものではないが、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ（S1またはリガーゼ媒介）、連結PCR、変性グラジエントゲル電気泳動（DGGE；例えば、FischerおよびLerman, 1983を参照のこと）、SSCPと組み合わせた制

40

50

限エンドヌクレアーゼフィンガープリンティング (REF-SSCP; 例えば、LiuおよびSommer, 1995を参照のこと) 等を含む。

D. 他のスクリーニングおよび診断剤

遺伝の場合には、一次事象として、および非遺伝の場合には病気状態による二次事象として、PS1、PS2、APP、またはPS1、PS2、もしくはAPPと反応するタンパク質の異常プロセシングが起こる。これは、身体組織または体液 (例えば、CSFまたは血液) における異常なリン酸化、グリコシル化、グリケーション、アミド化またはタンパク質分解の切断産物として検出され得る。

診断はまた、プレセニリン転写、翻訳、および翻訳後修飾およびプロセシングの変化、ならびに脳および末梢細胞におけるプレセニリン遺伝子産物の細胞内および細胞外のトラフィッキングにおける変化の観察によって行うことができる。このような変化は、プレセニリンのメッセンジャーRNAおよび/またはタンパク質の量の変化、リン酸化状態の変化、異常な細胞内位置/分布、異常な細胞外分布等を含む。このようなアッセイは、(プレセニリン特異的および非特異的ヌクレオチドプローブを用いる) ノーザンプロット、(グリコシル化およびリン酸化のイソ形態を含む種々の翻訳後修飾状態を含む、プレセニリンまたはプレセニリンの機能的ドメインに対して特異的に惹起した抗体を用いる) ウェスタンプロットおよび酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) を含む。これらのアッセイは、末梢組織 (例えば、血液細胞、血漿、培養または他の線維芽細胞組織等)、ならびに生前または死後に得られたCNS組織のバイオプシー、および脳脊髄液で行うことができる。このようなアッセイはまた、(メッセンジャーRNAおよびタンパク質を、特定の細胞により小さい (subcellular) 区画および/または神経線維の絡みおよびアミロイド斑などのこれらの疾患に関連した神経病理学構造体内で局在化するための) インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学を含む。

E. スクリーニングおよび診断キット

本発明によれば、前記の診断スクリーニングに必要な試薬を含む診断キットもまた提供される。例えば、1つ以上の変異エピトープに対して特異的な抗体または抗体の組を含むキットが提供され得る。これらの抗体は、特に、結合の可視化を容易にするいずれかの標準的な手段によって標識できる。あるいは、前記のように、オリゴヌクレオチドプローブまたはPCRプライマーが、変異のPS1、PS2または他のプレセニリン関連ヌクレオチド配列の検出および/または増幅のために存在するキットが提供され得る。さらに、このようなプローブは、特異的なハイブリダイゼーションの、より容易な検出のために標識することができる。前記の種々の診断の実施態様に最適なものとして、このようなキットにおけるオリゴヌクレオチドプローブまたは抗体は基材に固定化され、そして適切なコントロールを提供し得る。

10. 治療の方法

本発明は、今や、プレセニリンの変異によって引き起こされるか、あるいは引き起こされ得る疾患における治療的介入のための基礎を提供する。前記にて詳細に記載したように、hPS1およびhPS2遺伝子における変異は、初期発症型のアルツハイマー病の発症と関連付けられてきた。従って、本発明は、特に、アルツハイマー病と診断されたか、あるいはその発症の危険がある被験体の処置に指向する。しかしながら、種々の組織におけるPS1およびPS2遺伝子の発現を考慮すると、これらの遺伝子座における変異の効果は、脳には限定されず、従って、アルツハイマー病に加えて、障害の原因となり得るようである。従って、本発明はまた、プレセニリン遺伝子および遺伝子産物における変異、誤った発現、誤った代謝あるいは他の遺伝的または後天的な変化から生じ得る、他の組織における疾患発現に指向する。加えて、アルツハイマー病は神経学的障害として発現するが、この発現はプレセニリンにおける変異によって引き起こされ得るのであり、これはまず他の器官組織 (例えば、肝臓) に影響し、次いで、脳の活性に影響する因子を放出し、最後にはアルツハイマー病を引き起こす。よって、後記の種々の治療を考慮して、このような治療は、PS1および/またはPS2はまた、発現される、心臓、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および膵臓などの脳以外の組織で標的化され得ることが理解される。

10

20

30

40

50

本発明のいずれかの特定の理論に拘束されることなく、プレセニリンにおけるアルツハイマー病関連の変異の影響は、新規機能の獲得、または正常機能の加速であるようであり、これは、脳におけるアミロイド前駆体タンパク質（APP）のAペプチドへの異常なプロセシング、異常なリン酸化ホメオスタシス、および／または異常なアポトーシスを直接的または間接的に引き起こす。このような機能の獲得または機能的モデルの加速は、徵候の成人発症およびアルツハイマー病の優性遺伝と一致する。それにもかかわらず、プレセニリンにおける変異が、これらの結果を引き起こし得るメカニズムは依然不明である。

APPは、2つの経路のいずれかを介して代謝され得ることが知られている。第1に、APPは、ゴルジネットワークの通過により、次いで、クラスリン被覆小胞を介する分泌経路に代謝される。次いで、成熟APPは原形質膜まで通過し、そこで、-セクレターゼによって切断されて、可溶性画分（プロテアーゼNexin II）+非アミロイド原性C末端ペプチドを生じる（Selkoeら, 1995; Gandyら, 1993）。あるいは、成熟APPをエンドソーム-リソーム経路に向けることができ、そこでは、-および-セクレターゼの切断を受けて、Aペプチドを生成する。APPのAペプチド誘導体は神経毒性である（Selkoeら, 1994）。細胞のリン酸化状態は、-セクレターゼ（非アミロイド原性）またはA経路（アミロイド原性経路）の間の相対的バランスを決定し（Gandyら, 1993）、ホルボールエステル、ムスカリン様アゴニストおよび他の薬剤によって薬理学的に改変され得る。細胞のリン酸化状態は、ゴルジネットワークにおける1つ以上の細胞膜内膜タンパク質に作用するサイトゾル因子（特に、プロテインキナーゼC）によって媒介されるようである。

本発明のいずれかの特定の理論に拘束されることなく、プレセニリン、特に（プロテインキナーゼCのいくつかのリン酸化コンセンサス配列を有する）hPS1またはhPS2は、そのリン酸化状態が-セクレターゼとA経路との間の相対的なバランスを決定する細胞膜内膜タンパク質で有り得る。従って、PS1またはPS2遺伝子における変異は、それらの産物の構造および機能の改変を引き起こし、これは調節エレメント（例えば、プロテインキナーゼC）またはAPPとの欠陥相互作用に至り、これにより、APPがアミロイド原性のエンドソーム-リソーム経路に向けられるのを促進し得る。環境因子（例えば、ウイルス、トキシン、または老化）もまた、PS1またはPS2に対して同様の効果を有し得る。

さらに、本発明のいずれかの特定の理論に拘束されることなく、PS1およびPS2タンパク質は共に、ヒトイオンチャネルタンパク質および受容体に対して実質的なアミノ酸配列相同意を有することにも注意されたい。例えば、Altschulら（1990）のBLASTP例を用いて、PS2タンパク質はヒトナトリウムチャネル-サブユニットに対する実質的な相同意（E = 0.18、P = 0.16、同一性 = 22 - 27%（少なくとも35アミノ酸残基の2つの領域にわたる））を示す。他の疾患（例えば、ヒトにおける悪性高体温および高カリウム血性周期性麻痺、ならびに*C.elegans*における機械的感知ニューロンの変性）は、イオンチャネルまたは受容体タンパク質における変異を通じて生じる。従って、PS1またはPS2遺伝子の変異は、同様な機能に影響し得、そしてアルツハイマー病および／または他の精神医学的および神経学的疾患に至る。

ADなどのプレセニリン関連疾患を処置するための治療は、以下に基づくことができる：（1）正常なPS1またはPS2のタンパク質の投与、（2）変異遺伝子を補うかまたはそれを置換するための正常なPS1またはPS2の遺伝子での遺伝子療法、（3）変異遺伝子を「ノックアウトする」、変異したPS1またはPS2の遺伝子に対するアンチセンス配列に基づく遺伝子療法、（4）PS1またはPS2の変異の有害効果をブロックまたは矯正するタンパク質をコードする配列に基づく遺伝子療法、（5）正常および／または変異なPS1またはPS2のタンパク質に対する抗体に基づく免疫療法、あるいは（6）PS1またはPS2の発現を変更させ、変形形態のPS1またはPS2と他のタンパク質またはリガンドとの間の異常な相互作用をブロックするか、あるいはそうでなければ変異タンパク質の構造を変化させること、それらの代謝クリアランスを増強すること、あるいはそれらの機能を阻害することによって変異PS1またはPS2タンパク質の異常な機能をブロックする低分子（薬物）。

A. タンパク質療法

プレセニリン関連のアルツハイマー病、またはプレセニリン変異に起因する他の障害の処

10

20

30

40

50

置は、変異タンパク質を正常なタンパク質で置き換えること、変異タンパク質の機能を調節すること、あるいは過剰の正常タンパク質を提供して変異タンパク質のいずれかの異常な機能の効果を低下させることによって行うことができる。

これを達成するために、本明細書に記載されそして実施可能なように、このタンパク質を発現し得る培養細胞系からの大量の実質的に純粋なPS1タンパク質またはPS2タンパク質を得ることが必要である。次いで、タンパク質の患部脳領域または他の組織への送達は、例えば、標的細胞へのリポソーム媒介タンパク質送達を含む適切なパッケージングまたは投与系を用いて達成することができる。

B. 遺伝子療法

1連の実施態様において、PS1遺伝子またはPS2遺伝子の正常コピーを患者に導入して、1つ以上の異なる患部細胞型において正常なタンパク質を首尾よくコードする遺伝子療法が使用できる。遺伝子は、それが取り込まれ、効果的な機能を提供するのに、十分なタンパク質をコードし得る形態でそのような細胞に送達されなければならない。従って、組換え遺伝子は、強力なプロモーターに作動可能に連結され、その結果、変異タンパク質を補うかまたはそれ以上に競合する高レベル発現を提供するのが好ましい。前記のように、組換え構築物は、内因性または外因性の調節エレメント、誘導性または抑制性の調節エレメント、あるいは組織特異的な調節エレメントを含有し得る。

別の1連の実施態様において、遺伝子療法を用いて、組換え構築物による相同組換えにより変異遺伝子を置換することができる。組換え構築物は、標的化プレセニリン遺伝子の正常コピーを含有することができ、この場合、欠陥はインサイチュで矯正されるか、あるいは変異遺伝子の機能をなくす停止コドン、ミスセンス変異、または欠失を導入する「ノックアウト」構築物を含有することができる。この点に関して、このような構築物は、ヘテロ接合個体における標的化プレセニリンの正常および変異コピーの両方をノックアウトすることができるが、プレセニリン遺伝子機能の全喪失は、疾患状態の継続した進行よりも個体に対して有害性が低いであろうことに注意すべきである。

別の1連の実施態樹において、アンチセンス遺伝子療法を使用することができる。アンチセンス療法は、遺伝子発現の配列特異的抑制がmRNAまたはDNAと相補的アンチセンス種との間の細胞内ハイブリダイゼーションによって達成できるという事実に基づく。次いで、ハイブリッド二重鎖の形成は、遺伝子の転写および/または標的プレセニリンmRNAのプロセシング、輸送、翻訳および/または安定性を妨害し得る。アンチセンスストラテジーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドアナログ（例えば、ホスホロチオエート骨格を持つアナログ）の投与、およびアンチセンスRNA発現ベクターでのトランスフェクションを含む種々のアプローチが使用できる。さらに、このようなベクターは、外因性または内因性の調節エレメント、誘導性または抑制性の調節エレメント、あるいは組織特異的調節エレメントを含むことができる。

別の1連の実施態様において、遺伝子療法を用いて、変異プレセニリン遺伝子によって引き起こされる異常な機能を阻止するか、またはそうでなければ矯正するタンパク質またはペプチドをコードする組換え構築物を導入することができる。1つの実施態様において、組換え遺伝子は、別の細胞タンパク質または他の細胞リガンドと異常に相互作用することが判明しているプレセニリンの変異ドメインに対応するペプチドをコードし得る。従って、例えば、もし変異TM6 7ドメインが特定の細胞タンパク質と相互作用するが、対応する正常TM6 7ドメインがこの相互作用を受けないことが見出されているならば、遺伝子療法を用いて、変異タンパク質と競合でき、そして異常な相互作用を阻害または阻止できる過剰の変異TM6 7ドメインを提供することができる。あるいは、変異プレセニリンと相互作用するが、正常プレセニリンとは相互作用しないタンパク質の部分をコードし、組換え構築物により発現させて、異常な相互作用と競合させ、それにより、それを阻害または阻止することができる。最後に、別の実施態様において、同一の効果が、変異トランスジーンの挿入によってC.elegansにおける「Deg 1 (d)」および「Mec 4 (d)」の変異の修正と同様のアプローチにおける遺伝子療法によって第2の変異タンパク質を挿入することにより獲得され得る。

10

20

30

40

50

特に感染ならびに安定な組込みおよび発現の高効率のために、レトロウイルスベクターが、体細胞の遺伝子療法で使用することができる。しかしながら、標的化細胞を分け得なければならず、そしてこの疾患は優性のものであるので、正常タンパク質の発現レベルを高くすべきである。全長のPS1またはPS2遺伝子、プレセニリンの機能的ドメインをコードするサブ配列、または前記の他の治療ペプチドのいずれかをレトロウイルスベクターにクローン化し、そして内因性プロモーター、レトロウイルスの長末端反復、または目的の標的細胞型（例えば、ニューロン）に特異的なプロモーターから駆動することができる。使用することができる他のウイルスベクターは、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、またはエプスタインバールウイルスなどのヘルペスウイルスを含む。

10

C. 免疫療法

免疫療法はまた、アルツハイマー病に可能である。抗体を変異PS1またはPS2タンパク質（またはその部分）に対して惹起させ、そして患者に投与して、変異タンパク質に結合するか、またはそれを阻止して、その有害効果を妨げる。同時に、正常なタンパク質産物の発現を刺激することができる。あるいは、変異または野生型のPS1またはPS2とそれらの相互作用パートナーとの間の特異的複合体に対して抗体を惹起させる。

さらなるアプローチは、所望の抗原に対する内因性の抗体産生を刺激することである。投与は、1回の免疫原性調製物またはワクチン免疫化の形態であり得る。免疫原性組成物は、注射剤、液状溶液またはエマルジョンとして調製され得る。PS1またはPS2タンパク質あるいは他の抗原を、タンパク質に適合する薬学的に受容可能な賦形剤と混合することができる。このような賦形剤は、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せを含み得る。免疫原性組成物およびワクチンは、さらに、乳化剤またはアジュバントなどの補助物質を含有し、有効性を増強させることができる。免疫原性組成物およびワクチンは、皮下注射または筋肉内注射によって、非経口的に投与することができる。

20

免疫原性調製物およびワクチンは、治療的に有効で、保護的でかつ免疫原性となるような量で投与される。用量は、投与経路に依存し、そして宿主のサイズに応じて変化する。

D. 低分子療法

本明細書中で記載されそして実施可能となるように、本発明は、アルツハイマー病、またはプレセニリンにおける変異によって引き起こされた他の障害の処置で有用であり得る低分子または他の化合物を同定する多数の方法を提供する。従って、例えば、本発明は、プレセニリン結合性タンパク質を同定する方法、特に、変異プレセニリンに結合するか、またはそうでなければそれと相互作用するが、正常なプレセニリンとはそうはならないタンパク質または他の細胞成分を同定する方法を提供する。本発明はまた、変異プレセニリンとこのようなタンパク質または他の細胞成分との間の異常な相互作用を破壊するのに使用できる低分子を同定する方法を提供する。

30

正常なプレセニリンではなく変異プレセニリンを関するこのような相互作用は、プレセニリンの変異によって乱され、そしてアルツハイマー病の原因となる生化学経路を理解するのに有用な情報を提供するのみならず、疾患の病因学における介入のための中間的な治療標的を提供する。これらのタンパク質を同定し、そしてこれらの相互作用を分析することによって、相互作用に逆作用するか、またはそれを妨げる化合物についてスクリーニングして、それを設計することが可能であり、従って、異常な相互作用のための可能な処置を提供する。これらの処置は、これらのパートナーによるプレセニリンの相互作用を変化させるか、相互作用するタンパク質の機能を変化させるか、相互作用パートナーの量または組織分布あるいは発現を変化させるか、またはプレセニリン自体の同様の特性を変化させる。

40

療法は、これらの相互作用を調節し、従って、アルツハイマー病ならびにPS1遺伝子またはPS2遺伝子あるいはそれらの遺伝子産物の後天的または遺伝的な異常性に関連する他の状態を調節するように設計することができる。これらの療法の潜在的な効率は、PS1遺伝子、PS2遺伝子または他のプレセニリンホモログの機能的ドメインに対応する合成ペプチ

50

ドまたは組換えタンパク質を用い、親和性 (K_d および V_{max} 等) の標準的な薬物動態学測定によって、治療剤への暴露後のこれらの相互作用の親和性および機能を分析することによってテストできる。親水性ループなどの機能的ドメインを含む任意の相互作用の効果をアッセイする別の方はは、治療剤の存在下および非存在下におけるインサイチュハイブリダイゼーション、免疫組織化学、ウェスタンプロットティングおよび代謝パルス - チェイス標識実験によって、関連遺伝子の細胞内移動および翻訳後修飾の変化をモニターすることである。さらなる方法は、(i) APPおよびその産物の細胞内代謝、移動および標的化の変化；(ii) セカンドメッセンジャー事象、例えば、cAMP細胞内 Ca^{2+} 、プロテインキナーゼ活性等の変化を含む「下流」事象の効果をモニターすることである。

前記のように、プレセニリンは、APP代謝に関与し得、そしてプレセニリンのリン酸化状態は、-セクレターゼとAPPプロセシングのA経路との間のバランスに対して重要であり得る。本発明の形質転換細胞および動物モデルを用いると、これらの経路およびプレセニリン変異で起こる異常事象をよく理解できる。この知識を用いて、次いで、プレセニリン変異の有害効果に逆作用する治療ストラテジーを設計することができる。

アルツハイマー病を処置するためには、例えば、PS1および / またはPS2のリン酸化状態を、プロテインキナーゼCおよび他のプロテインキナーゼの活性を変化させるか、またはプロテインホスファターゼの活性を変化させるか、あるいは翻訳後に修飾されるPS1の利用性を改変する化学剤および生化学剤（例えば、薬物、ペプチドおよび他の化合物）によって変化させることができる。キナーゼおよびホスファターゼとプレセニリンタンパク質との相互作用、およびプレセニリンタンパク質とゴルジネットワーク内のAPPのトラフィッキングに関する他のタンパク質との相互作用を調節して、ゴルジ小胞のエンドソーム - リソソーム経路へのトラフィッキングを低下させ、それにより、Aペプチド産生を阻害することができる。このような化合物は、APP、PS1、PS2のペプチドアナログおよび他のプレセニリンホモログ、ならびに他の相互作用するタンパク質、脂質、糖、およびPS1、PS2および / またはそれらのホモログの異なるグリコシル化を促進する薬剤；プレセニリンmRNAまたはタンパク質の生物学的半減期を変化させる薬剤（抗体およびアントセンスオリゴヌクレオチドを含む）；ならびにPS1および / またはPS2の転写に作用する薬剤を含む。これらの薬剤の細胞株および動物全体における効果は、PS1および / またはPS2の転写、翻訳および翻訳後修飾（例えば、リン酸化またはグリコシル化）、ならびに種々の細胞内および細胞より小さい区画を介するPS1および / またはPS2の細胞内移動をモニターすることによってモニターできる。これらの実験のための方法は、ウェスタンおよびノーザンプロット、放射性メチオニンおよびATPでの代謝標識（パルス - チェイス）後の免疫沈降、および免疫組織化学を含む。これらの薬剤の効果はまた、プロテインキナーゼC、APP、PS1、PS2、または他のプレセニリンホモログに対する抗体を用いる標準的な結合親和性アッセイまたは共沈殿およびウェスタンプロットのいずれかを用いて、プロテインキナーゼCおよび / またはAPPとの相互作用に関するPS1および / またはPS2タンパク質の相対的結合親和性および相対量を調べる実験を用いてモニターすることができる。これらの薬剤の効果はまた、予想される治療剤への暴露の前後に、ELISAによってAペプチドの生産を評価することによってモニターすることができる（例えば、Huangら, 1993を参照のこと）。この効果はまた、アルツハイマー病において神経毒性であると考えられているアルミニウム塩および / またはAペプチドへの暴露の後に細胞株の生存率を評価することによってモニターすることができる。最後に、これらの薬剤の効果は、APPおよび / またはそれらのプレセニリンホモログにおいて正常な遺伝子型を有するか、（変異を含むまたは含まない）ヒトAPPトランスジーンを有するか、（変異を含むまたは含まない）ヒトプレセニリントランスジーンを有するか、またはこれらのいずれかの組合せを有する動物の認識機能を評価することによってモニターすることができる。

同様に、前記のように、プレセニリンは、受容体またはイオンチャネルとして Ca^{2+} の調節に関与し得る。プレセニリンのこの役割はまた、本発明の形質転換細胞株および動物モデルを用いて調べることができる。これらの結果に基づいて、アルツハイマー病についてテストを行い、プレセニリン遺伝子およびそれらの産物、または相同遺伝子およびそれら

10

20

30

40

50

の産物において後天的または遺伝的な異常性に関連する異常な受容体または異常なイオンチャンネル機能を検出することができる。このテストは、細胞内カルシウムまたは膜貫通電位に感受性のパッチクランプ、電位クランプおよび蛍光色素を用いて、イオンチャンネルフラックスおよび/または膜貫通電位または電流フラックスを測定することによって、インピボまたはインピトロのいずれかで達成することができる。欠陥イオンチャンネルまたは受容体機能はまた、環状AMP、cGMPチロシンキナーゼ、ホスファターゼなどのセカンドメッセンジャーの活性化、細胞内Ca²⁺レベルの増加等の測定によって評価することができる。また、組換えにより作成されたタンパク質はまた、人工膜系において再構成され、イオンチャンネルコンダクタンスを調べることができる。(PS1遺伝子またはPS2遺伝子における後天的/遺伝的欠陥のため; APPにおける変異などのこの疾患に至る他の経路における欠陥のため; および環境薬剤のために)アルツハイマー病に影響する療法を、プレセニリン遺伝子における変異によって誘導された異常なイオンチャンネルまたは受容体機能を修飾するそれらの能力の分析によってテストすることができる。療法はまた、プレセニリンタンパク質のイオンチャンネルまたは受容体の能力の正常な機能を改変するそれらの能力によってテストすることができる。このようなアッセイは、内因性の正常または変異PS1遺伝子/遺伝子産物あるいはPS2遺伝子/遺伝子産物を発現する培養細胞で行うことができる。このような研究はまた、正常または変異形態の、プレセニリンの1つ、またはプレセニリンの1つの機能的なドメインを発現し得るベクターでトランスフェクトした細胞で行うことができる。アルツハイマー病に対する療法は、PS1遺伝子またはPS2遺伝子の異常なイオンチャンネルまたは受容体機能を改変するように工夫し得る。このような療法は、通常の薬物、ペプチド、糖、または脂質、ならびに抗体、あるいはPS1またはPS2の遺伝子産物の特性に影響する他のリガンドであり得る。このような療法はまた、遺伝子療法によって、PS1遺伝子および/またはPS2遺伝子の直接的な置換によって実施され得る。イオンチャンネルの場合、遺伝子療法は、プレセニリン遺伝子の一部またはすべてのゲノムDNA配列を有する、ミニ遺伝子(cDNA + プロモーター)またはゲノム構造物のいずれかを用いて行うことができる。また、*C.elegans*においてMec4およびDeg1の置換について最近行われたように(HuangおよびChalfie, 1994)、変異プレセニリンまたはホモログの遺伝子配列はまた、プレセニリン遺伝子の遺伝的または後天的な異常性の結果に対抗するために用いることができる。この療法はまた、PS2遺伝子などの1つのホモログの受容体またはイオンチャンネルの機能を増大させるのに指向し、その結果、別のホモログの変異形態(例えば、後天的または遺伝的な欠陥により欠陥とされたPS1遺伝子)の機能を潜在的に受け継ぐようにできる。正常なPS1またはPS2遺伝子を用いる遺伝子置換を施した、変異PS1遺伝子または変異PS2遺伝子の発現を阻止するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる療法はまた、遺伝子療法またはタンパク質置換療法のいずれかの標準的な技術を用いて適用することができる。

実施例

実施例1 最小共分離領域の遺伝的、物理的「コンティグ(contig)」および転写マップの開発

遺伝連鎖研究ならびに付加的マーカーで使用される12 SSRマーカー遺伝子座の各々についてのオリゴヌクレオチドプローブを用いて、CEPH MegaYACおよびRPCI PACヒト全ゲノムDNAライブラリーを、染色体14q24.3のAD3領域からのゲノムDNAフラグメントを含有するクローニングについてサーチした(Albertsenら, 1990; Chumakovら, 1992; Ioannuら, 1994)。各マーカー間の遺伝子マップ距離をコンティグ上方に描き、そしてそれは公表されたデータ(NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992; Wang, 1992; Weissenbachら, 1992; Gyapayら, 1994)から得られる。4つの独立した方法を用い、最初のマーカー遺伝子座の各々について回収されたクローニングを、部分的にオーバーラップするクローニング(「コンティグ」)の順序立てたシリーズに並べた。最初に、逆PCR(Rileyら, 1990)によってYACインサートの末端を表す配列を単離し、そしてオーバーラップする配列を有する他のYACクローニングを同定するために、最初の遺伝子座の全てについて回収されたYACクローニングの全て由来のDNAの制限消化物を含有するサザンプロットパネルにハイブリダイズした。2番目に、Alu

間PCRを各YACにおいて行い、それオーバーラップする配列を有する他のクローンを同定するために、得られたバンドパターンを、回収されたYACクローンのプールを交差して比較した (Bellamne-Chartelotら, 1992; Chumakovら, 1992)。3番目に、Alu-PCRフィンガープリティングの特異性を改善するために、YAC DNAをHaeIIIまたはRsaIで制限酵素処理し、制限産物をAluおよびL1Hの両コンセンサスプライマーで増幅し、そしてこの産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって回収した。最後に、さらなるSTSが、転写された配列についてのサーチの間に生じたので、これらのSTSをまた用いてオーバーラップを同定した。得られたコンティグは、D14S53を有するYAC932C7と、D14S61を有するYAC746B4との間の単一の不連続性を除いて完全であった。コンティグ内のSTSの物理的マップ順序は、この領域についての遺伝連鎖マップと大いに一致していた (NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992; WangおよびWeber, 1992; Weissenbachら, 1992; Gyapayら, 1994)。しかし、遺伝子マップに関してのように、D14S43/D14S71クラスターおよびD14S76/D14S273クラスター内の遺伝子座の相対的順序を明確に決定するのは不可能であった。PAC1クローンは、D14S277がD14S268に対してテロメリック (telomeric) であることを示唆し、他方、遺伝子マップは逆の順序を示唆した。さらに、最も貧弱なコンセンサス物理的マップに基づき、かつ遺伝子マップから、STSを含有することが予測される少なくとも1つのYACクローンにおいて、数個のSTSプローブは、ハイブリダイゼーションパターンを検出することができなかった。例えば、D14S268 (AFM265) およびRSCAT7 STSはYAC788H12には存在しなかった。これらの結果は再現性があり、かついくつかの異なるSTSマーカーで起こったので、これらの結果は、おそらく、YACクローンの1つの内の小さな隙間の欠失の存在を反映する。

実施例2 染色体14q24.3マーカーについての累積的2-点ロッド (lod) スコア

各マイクロサテライト遺伝子座 (Weissenbachら, 1992; Gyapayら, 1994) について特異的なプライマー配列を用い、以前に記載されたように (St. George-Hyslopら, 1992)、全ての利用可能な罹患したまたは罹患していない家系メンバーの100ngのゲノムDNAから、PCRによって、各多型マイクロサテライトマーカー遺伝子座での遺伝子型を決定した。同一人種集団からの配偶者および他の神経学的に正常な被験体を用い、各対立遺伝子の正常集団頻度を決定したが、混成の白色人種集団について確立されたものと有意に異ならなかった (Weissenbachら, 1992; Gyapayら, 1994)。最大尤度計算により、発症年齢の修正 (age of onset correction)、混成の白色人種被験体の公表されたシリーズから得られたマーカー対立遺伝子頻度、および以前に記載されたような (St. George-Hyslopら, 1992)、1:1000のAD3変異についての見積もられた対立遺伝子頻度が推定された。同等なマーカー対立遺伝子頻度、および以前に記載された罹患した家系メンバーのみからの表現型情報を用い、分析を反復して、最大尤度計算で使用した見積もられたパメータにおける不正確さが、分析を誤らせないことを確実とした (St. George-Hyslopら, 1992)。これらの補足的分析は、連鎖を支持する証拠または組換え事象の発見のいずれかを有意に変更しなかった。

実施例3 FADにおいてAD3を有する隣接マーカー分離体間のハプロタイプ

14の早期発症FAD家系 (家系NIH2、MGH1、Torl.1、FAD4、FAD1、MEX1、およびFAD2)において、AD3とともに分離する染色体14の親のコピー上のセントロメリック (centromeric) およびテロメリック隣接マーカー間の拡張されたハプロタイプは、家系特異的ロッドスコア $> +3.00$ を示し、D14S258およびD14S53の間に少なくとも1つのマーカーを有する。同様の人種集団起源のいくつかの家系において分離する染色体を有する疾患の2つの領域で、同一の部分的ハプロタイプが観察された。領域Aにおいて、共有される対立遺伝子が、D14S268 (「B」；対立遺伝子サイズ = 126bp、正常白色人種における対立遺伝子頻度 = 0.04；「C」；サイズ = 124bp、頻度 = 0.38)；D14S277 (「B」；サイズ = 156bp、頻度 = 0.19、「C」；サイズ = 154bp、頻度 = 0.33)；およびRSCAT6 (「D」；サイズ = 111bp、頻度 0.25；「E」；サイズ = 109bp、頻度 = 0.20；「F」；サイズ = 107bp、頻度 = 0.47)で観察される。領域Bにおいては、同一サイズの対立遺伝子が、D14S43 (「A」；サイズ = 193bp、頻度 = 0.01；「D」；サイズ = 187bp、頻度 = 0.12；「E」；サイズ = 185bp、

頻度 = 0.26 ; 「 1 」 : サイズ = 160bp、頻度 = 0.38) ; D14S273 (「 3 」 : サイズ = 193bp、頻度 = 0.38 ; 「 4 」 サイズ = 191bp、頻度 = 0.16 ; 「 5 」 : サイズ = 189bp、頻度 = 0.34 ; 「 6 」 : サイズ = 187bp、頻度 = 0.02) およびD14S76 (「 1 」 : サイズ = bp、頻度 = 0.01 ; 「 5 」 : サイズ = bp、頻度 = 0.38 ; 「 6 」 : サイズ = bp、頻度 = 0.07 ; 「 9 」 : サイズ = bp、頻度 = 0.38) で観察される。詳細については、Sherringtonら、(1995)を参照のこと。

実施例 4 AD3インターバルからの転写配列の回収

直接的ハイブリダイゼーション方法を用い、AD3インターバルにコードされた推定転写配列を回収した。ここでは、ヒト脳mRNAから生じた短いcDNAフラグメントを、固定化したクローン化ゲノムDNAフラグメントにハイブリダイズさせた (Rommensら, 1993)。得られた短い推定転写配列をプローブとして用いて、ヒト脳cDNAライブラリーから、より長い転写物を回収した (Stratagene, La Jolla)。元の短いクローンの物理的位置、および引き続いて獲得されたより長いcDNAクローンの物理的位置を、コンティグ内の個々のYACクローンから単離したEcoRI消化した全DNAサンプルのパネルを含有するサザンプロットにプローブをハイブリダイズさせることによって生じたハイブリダイゼーションパターンの分析によって確立した。自動サイクル配列決定 (Applied Biosystems Inc., CA) によって、より長いcDNAクローンの各々のヌクレオチド配列を決定し、そしてblast (blast) アルゴリズム (Altschulら, 1990) を用いて、ヌクレオチドおよびタンパク質データベースにおける他の配列と比較した。転写された配列についての受託番号は : L40391、L40392、L40393、L40394、L40395、L40396、L40397、L40398、L40399、L40400、L40401、L40402、およびL40403である。

実施例 5 制限酵素を用いるPS1遺伝子における変異の位置決定

95 × 20秒、60 × 20秒、72 × 5秒の30サイクルにて、100ngのゲノムDNA鑄型、2mM MgCl₂、10ピコモルの各プライマー、0.5UのTaqポリメラーゼ、250 μM dNTPを用いて、84bpのゲノムエクソンフラグメントを増幅するために、配列番号 1 のbp907～925に本質的に対応する末端標識プライマー、および配列番号 1 のbp1010～990の相補物に対応する非標識プライマーを用いるPCRによって、DdeI制限部位を生じるA246E変異の存在を、ゲノムDNAにおいてアッセイした。製造業者のプロトコルに従って、産物を過剰のDdeIと共に2時間インキュベートし、そして得られた制限フラグメントを6%非変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、そしてオートラジオグラフィーで可視化した。DdeI制限部位の存在による84bpフラグメントの切断から、変異の存在が推定された。FAD1家系の全ての罹患したメンバー、および数人の危険な状態のメンバーは、DdeI部位を保有していた。真性逸脱者（疾患にかかっていない個体、年齢 > 70歳）のいずれも、そして正常コントロールのいずれも、DdeI変異を保有していなかった。

実施例 6 対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを用いるPS1遺伝子における変異の位置決定

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを用い、C410Y変異の存在をアッセイした。2.5mM MgCl₂を除く上記反応条件、および94 × 20秒、58 × 20秒、および72 10秒のサイクル条件を用い、配列番号 1 のbp1451～1468に対応するエクソン配列プライマー、および配列番号14のbp719～699と相補的な反対のイントロン配列プライマーを用いて、100ngのゲノムDNAを増幅した。得られた216bpゲノムフラグメントを、0.4M NaOH、25mM EDTA中の10倍希釈によって変性し、そして二連のナイロン膜に真空スロット - プロットした。（配列番号 1 のbp1468～1486に対応する）末端標識「野生型」プライマー、および（1477位におけるG A 置換を有する以外は同一配列に対応する）末端標識「変異」プライマーを、48にて、5 × SSC、5 × デンハルト、0.5% SDS中にて、スロット - プロットフィルターの別々のコピーに1時間ハイブリダイズさせ、次いで、23にて2 × SSC中で、そして50にて2 × SSC、0.1% SDS中で連続的に洗浄し、次いで、X - 線フィルムに感光させた。AD3およびNIH2家系の全てのテスト可能な罹患したメンバーならびに数人の危険な状態のメンバーは、C410Y変異を保有していた。SSCPによりC410Y変異を検出しようとする試みにより、共通のイントロン配列多型が同一SSCPパターンで移動することが明らかにされた。

実施例 7 種々の組織におけるPS1タンパク質mRNAの発現を示すノーザンハイブリダイゼーション

CsCl精製のような標準的な手法を用い、外科的病理学から得られた種々の組織サンプル（心臓、脳、および胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および脾臓の異なる領域を含む）から、全細胞質RNAを単離した。次いで、RNAをホルムアルデヒドゲルにおいて電気泳動して、サイズ分画を行った。ニトロセルロース膜を調製し、次いで、RNAを膜に移した。³²P-標識cDNAプローブを調製し、そしてプローブとRNAとの間のハイブリダイゼーションが起こるように膜に添加した。洗浄した後、膜をプラスチックフィルム中に包み、そしてX-線フィルムを含有するイメージングカセットに入れた。次いで、オートラジオグラフィーを行って、1～数日間現像した。標準的なRNAマーカーとの比較によって、サイズ分類を確立した。オートラジオグラフィーの解析により、3.0kbのサイズにおいて顕著なバンドが明らかになった（Sherringtonら、1995の図2を参照のこと）。これらのノーザンプロットは、PS1遺伝子が調べた組織の全てで発現されることを示した。

実施例 8 真核生物および原核生物発現ベクター系

真核生物および原核生物発現系で使用するのに適した構築物を、PS1ヌクレオチドcDNA配列インサートの3つの異なるクラスを用いて作製した。第1のクラス（全長構築物という）においては、全PS1 cDNA配列を、正しい方向で発現プラスミドに挿入し、これは、天然の5'UTRおよび3'UTRの両配列ならびに全オープンリーディングフレームを含んだ。このオープンリーディングフレームはヌクレオチド配列カセットを有し、このヌクレオチド配列カセットは、野生型オープンリーディングフレームが発現系に含まれることを可能とするか、あるいは、単一または二重変異の組合せをオープンリーディングフレームに挿入することができる。これは、酵素NarIおよびPfImlを用いて野生型オープンリーディングフレームから制限フラグメントを除去し、そして逆転写酵素PCRによって生じた類似のフラグメントでそれを置き換える、そしてM146L変異またはH163R変異のいずれかをコードするヌクレオチド配列を保有させることによって達成された。酵素PfImlおよびNcoIでの切断によって、オープンリーディングフレームについての野生型正常ヌクレオチド配列から第2の制限フラグメントを除去し、そしてA246E変異、A260V変異、A285V変異、L286V変異、L392V変異、またはC410Y変異をコードするヌクレオチド配列を有する制限フラグメントで置き換えた。タンデムに、M146LまたはH163R変異のいずれかと、残りの変異のうちの1つの組合せを有する第3の変異体を、前者の変異の1つを有するNarI-PfImlフラグメント、および後者の変異の1つを有するPfIml-NcoIフラグメントを連結することによって作製した。

全長野生型または変異cDNA配列から5'UTR、および3'UTR配列の一部を除去することによって、第2のクラス（短縮型構築物という）のcDNAインサートを構築した。5'UTR配列を、KpnI制限部位（GGTAC/C）および小配列（GCCACC）を含有する合成オリゴヌクレオチドで置き換えて、PS1 ORFの始まり（配列番号1のbp249～267）のATG付近にKozak開始部位を作製した。3'UTRを、5'末端に人工EcoRI部位を有する配列番号1のbp2568～2586の相補物に対応するオリゴヌクレオチドで置き換えた。次いで、上記の変異配列を、上記のNarI-PfImlおよびPfIml-NcoI部位に挿入することによって、この構築物の変異体を作製した。

第3のクラスの構築物は、クローンcc44由来の配列を含み、これは、エクソン4のオルタナティブスプライスの結果、N末端の4残基の削除が起こったものであった（配列番号3）。

真核生物発現については、制限消化によってSV60プロモーターカセットを除去し、そしてpcDNA3のCMVプロモーターエレメント（Invitrogen）で置き換えた発現ベクターpZeoSV中に、上記の野生型および変異配列を有するこれらの種々のcDNA構築物をクローン化した。原核生物発現については、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）融合ベクターpGE-X-kgを用いて、構築物が作製されている。GST融合ヌクレオチド配列に付着させたインサートは、正常のオープンリーディングフレームヌクレオチド配列を有するか、または上記の単一および二重変異の組合せを有する上記の同ヌクレオチド配列である。これらのGS

10

20

30

40

50

T融合構築物は、変異または野生型GST融合タンパク質として原核細胞系における部分的または全長のタンパク質の発現を可能とし、従って、全長タンパク質の精製、続くトロンビン消化によるGST融合産物の除去を可能とする。GST融合ベクターを用いて、さらなるcDNA構築物を作製して、野生型ヌクレオチド配列として、またはA285V変異、L286V変異、もしくはL392V変異のいずれかを有する変異配列として、全長タンパク質のTM6とTM7との間の親水性酸性ループドメインに対応するアミノ酸配列の產生を可能とする。これは、5' Bam HI制限部位 (G/GATCC) を有する配列番号1のbp1044～1061に対応する5'オリゴヌクレオチドプライマー、および5' EcoRI制限部位 (G/AATTC) を有する配列番号1のbp1476～1458の相補物に対応する3'プライマーを用い、適切なRNAの供給源から野生型または変異配列を回復させることによって達成された。これは、pGEX-KGベクター内のBamHIおよびEcoRI部位における親水性酸性ループドメインに対応する適切な変異または野生型ヌクレオチド配列のクローニングを可能とした。

実施例9 PS1遺伝子におけるさらなる変異の位置決定

PS1遺伝子における変異は、成熟mRNA / cDNA配列またはゲノムDNAを表すRT-PCR産物を用い、種々のストラテジー（直接的ヌクレオチド配列決定、対立遺伝子特異的オリゴ、連結ポリメラーゼ連鎖反応、SSCP、RFLP）によってアッセイされ得る。A260VおよびA285V変異については、このエクソンを有するゲノムDNAを、L286V変異と同一のPCRプライマーおよび方法を用いて増幅し得る。

次いで、PCR産物を変性し、そしてC410Y変異について記載したスロットプロットプロトコルを用い、二連のナイロン膜にスロットプロットした。

48におけるハイブリダイゼーション、続く0.1%SDSを含有する3×SSC緩衝液中での52における洗浄によって、野生型配列（配列番号1のbp1017～1036）または変異配列（bp1027にC Tを有するbp1017～1036）に対応する末端標識対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを用いて、A260V変異をこれらのプロットにおいて得点付けた。代わりに、48において野生型配列（配列番号1のbp1093～1111）または変異プライマー（bp1102にC Tを有する配列番号1のbp1093～1111）に対する対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを用いる以外は上記のように、続いて、洗浄溶液が2×SSCである以外は上記のように52で洗浄することにより、A285V変異を、これらのスロットプロットにおいて得点付けた。

マグネシウム濃度が2mMであり、かつサイクル条件が94 × 10秒、56 × 20秒、および72 × 10秒である以外は標準的なPCR緩衝液条件を用い、プライマー（配列番号14のbp439～456に対応する5'、および配列番号14の719～699に相補的な3'）を用い、ゲノムDNAからのエクソンの増幅によって、L392V変異を得点付けた。C410Y変異について記載したように、得られた200塩基対ゲノムフラグメントを変性し、そして二連でナイロン膜にスロットプロットした。次いで、変異の存在または非存在を、45におけるハイブリダイゼーション、次いで23における2×SSCおよび次いで68における2×SSC中での連続的な洗浄によって、野生型末端標識オリゴヌクレオチド（配列番号1のbp1413～1431）または末端標識変異プライマー（bp1422にC Gを有する配列番号1のbp1413～1431）のいずれかへの差別的なハイブリダイゼーションによって得点付けた。

実施例10 抗体產生

PS1タンパク質の一部に対応するペプチド抗原を固相技術によって合成し、そして逆相高圧液体クロマトグラフィーによって精製した。プレセニリンフラグメントのペプチドC末端におけるシステイン残基の添加によって可能になったジスルフィド結合を介して、ペプチドをキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に共有結合させた。このさらなる残基は、タンパク質配列が正常ではないと思われ、そしてKLH分子への結合を容易にするために含まれたにすぎない。抗体が惹起された特異的プレセニリン配列は以下の通りである：

ポリクローナル抗体# hPS1抗原（配列番号：2）

1142 30～44

519 109～123

520 304～318

10

20

30

40

50

1143

346 ~ 360

これらの配列は、PS1タンパク質の特異的ドメイン内に含まれる。例えば、残基30 ~ 44はN末端内にあり、残基109 ~ 123はTM1 2 ループ内にあり、そして残基304 ~ 318および346 ~ 360は大きなTM6 7 ループ内にある。これらのドメインの各々は、水性媒体に暴露され、そして疾患表現型の発生に重要な他のタンパク質への結合に関与し得る。ペプチドの選択は、IBI Pustell抗原性予測アルゴリズムを用いるタンパク質配列の分析に基づくものであった。

合計 3 匹のニュージーランド白ウサギを、フロイントのアジュバントと組み合わせて各ペプチド抗原についてのペプチド-KLH複合体で免疫化し、続いて、7 日間隔でブースター注射した。抗血清を各ペプチドについて収集し、そしてプールし、そして硫酸アンモニウムを用いてIgGを沈殿させた。次いで、抗体を、適切なペプチドにカップリングさせたスルホ-連結アガロース (Pierce) でアフィニティー精製した。この最終精製は、免疫前または免疫後のいずれかの血清中に存在する他の抗体の非特異的相互作用を除去するのに必要である。

各抗体の特異性を、3 つのテストで確認した。第 1 に、各々は、脳ホモゲネートのウェスタンプロットにおいてプレセニリン - 1 について予測されたおよそのサイズの単一の支配的バンドを検出した。第 2 に、各々は、適切な配列を有する組換え融合タンパク質と交差反応した。第 3 に、各々は、組換えPS1または免疫化ペプチドでの予備吸着によって特異的にブロックされ得た。

さらに、2 つの異なるPS1ペプチドグルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を用いて、PS1抗体を作製した。最初の融合タンパク質は、GSTに融合したPS1のアミノ酸1 ~ 81 (N末端) を含んでいた。第 2 の融合タンパク質は、GSTに融合したPS1のアミノ酸266 ~ 410 (TM6 7 ループドメイン) を含んでいた。これらの融合タンパク質をコードする構築物を、pGEX-2T発現プラスミド (Amrad) 中に適切なヌクレオチド配列を挿入することによって作製した。得られた構築物は、GSTをコードする配列、ならびにGSTとPS1ペプチドとの間のトロンビン感受性切断のための部位を含んでいた。発現構築物を、DH5 a *E.coli* にトランスフェクトし、そして融合タンパク質の発現を、IPTGを用いて誘導した。細菌ペレットを溶解させ、そしてグルタチオンセファロースビーズ (Boehringer-Mannheim, Montreal) における単一工程アフィニティークロマトグラフィーによって、可溶性GST - 融合タンパク質を精製した。標準的な手順を用い、このGST - 融合タンパク質を用いて、マウスを免疫化して、モノクローナル抗体を作製した。これらのマウスから得られたクローンを、精製されたプレセニリンフラグメントを用いてスクリーニングした。

さらに、GST - 融合タンパク質をトロンビンで切断して、PS1ペプチドを遊離させた。遊離されたペプチドをサイズ排除HPLC によって精製し、そしてこれを用いて、ポリクローナル抗血清の作製のためにウサギを免疫化した。

同様の方法によって、プレセニリン - 2 のアミノ酸1 ~ 87 (N末端) 、または272 ~ 390 (TM6 TM7ループ) のためのヌクレオチド配列を含む構築物を用い、GST融合タンパク質を作製し、そしてこれを用いてこのタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製した。PS2 - GST融合タンパク質もまたトロンビンで切断し、そしてこの遊離され、精製されたペプチドを用いて、ウサギを免疫化して、ポリクローナル抗血清を調製した。

実施例11 PS2遺伝子における変異の同定

888bp産物については、配列番号18のbp478 ~ 496に対応する5'プライマー、および配列番号18のbp1366 ~ 1348と相補的な3'プライマーを有する第1のオリゴヌクレオチドプライマー対、そして826bp産物については、配列番号18のbp1083 ~ 1102に対応する5'プライマーおよび配列番号18のbp1909 ~ 1892と相補的な3'プライマーを有する第2のプライマー対を用い、PS2 ORFに対応するRT-PCR産物を、リンパ芽球または凍結した死後脳組織のRNAから生成した。250mMolのdNTP、2.5mM MgCl₂、10pMolのオリゴヌクレオチドを用いて、10 mlで、94 °C × 20秒、58 °C × 20秒、72 °C × 45秒の40サイクルでサイクルさせるPCRを行った。自動サイクル配列決定 (ABI, Foster City, CA) によってPCR産物を配列決定し、蛍光クロマトグラムを、直接的観察によって、およびFactura (バージョン1.2.0) およびSequen

10

20

30

40

50

ce Navigator (バージョン1.0.1b15) ソフトウェアパッケージによって、ヘテロ接合ヌクレオチド置換についてスキャンした (データは示さず)。

N141I変異の検出: ヌクレオチド787におけるA T置換は、BcII制限部位を生じさせる。この変異を有するエクソンを、配列番号18のbp733～751 (末端標識) に対応するオリゴヌクレオチド、および配列番号18のbp846～829の相補物の各10pMol、ならびにM239V変異について下記するものと同様のPCR反応条件を用い、100ngのゲノムDNAから増幅した。製造業者のプロトコルに従い、BcII (NEBL, Beverly, MA) を用いて2mlのPCR産物を10mlの反応容量中で制限酵素処理し、そしてこの産物を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。野生型配列を有する被験体においては、114bpのPCR産物を、68bpおよび46bpのフラグメントに切断する。変異配列は、産物を、53bp、46bp、および15bpに切断させる。

M239V変異の検出: ヌクレオチド1080におけるA G置換は、NlaIII制限部位を欠失させ、配列番号18のbp1009～1026に対応するオリゴヌクレオチド、および配列番号18のbp1118～1101の相補物の各10pMolを用いる100ngのゲノムDNAからの増幅によって、M239V変異の存在の検出を可能にする。PCR条件は: 0.5U Taqポリメラーゼ、250mM dNTP、1mCi ³²P-dCTP、1.5mM MgCl₂、10ml容量; 94 × 30秒、58 × 20秒、72 × 20秒の30サイクルであり、110bp産物を生成した。2mlのPCR反応物を10mlに希釈し、そして3UのNlaIII (NEBL, Beverly, MA) で3時間制限酵素処理した。非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって制限産物を分離し、そしてオートラジオグラフィーにより可視化させた。正常被験体は、55、35、15、および6bpの切断産物を示し、他方、変異配列は、55、50、および6bpのフラグメントを与える。

I420T変異の検出: 上記の手順と同様に、配列番号18のbp1576～1593に対応するプライマー、および配列番号18のbp1721～1701の相補物を用いるゲノムDNAのPCR増幅によって、I420T変異をスクリーニングして、146塩基対産物を生成し得る。次いで、この産物を、野生型配列 (例えば、配列番号18のbp1616～1632)、および変異配列 (例えば、bp1624においてT C置換を有する配列番号18のbp1616～1632) について、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドでプロープし得る。

実施例12 トランスジェニックマウス

トランスジェニックマウスの調製において用いるために、一連の野生型および変異PS1およびPS2遺伝子を構築した。PS1およびPS2の変異バージョンを、標準的な技術を用いて、クローニングcDNA cc33 (PS1) およびcc32 (PS2) の部位特異的変異誘発によって作製した。

cDNA cc33およびcc32、ならびにそれらの変異バージョンを用いて、実施例8に記載のように、変異および野生型PS1およびPS2 cDNAの2つのクラスを調製した。第1のクラス (「全長」cDNAという) を、EcoRI (PS1) またはPvuII (PS2) での消化によって、ポリA部位の直前の3' 非翻訳領域のほぼ200bpを除去することによって調製した。第2のクラス (「短縮型」cDNAという) を、ATG開始コドンの5'側に隣接して配置したリボソーム結合部位 (Kozakコンセンサス配列) で5' 非翻訳領域を置き換えることによって調製した。

上記のように調製した種々の全長および短縮型の野生型および変異PS1およびPS2 cDNAを、以下の1つ以上のベクターに導入し、そして得られた構築物を、トランスジェニックマウスの作製のための遺伝子の供給源として使用した。

cos.TET発現ベクター: このベクターは、SyrianハムスターPrP遺伝子を含有するコスミドクローニングに由来した。これは、Scottら (1992) およびHsiaoら (1995) によって詳細に記載されている。PS1およびPS2 cDNA (全長または短縮型) を、このベクターにSalI部位で挿入した。最終構築物は、挿入されたcDNAに隣接する20kbの5' 配列を含む。この5' 隣接配列は、PrP遺伝子プロモーター、50bpのPrP遺伝子5' 非翻訳領域エクソン、スプライスドナー部位、1kbイントロン、およびSalI部位 (この中にPS1またはPS2 cDNAが挿入された) に丁度隣接して位置するスプライスアクセプター部位を含む。挿入されたcDNAに隣接する3' 配列は、ポリアデニル化シグナルを含むPrP3' 非翻訳領域のほぼ8kbセグメントを含む。NotI (PS1) またはFseI (PS2) でのこの構築物の消化は、PrPプロモーターの制

10

20

30

40

50

御下にある変異または野生型PS遺伝子を含有するフラグメントを遊離した。遊離されたフラグメントをゲル精製し、そしてHsiaoら (1995) の方法を用い、受精したマウス卵の生殖核に注入した。

血小板由来成長因子レセプター - サブユニット構築物：ヒト血小板由来成長因子レセプター - サブユニットプロモーターの3'末端において、SalI (全長PS1 cDNA) またはHindIII (短縮型PS1 cDNA、全長PS2 cDNA、および短縮型PS2 cDNA) の間にPS cDNAをまた挿入し、そしてSV40ポリA配列の5'末端におけるEcoRI部位および全カセットを、pZeoSVベクター (Invitrogen, San Diego, CA) にクローン化した。ScaI/BamHI消化によって遊離されたフラグメントをゲル精製し、そしてHsiaoら (1995) の方法を用い、受精したマウス卵の生殖核に注入した。

ヒト - アクチン構築物：PS1およびPS2 cDNAを、pBAcGHのSalI部位に挿入した。この挿入によって生じた構築物は、3.4kbのヒト アクチン5'隣接配列 (ヒト アクチンプロモーター、スプライシングされた78bpのヒト アクチン5'非翻訳エクソンおよびイントロン)、およびPS1またはPS2インサート、続いて、いくつかのイントロンおよびエクソンを含有する2.2kbのヒト成長ホルモンゲノム配列、ならびにポリアデニル化シグナルを含む。SfiIを用いて、PS-含有フラグメントを遊離させ、これをゲル精製し、そしてHsiaoら (1995) の方法を用い、受精したマウス卵の生殖核に注入した。

ホスホグリセレートキナーゼ構築物：PS1およびPS2 cDNAをpkJ90ベクターに導入した。このcDNAを、ヒトホスホグリセレートキナーゼプロモーターの下流のKpnI部位と、ヒトホスホグリセレートキナーゼ遺伝子の3'非翻訳領域の上流のXbaI部位との間に挿入した。PvuII/HindIII (PS1 cDNA) またはPvuII (PS2 cDNA) 消化を用いて、PS-含有フラグメントを遊離させ、次いでこれをゲル精製し、そして上記のように受精したマウス卵の生殖核に注入した。

実施例13 真核生物細胞における組換えPS1およびPS2の発現

pcDNA3ベクター (Invitrogen, San Diego, CA) を用い、組換えPS1およびPS2を、種々の細胞型 (例えば、PC12、神経芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣、およびヒト胚性腎臓293細胞) で発現させた。このベクターに挿入されたPS1およびPS2 cDNAは、実施例8で記載されたものと同一の全長および短縮型cDNAであった。

これらのcDNAを、CMVプロモーターと、pcDNA3のウシ成長ホルモンポリアデニル化部位との間に挿入した。トランスジーンは高レベルで発現された。

さらに、PS1およびPS2を、pCMXベクターを用いてCOS細胞で発現した。ブレセニリンタンパク質の細胞内位置決定のタギングおよび追跡を容易にするために、ヒトc-myc抗原 (例えば、Evanら, 1985を参照のこと) に由来する11アミノ酸の配列をコードし、かつモノクローナル抗-myc抗体MYC 1-9E10.2 (Product CRL 1729, ATCC, Rockville, Md.) によって認識されるオリゴヌクレオチドを、PS1およびPS2 cDNAのオープンリーディングフレームの直前または直後のいずれかにインフレームで連結した。タグ化していないpCMX構築物もまた調製した。また、c-myc-タグ化構築物もまた、CHO細胞へのトランسفエクションのためにpcDNA3に導入した。

製造業者のプロトコルに従ってLipofectamine (Gibco/BRL) を用い、これらの構築物の一過性でかつ安定なトランسفエクションを達成している。48時間後、一過性発現について培養物をアッセイした。安定にトランسفエクトされた株を、0.5mg/mlゲネチシン (Geneticin) (Gibco/BRL) を用いて選択した。

上記の抗ブレセニリン抗体1142、519、および520を用いるウェスタンプロットによって、トランسفエクトしたPSタンパク質の発現をアッセイした。略言すれば、培養したトランسفエクト細胞を可溶化し (2% SDS、5mM EDTA、1mg/mlロイペプチドおよびアプロチニン)、そしてタンパク質濃度をLowryによって測定した。タンパク質をSDS-PAGEグリジエンタゲル (4 ~ 20% Novex) で分離し、そして一定のボルト数 (50V) にて2時間で、PVDF (10mM CAPS) に移した。非特異的結合をスキムミルク (5%) を用いて、1時間でブロッキングした。次いで、タンパク質を、2つのウサギポリクローナル抗体 (TBS、pH7.4中で約1mg/ml) を用いて12時間プローブした。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトア

10

20

30

40

50

ビジン (strepavidin)、第三級 4 - クロロ - ナフトール (naphthol)、および過酸化水素を用いて可視化したビオチン化ヤギ - 抗ウサギニ次抗体を用い、プレセニリン交差反応種を同定した。上記の両方の抗プレセニリン抗体を用い、c-myc- タグ化プレセニリンペプチドをウェスタンプロットによってアッセイし (プレセニリンペプチド抗原を検出するため)、そしてハイブリドーマMYC 1-9E10.2からの培養上清を、ウェスタンプロットに関して 1:10、および免疫細胞化学に関して 1:3 に希釈した (myc - エピトープを検出するため)。50 ~ 60kDa の免疫反応性の主要バンドを、種々のプレセニリン抗体の各々によって、および myc - エピトープ抗体によって (myc- 含有プラスミドでトランスフェクトした細胞株について) 同定した。約 10 ~ 19kDa および約 70kDa におけるマイナーなバンドを、いくつかのプレセニリン抗体によって検出した。

免疫細胞化学では、トランスフェクトした細胞を、Tris 緩衝化生理食塩水 (TBS) 中の 4 % ホルムアルデヒドで固定し、TBS+0.1% Triton で十分に洗浄し、そして非特異的結合を 3 % BSA でブロッキングした。固定した細胞を、プレセニリン抗体 (例えば、上記の抗体 520 および 1142; 代表的には 5 ~ 10mg/ml) でプローブし、洗浄し、そして FITC- または ローダミン - 結合ヤギ - 抗ウサギニ次抗体で可視化した。c-myc- タグ化プレセニリン構築物について、1 : 3 に希釈したハイブリドーマ MYC 1-9E10.2 上清を抗マウス 2 次抗体とともに用いた。スライドを、0.1% フェニレンジアミン (ICN) を含む 90% グリセロール中に封入し、蛍光を維持した。抗 BIP (または、抗カルネキシン (calnexin)) (StressGen, Victoria, B.C.) および 小麦胚芽凝集素 (EY Labs, San Mateo, CA) を、それぞれ、小胞体およびゴルジのマーカーとして使用した。二重 - 免疫標識をまた、ニューロン株 NSC34 において抗 アクチン (Sigma, St. Louis, Mo.)、抗アミロイド前駆体タンパク質 (22C11, Boehringer Mannheim)、および抗ニューロフィラメント (NF-M 特異的、Sigma) を用いて行った。これらの免疫蛍光研究は、トランスフェクション産物が、小胞体およびゴルジ装置を示唆する特に強い核周辺局在化 (これは、トランスフェクトしていない細胞で観察されるものと同様であるが、より強く、時々核膜に溢れ出る) とともに、細胞内に広く分布することを証明する。myc- タグ化プレセニリン構築物で一過的にトランスフェクトした CHO および COS 細胞で、c-myc および PS エピトープの同時免疫局所化が観察された。

従って、トランスフェクトした細胞におけるトランスフェクトしたプレセニリン遺伝子の強力な発現が、免疫細胞化学、ノーザンプロット、ウェスタンプロット (上記のプレセニリンに対する抗体を用い、そして 3' または 5' c-myc タグを含有する構築物における myc タグに対するモノクローナル抗体 MYC 1-9E10.2 を用いる) によって判明した。

実施例 14 アフィニティーコロマトグラフィーによるプレセニリン結合タンパク質の単離
プレセニリンの生化学的機能に関与し得るタンパク質を同定するために、PS1 - 結合タンパク質を、アフィニティーコロマトグラフィーを用いて単離した。実施例 8 に記載したように調製した PS1 TM6 7 ループを含有する GST - 融合タンパク質を用いて、生理食塩水中で、ポリトロンにより脳組織をホモゲナイズすることによって調製したヒト脳抽出物をプローブした。グルタチオン - セファロースビーズとのインキュベーションにより内因性 GST - 結合成分の脳ホモゲネートを予め清澄化することによって、非特異的結合を排除した。次いで、これらの GST を含まないホモゲネートを、GST-PS 融合タンパク質と共にインキュベートして、機能的結合タンパク質との所望の複合体を作製した。次いで、これらの複合体を、アフィニティーグルタチオン - セファロースビーズを用いて回収した。リン酸緩衝化生理食塩水で十分に洗浄した後に、SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE; Tris-tricin グラジエントゲル 4 ~ 20%) によって、単離したタンパク質の収集物を分離した。50 ~ 60kD の範囲のいくつかの弱いバンドに加えて、2 つの主要なバンドが、約 14kD および 20kD で観察された。

これらのタンパク質と TM6 7 ループとの間の相互作用の薬理学的変化は、アルツハイマー病の処置において使用され得る。さらに、おそらくプレセニリン生化学経路内で作用するこれらのタンパク質は、アルツハイマー病を引き起こす新規の変異部位であり得る。

実施例 15 2 - ハイブリッド酵母系によるプレセニリン結合タンパク質の単離

プレセニリンタンパク質と相互作用するタンパク質を同定するために、PS1 タンパク質の

残基266～409、またはPS2タンパク質の残基272～390のいずれかをコードするインフレームの部分的cDNA配列を、ベクターのEcoRIおよびBamHI部位に連結することによって、酵母発現プラスミドベクター(pAS2-1、Clontech)を作製した。得られた融合タンパク質は、PS1タンパク質のTM6 7ループ、またはPS2タンパク質のTM6 7ループのいずれかにインフレームで結合したGAL4 DNA結合ドメインを含有する。Clontech Matchmaker酵母2-ハイブリッドキット(Clontech)のプロトコルを用い、これらの発現プラスミドを、ヒト脳cDNA:pACTライブラリー由来の精製したプラスミドDNAと共に、酵母に同時形質転換した。TM6 7ループドメインと相互作用するヒト脳cDNAを有する酵母クローニングを、HIS抵抗性およびgal+活性化によって選択した。このクローニングを、シクロヘキサミド感受性によってさらに選択し、そしてヒト脳cDNAのインサートをPCRによって単離し、そして配列決定した。600万の最初の形質転換体のうち、200のポジティブクローニングが、HIS選択の後に得られ、そしてポジティブクローニングの選択についての製造業者のプロトコルに従って行ったgal+色選択の後には42のポジティブクローニングが得られた。これらの42のクローニングのうち、同一遺伝子を表すいくつか(5～8)の独立したクローニングが存在した。このことは、これらの相互作用が生物学的に実在し、かつ再現性があることを示す。

実施例16 トランスジェニックC.elegans

トランスジェニックC.elegansを、卵母細胞のマイクロインジェクションによって得た。ベクターpPD49.3 hsp16-41およびpPD49.78 hsp16-2をこの目的のために選択した。これらのベクターのうち最初のものを用い、正常hPS1遺伝子または変異体(L392V)を導入したトランスジェニックC.elegansを作製した。上記のヒトcDNAプローブcc32および抗体519、520、および1142を用い、ノーザンプロットまたはウェスタンプロットにおいてヒトcDNAの発現をアッセイすることによって、形質転換動物を検出した。シスニ重変異hPS1遺伝子(M146LおよびL392V)、正常hPS2遺伝子、および変異(N141I)hPS2遺伝子を有するベクターをまた調製し、そして/または注入した。

実施例17 DrosophilaプレセニリンホモログであるDmPSのクローニング

Trpで終わり/始まる(例えば、PS1における残基Trp247およびTrp404にて；PS2におけるTrp253およびTrp385にて)プレセニリン/sel-12タンパク質の高度に保存された領域の公表されたヌクレオチド配列データから、重複するオリゴヌクレオチド5' ctn ccn gar tgg acn gyc tgg(配列番号22)、および5' rca ngc(agt)at ngt ngt rtt cca(配列番号23)を設計した。これらのプライマーを、成体および胚のD.melanogaster由来のmRNAから、RT-PCR(50ml容量、2mM MgCl₂、94 × 30秒、57 × 20秒、72 × 20秒の30サイクル)のために用いた。次いで、94 × 1分、59 × 0.5分、および72 × 1分のサイクル条件および内部の保存された重複プライマー-5' ttt ttt ctc gag acn gcn car gar aga aay ga(配列番号24)、および5' ttt ttt gga tcc tar aa(agt)atr aar tcn cc(配列番号25)を用いて、生成物を再増幅した。約600bpの生成物を、pBSのBamHIおよびXbaI部位にクローニングした。これらの生成物を配列決定し、そしてこれは、ヒトプレセニリンのアミノ酸配列に高度に相同な推定アミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームを含有することが示された。次いで、このフラグメントを用いて、従来のD.melanogaster cDNA/Zaライブラリー(Stratagene, CA)をスクリーニングして、サイズ約2～2.5kbの6つの独立したcDNAクローニング(クローニングpds8、pds13、pds1、pds3、pds7、およびpds14)を回収し、これを配列決定した。最長のORFは、ヒトプレセニリンと52%の同一性を有する541アミノ酸のポリペプチドをコードする。

実施例18 A ペプチドの長いイソ型についてのアッセイ

PS1またはAPP₇₁₇変異を有するFAD；この病気の家族歴が知られていない散発性AD；他の成人発症神経変性性障害(HD=ハンチントン病；ALS=筋萎縮性側索硬化症)；ダウン症候群(DS)；および神経学的徵候のないコントロール被験体の組織病理学的に確認された症例の凍結した大脳皮質から、Aペプチドを99%ギ酸で60分間(20,000 × gで20分間遠心分離した後、上清をペレットから分離し、希釈し、中和し、そしてELISAによって調べた。Aの異なる種を定量するために、4つのモノクローナル抗体を使用した。抗体BNT-77(これは、Aの中央由来のエピトープを検出する)、および抗体

10

20

30

40

50

BAN-50 (これは、N末端残基を検出する)を最初に用いて、N末端短縮型を有するかまたは有さない (BNT-77)、あるいはN末端短縮型のみを有さない (BAN-50)、異種形態を含むA の全てのタイプに結合させた。次いで、残基40で終わる短いテールのA (抗体BA-27)または残基42/43で終わる長いテールのA (抗体BC-05)のいずれかを特異的に検出する2つのさらなるモノクローナル抗体を用いて、A の異なるC末端形態を区別した。以前に記載されているように (Tamaokaら, 1994; Suzukiら, 1994)、2部位ELISAを行った。略言すると、脳組織由来の100 μgの標準ペプチドまたは上清を、BNT-77抗体でコーティングしたマイクロプレートに適用し、4 ℃で24時間インキュベートし、リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、次いで、HRP-標識BA-27およびBC-05抗体と共に4 ℃で24時間インキュベートした。以前に記載されたように、TNBマイクロウェルペルオキシダーゼ系を用い、発色によってHRP活性をアッセイした。皮質A レベルを、対 (paired) Student t-検定を用いて診断群間を比較した。平均検定のStudent-Newman-Keuls多重比較を用いる、全てのA イソ型データの連合評価により、APP₇₁₇および散発性AD被験体からのA 1-42 レベルがPS1変異症例についてのものとは区別されるが、コントロールとは類似することが明らかになった。対照的に、A x-42レベルを考慮した場合、3つの群が区別可能であった：高 (PS1およびAPP₇₁₇AD)、中 (散発性AD) および低 (コントロール)。

詳細には、人生の40代および50代で発症する他の神経変性性疾患を有する5人の被験体を含む、14のコントロール被験体の大脳皮質における種々のA イソ型の濃度の測定は、短いテールのA (A 1-40: 0.06 ± 0.02nMol / グラム湿潤組織 ± SEM; A x-40: 0.17 ± 0.40) および長いテールのA (A 1-42/43: 0.35 ± 0.17; A x-42/43: 1.17 ± 0.80) の両方の低濃度のみを明らかにした。対照的に、長いテールのA ペプチドは、PS1変異を有する全ての4人の被験体の大脳皮質で有意に上昇していた (A 1-42/43: 6.54 ± 2.0, p=0.05; A x-42/43: 23.91 ± 4.00, p<0.01)。長いテールのA ペプチドの濃度における同様の増加が、APP₇₁₇変異を有する被験体 (A 1-42/43: 2.03 ± 1.04; A x-42/43: 25.15 ± 5.74) および散発性ADを有する被験体 (A 1-42/43: 1.21 ± 0.40, P=0.008; A x-42/43: 14.45 ± 2.81, P=0.001) の両方の皮質で検出された。PS1またはAPP₇₁₇変異を有する被験体においては、A の長いテールのイソ型におけるこの増加は、短いテールのA イソ型における小さいが有意でない増加を伴った (例えば、PS1変異体におけるA x-40: 3.08 ± 1.31; APP₇₁₇変異体における1.56 ± 0.07)。従って、短いイソ型に対する長いイソ型の比率も有意に増加した。しかし、散発性AD症例において、代表的には、長いテールのA において観察された増加は短いテールのA イソ型におけるかなり大きな増加を伴った (A 1-40: 3.92 ± 1.42; A x-40: 16.60 ± 5.88)。短いテールのA におけるこの増加は、コントロールと比較した場合に統計的に有意であった (A 1-40およびA x-40の両方についてp<0.03) が、PS1およびAPP₇₁₇症例と比較した場合は、ボーダーラインで統計的に有意であった (p<0.05)。ダウン症候群を有する成人被験体由来の皮質サンプルの分析は、散発性ADにおいて観察されたものと同様のパターンを示した。

本発明の好ましい実施態様を本明細書中に詳細に記載してきたが、本発明の精神または添付の請求の範囲の範囲を逸脱することなく、本発明に変形をもたらし得ることは、当業者に理解される。

表 1

エレメント	位置	エレメント	位置	
STAT1 (GAS)	34-46	611-619	CAT ボックス	895-900
	278-286	631-639		975-982
	431-439	1582-1590	TATA ボックス	925-933
	443-451	1965-1973		978-988
	495-503	2125-2133	TFIID	578-581
	533-541			982-985
STAT3	36-43	737-744	TRXN (CAP)	1002-1007
	124-131	811-898	開始	1038-1043
	429-436	1063-1070	GC ボックス (SP1)	1453-1460
	496-503	1686-1693		1454-1452
	533-540	1956-1973	AP2, AP2- 様	配列全体で
	537-544	2104-2111		多数出現
	632-639	2407-2414	NFILE	611-620 1567-1576
MED1, MED1- 様	1121-1126	1235-1240		890-899 1945-1954
	1126-1131	1716-1721		1062-1071

表 2

<u>PS1 ドメイン</u>	<u>およその位置</u>	
N 末端	1-81	
TM1	82-100	
TM1→2	101-132	
TM2	133-154	
TM2→3	155-163	
TM3	164-183	
TM3→4	184-194	40
TM4	195-212	
TM4→5	213-220	
TM5	221-238	
TM5→6	239-243	
TM6	244-262	
TM6→7	263-407	
TM7	408-428	
C 末端	429-467	

表 3

<u>PS2 ドメイン</u>	<u>およその位置</u>	
N 末端	1-87	
TM1	88-106	
TM1→2	107-134	
TM2	135-160	
TM2→3	161-169	
TM3	170-189	
TM3→4	190-200	10
TM4	201-218	
TM4→5	219-224	
TM5	225-244	
TM5→6	245-249	
TM6	250-268	
TM6→7	269-387	
TM7	388-409	
C 末端	410-448	

表 4

配列番号1 中の位置	ヌクレオチド 変化	アミノ酸 変化	機能的 ドメイン	FADの 発症年令
1. NA	NA	A79?	N 末端	64
2. 492	G→C	V82L	TM1	55
3. NA	NA	V96F	TM1	NA
4. 591	T→C	Y115H	TM1→2	37
5. 664	T→C	M139T	TM2	49
6. NA	NA	M139V	TM2	40
7. 676	T→C	I143T	TM2	35
8. 684	A→C	M146L	TM2	45
9. NA	NA	M146V	TM2	38
10. 736	A→G	H163R	TM2→3	50
11. NA	NA	H163Y	TM2→3	47
12. NA	NA	L171P	TM3	35
13. NA	NA	G209V	TM4	NA
14. NA	NA	I211T	TM4	NA
15. 939	G→A	A231T	TM5	52
16. 985	C→A	A246E	TM6	55
17. 1027	C→T	A260V	TM6	40
18. NA	NA	C263R	TM6→7	47
19. 1039	C→T	P264L	TM6→7	45
20. NA	NA	P267S	TM6→7	35
21. NA	NA	E280A	TM6→7	47
22. NA	NA	E280G	TM6→7	42
23. 1102	C→T	A285V	TM6→7	50
24. 1104	C→G	L286V	TM6→7	50
25. NA	欠失	Δ291-319	TM6→7	NA
26. 1399	G→C	G384A	TM6→7	35
27. 1422	C→G	L392V	TM6→7	25-40
28. 1477	G→A	C410Y	TM7	48

表 5

配列番号1 8 中の位置	ヌクレオチド 変化	アミノ酸 変化	機能的 ドメイン	FADの 発症年令
1. 787	A→T	N141I	TM2	50-65
2. 1080	A→G	M239V	TM5	50-70
3. 1624	T→C	I420T	C-	45

表 6

28-61	302-310
65-71	311-325
109-112	332-342
120-122	346-359
218-221	372-382
241-243	400-410
267-269	

10

表 7

25-45	282-290
50-63	310-314
70-75	321-338
114-120	345-352
127-132	380-390
162-167	430-435
221-226	

20

参考文献

Albertsen ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:4256-4260.

Altschul ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410.

Bellamne-Chartelot ら (1992) Cell 70:1059-1068.

Bergamini ら (1991) Acta Neurol. 13:534-538.

Brand および Perrimon (1993) Development 118:401-415.

Bueler ら (1996) Nature 356:577-582.

Campion ら (1995) Hum. Molec. Genet. 4:2373-2377.

Campos-Ortega および Jan (1991) Ann. Rev. Neurosci. 14:399. 10
カナダ国特許出願 第 2,096,911 号
カナダ国特許出願 第 2,071,105 号

Chartier-Harlin ら (1991) Nature 353:844-846.

Chumakov ら (1992) Nature 359:380-387.

Cruts ら (1995) Hum. Molec. Genet. 4:2363-2371.

Davis (1996) Physiol. Reviews (印刷中).

Evan ら (1985) Mol. Cell Biol. 5:3610-3616.

Fischer および Lerman (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80:1579-1583. 20
Foncin ら (1985) Rev. Neurol. (Paris) 141:194-202.

Frommelt ら (1991) Alzheimer Dis. Assoc. Disorders 5:36-43.

Games ら (1995) Nature 373:523-527.

Gandy ら (1993)

Gavrieli ら (1992) J. Cell Biol. 119:493-501.

Goate ら (1991) Nature 349:704-706.

Goudsmit ら (1981) J. Neurol. Sci. 49:79-87.

Gravina ら (1995) J. Biol. Chem. 270:7013-7016.

Gyapay ら (1994) Nature Genetics 7:246-339.

Hilbich ら (1991) J. Mol. Biol. 218:149-163. 30
Hogan ら (1986) Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
Cold Spring Harbor, New York.

Hsiao ら (1995) Neuron. (印刷中).

Huang および Chalfie (1994)

Huang ら (1993)

Ince および Scotto (1995) J. Biol. Chem. 270:30249-30252.

国際特許出願 第 WO 94/23049 号

国際特許出願 第 WO 94/00569 号 40
Ioannu ら (1994) Nature Genetics 6:84-89.

Iwatsubo ら (1995) Ann. Neurol. 37:294-299.

Jacobson ら (1993) Nature 361:365.

Kahn (1995) Science 270:369-370.

Karlinsky ら (1992) Neurology 42:1445-1453.

Katzman (1986) N. Engl. J. Med. 314:964-973.

Kollmar および Farnham (1993) Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 203:127-137.

Krause および Aaronson (1991) Methods in Enzymology, 200:546-556.

Kyte および Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157:105 10

Lamb ら (1993) Nature Genetics 5:22-29

Lassmann ら (1995) Acta Neuropathol. 89:35.

Levesque ら (1996) 印刷中.

Levitin および Greenwald (1995) Nature 377:351-354.

Liu および Sommer (1995) Biotechniques 18:470-477.

Martin ら (1995) NeuroReport (印刷中).

Mullan ら (1992) Nature Genetics 1:345-347.

Murrell ら (1991) Science 254:97-99.

Nee ら (1983) Am. Neurol. 40:203-208. 20

NIH/CEPH Collaborative Mapping Group (1992) Science 258:67-86.

Nowak (1995) Science 270:368-371.

Obermeir ら (1994) Embo J. 7:1585-1590.

Pericak-Vance ら (1988) Exp. Neurol. 102:271-279.

Phizicky および Fields (1994) Microbiol. Reviews 59:94-123.

Pike ら (1993) J. Neurosci. 13:1676-1678.

Podlisny ら (1995) J. Biol. Chem. 270:9564-9570.

Pollen (1993) Hannah's Heirs: The Quest for the Genetic Origins of Alzheimer's Disease, Oxford University Press, Oxford. 30

Querfurth ら (1995) Molec. Brain Res. 28:319-337.

Riley ら (1990) Nucl. Acid Res. 18:2887-2890.

Rogaev ら (1993) Neurology 43:2275-2279.

Rogaev ら (1995) Nature 376:775-778.

Rommens ら (1993) Hum. Molec. Genet. 2:901-907.

Saleeba および Cotton (1993) Methods in Enzymology 217:286-295.

Saunders ら (1993) Neurology 43:1467-1472/

Schellenberg ら (1993) Am. J. Hum. Genet. 53:619-628.

Schellenberg ら (1992) Science 258:668-670. 40

Scheuner ら (1995) Soc. Neurosci. Abstr. 21:1500.

Schindler および Darnell (1995) Annu. Rev. Biochem. 64:621-651.

Scott ら (1992)

Selkoe ら (1995)
 Selkoe ら (1994)
 Sherrington ら (1995) Nature 375:754-760.
 St. George-Hyslop ら (1990) Nature 347:194-197.
 St. George-Hyslop ら (1994) Science 263:537.
 Strittmatter ら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:1977-1981.
 Suzuki ら (1994) Science 264:1336-1340.
 Tamaoka ら (1994) J. Biol. Chem. 269:32721-32724.
 Tamaoka ら (1995) Brain Res. 679:151-156.
 米国特許 第 5,297,562 号
 Van Broeckhoven ら (1992) Nature Genetics 2:335-339.
 Vito ら (1996) Science 271:521-525.
 Wang (1992) Genomics 13: 532-536.
 Weissenbach ら (1992) Nature 359:794-798.
 Wong ら (1993) Neurosci. Lett. 152:96-98.
 Zheng ら (1995) Cell 81:525-531

配列表

(1) 一般的情報 :

(i) 出願人 :

(A) 名称 : エイチエスシー リサーチ アンド ディベロップメント リミテッド パートナーシップ

(B) 番地 : ユニバーシティ アベニュー 555

(C) 市 : トロント

(D) 州 : オンタリオ

(E) 国 : カナダ国

(F) 郵便番号 : M5G 1X8

(G) 電話 : (416) 813-5982

(H) テレファックス : (416) 813-5085

(A) 名称 : ザ ガバーニング カウンシル オブ ザ ユニバーシティ オブ トロント

(B) 番地 : キングス カレッジ サークル 27, シンコー ホール 106

(C) 市 : トロント

(D) 州 : オンタリオ

(E) 国 : カナダ国

(F) 郵便番号 : M5S 1A1

(G) 電話 : (416) 978-7461

(H) テレファックス : (416) 978-1878

(A) 名称 : セイント ジョージ-ヒスロップ, ピーター エイチ.

(B) 番地 : リッチビュ- アベニュー 210

(C) 市 : トロント

(D) 州 : オンタリオ

(E) 国 : カナダ国

(F) 郵便番号 : M5P 3G3

(A) 名称 : フレイザー, ポール イー.

(B) 番地 : ウィンダーメア アベニュー 611

(C) 市 : トロント

(D) 州 : オンタリオ

(E) 国 : カナダ国

10

20

30

40

50

(F) 郵便番号 : M6S 3L9

(A) 名称 : ロメンズ , ジョアンナ エム .

(B) 番地 : マックコール ストリート 105

(C) 市 : トロント

(D) 州 : オンタリオ

(E) 国 : カナダ国

(F) 郵便番号 : M5T 2XT

(iii) 発明の名称 : アルツハイマー病に関連する遺伝子配列およびタンパク質、ならびにその使用 10

(iii) 配列数 : 25

(iv) 連絡住所 :

(A) 名称 : シム アンド マックバーニー

(B) 番地 : ユニバーシティ アベニュー 330, 6 ティーエイチ フロア

(C) 市 : トロント

(D) 州 : オンタリオ

(E) 国 : カナダ国

(F) 郵便番号 : M5G 1R7

(v) コンピューター読み出し形態 :

(A) 媒体型 : フロッピー ディスク

(B) コンピューター : IBM PC互換用 20

(C) OS : PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア : パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.30

(vi) 現在の出願データ :

(A) 出願番号 : PCT/CA96/00263

(B) 出願日 : 1996年 4月29日

(C) 分類 :

(vii) 先願データ :

(A) 出願番号 : US 08/509,359

(B) 出願日 : 1995年 7月31日

(viii) 先願データ : 30

(A) 出願番号 : US 08/496,841

(B) 出願日 : 1995年 6月28日

(ix) 先願データ :

(A) 出願番号 : US 08/431,048

(B) 出願日 : 1995年 4月28日

(viii) 代理人 / 事務所情報 :

(A) 氏名 : ラエ , パトリシア エイ .

(C) 照会 / 記録番号 : 7425-16

(ix) 電話回線情報 :

(A) 電話 : (416) 595-1155 40

(B) テレファックス : (416) 595-1163

(2) 配列番号 1 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 2765 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : CDS

(B) 存在位置 : 249..1649 50

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..2675

(D) 他の情報 : / 注 = 「 hPS-1 」

(xi) 配列 : 配列番号 1 :

TGGGACAGGC AGCTCCGGGG TCCCGGGTTT CACATCGGAA ACAAAACAGC GGCTGGTCTG	60
GAAGGAACCT GAGCTACGAG CCGCGGCGGC AGCGGGGCGG CGGGGAAGCG TATACTTAAT	120
CTGGGAGCCT GCAAGTGACG ACAGCCTTTG CGGTCCCTTAG ACAGCTTGCG CTGGAGGAGA	180
ACACATGAAA GAAAGAACCT CAAGAGGCTT TGTTTCTGT GAAACAGTAT TTCTATACAG	240
TTGCTCCA ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA	290
Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala	
1 5 10	
CAG ATG TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT	338
Gln Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn	
15 20 25 30	
GAC AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC	386
Asp Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His	
35 40 45	
CCT GAG CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG	434
Pro Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val	
50 55 60	
GTG GAG CAA GAT GAG GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC	482
Val Glu Gln Asp Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly	
65 70 75	
GCC AAG CAT GTG ATC ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT CTC TGC ATG GTG	530
Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val	
80 85 90	

10

20

GTC GTC GTC GCT ACC ATT AAG TCA GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp 95 100 105 110	578
GGG CAG CTA ATC TAT ACC CCA TTC ACA GAA GAT ACC GAG ACT GTG GGC Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly 115 120 125	626
CAG AGA GCC CTG CAC TCA ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATC AGT GTC Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val 130 135 140	674
ATT GTT GTC ATG ACT ATC CTC CTG GTG TTG TAT AAA TAC AGG TGC Ile Val Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys 145 150 155	722
TAT AAG GTC ATC CAT GCC TGG CTT ATT ATA TCA TCT CTA TTG-TTG CTG Tyr Lys Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu 160 165 170	770
TTC TTT TTT TCA TTC ATT TAC TTG GGG GAA GTG TTT AAA ACC TAT AAC Phe Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn 175 180 185 190	818
GTT GCT GTG GAC TAC ATT ACT GTT GCA CTC CTG ATC TGG AAT TTT GGT Val Ala Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly 195 200 205	866
GTG GTG GGA ATG ATT TCC ATT CAC TGG AAA GGT CCA CTT CGA CTC CAG Val Val Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln 210 215 220	914
CAG GCA TAT CTC ATT ATG ATT AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTG TTT ATC Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile 225 230 235	962
AAG TAC CTC CCT GAA TGG ACT GCG TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser 240 245 250	1010
GTA TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCG AAA GGT CCA CTT CGT ATG Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 255 260 265 270	1058
CTG GTT GAA ACA GCT CAG GAG AGA AAT GAA ACG CTT TTT CCA GCT CTC Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu 275 280 285	1106
ATT TAC TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA GGA GAC Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp 290 295 300	1154
CCG GAA GCT CAA AGG AGA GTA TCC AAA AAT TCC AAG TAT AAT GCA GAA Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu 305 310 315	1202
AGC ACA GAA AGG GAG TCA CAA GAC ACT GTT GCA GAG AAT GAT GAT GGC Ser Thr Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly 320 325 330	1250
GGG TTC AGT GAG GAA TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT CTA GGG CCT Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro 335 340 345 350	1298
CAT CGC TCT ACA CCT GAG TCA CGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT TCC AGC His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser 355 360 365	1346
AGT ATC CTC GCT GGT GAA GAC CCA GAG GAA AGG GGA GTA AAA CTT GGA Ser Ile Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly 370 375 380	1394

TTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT GGT AAA GCC TCA GCA Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala 385 390 395	1442
ACA GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGT TTC GTA GCC ATA Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile 400 405 410	1490
TTA ATT GGT TTG TGC CTT ACA TTA TTA CTC CTT GCC ATT TTC AAG AAA Leu Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys 415 420 425 430	1538
GCA TTG CCA GCT CTT CCA ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTT GTT TTC TAC Ala Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr 435 440 445	1586
TTT GCC ACA GAT TAT CTT GTA CAG CCT TTT ATG GAC CAA TTA GCA TTC Phe Ala Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe 450 455 460	1634
CAT CAA TTT TAT ATC TAGCATATTT GCGGTTAGAA TCCCATGGAT GTTCTTCTT His Gln Phe Tyr Ile 465	1689
TGACTATAAC CAAATCTGGG GAGGACAAAG GTGATTTCC TGTGTCCACA TCTAACAAAG TCAAGATTCC CGGCTGGACT TTTGCAGCTT CCTTCCAACT CTTCTGACC ACCTTGCAC ATGGACTTT GGAAGGAGGT GCCTATAGAA AACGATTTG AACATACTTC ATCGCAGTGG ACTGTGTCCC TCGGTGCAGA AACTACCAGA TTTGAGGGAC GAGGTCAAGG AGATATGATA GGCCCGGAAG TTGCTGTGCC CCATCAGCAG CTTGACCGGT GGTACACAGGA CGATTTCACT GACACTGCGA ACTCTCAGGA CTACCGGTTA CCAAGAGGTT AGGTCAAGTG GTTAAACCA AACGGAACTC TTCACTTTAA ACTACACGTT GAAAATCAAC CCAATAATTTC TGTATTAAC GAATTCTGAA CTTTTCAGGA GGTACTGTGA GGAAGAGCAG GCACCCAGCAG CAGAATGGGG AATGGAGAGG TGGGCAGGGG TTCCAGCTTC CCTTTGATTT TTTGCTGCAG ACTCATCCTT TTTAAATGAG ACTTGTCTTC CCCTCTCTT GAGTCAGTC AAATATGTCAG ATTGCCTTG GCAATTCTTC TTCTCAAGCA CTGACACTCA TTACCGTCTG TGATTGCCAT TTCTTCCCAA GGCCAGTCTG AACCTGAGGT TGCTTTATCC TAAAAGTTT AACCTCAGGT TCCAAATTCA GTAAATTTTG GAAACAGTAC AGCTATTTCT CATCAATTCT CTATCATGTT GAAGTCAAAT TTGGATTTTC CACCAAATTCA TGAATTGTA GACATACTTG TACGCTCACT TGCCCCCAGA TGCCCTCTCT GTCCCTCATTC TTCTCTCCCA CACAAGCAGT CTTTTCTAC AGCCAGTAAG GCAGCTCTGT CTTGGTAGCA GATGGTCCCA TTATTCAGG GTCTTACTCT TTGTATGATG AAAAGAATGT GTTATGAATC GGTGCTGTCA GCCCTGCTGT CAGACCTTCT TCCACAGCAA ATGAGATGTA TGCCCAAAGC GGTAGAATTAA AAGAAGAGTA AAATGGCTGT TGAAGC	1749
(2) 配列番号 2 の情報 :	1809
(i) 配列の特徴 :	1869
(A) 長さ : 467 アミノ酸	1929
(B) 型 : アミノ酸	1989
(D) トポロジー : 直鎖状	2049
(ii) 配列の種類 : タンパク質	2109
(xi) 配列 : 配列番号 2 :	2169
	2229
	2289
	2349
	2409
	2469
	2529
	2589
	2649
	2709
	2765

(2) 配列番号 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 467 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 2 :

10

20

30

40

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met		
1 5 10 15		
Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn		
20 25 30		
Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu		
35 40 45		
Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu		
50 55 60		
Gln Asp Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys		
65 70 75 80		
His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val		
85 90 95		10
Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln		
100 105 110		
Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg		
115 120 125		
Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val		
130 135 140		
Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys		
145 150 155 160		
Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Phe Phe		
165 170 175		
Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala		
180 185 190		20
Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val		
195 200 205		
Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala		
210 215 220		
Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr		
225 230 235 240		
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr		
245 250 255		
Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val		
260 265 270		30
Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr		
275 280 285		
Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu		
290 295 300		
Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser Thr		
305 310 315 320		
Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly Phe		
325 330 335		
Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg		
340 345 350		
Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile		
355 360 365		40
Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly		
370 375 380		

Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala
 385 390 395 400
 Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile
 405 410 415
 Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu
 420 425 430
 Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala
 435 440 445
 Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln
 450 455 460

Phe Tyr Ile

465

10

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 3086 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : CDS
- (B) 存在位置 : 557..1945

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : misc_feature
- (B) 存在位置 : 1..3086
- (D) 他の情報 : /注 = 「hPS1-2」

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

GAATTCGGCA CGAGGGAAAT GCTGTTGCT CGAAGACGTC TCAGGGCGCA GGTGCCTTGG 60
 GCCGGGATTA GTAGCCGTCT GAACTGGAGT GGAGTAGGAG AAAGAGGAAG CGTCTTGGC 120
 TGGGTCTGCT TGAGCAACTG GTGAAACTCC GCGCCTCACG CCCCCGGGTGT GTCCCTGTCC 180
 AGGGGGGACCG AGCATTCTGG GCGAAGTCCG CACSCCTCTT GTTCGAGGCG GAAGACGGGG 240
 TCTGATSCTT TCTCCCTGGT CGGGMCTGTC TCGAGGCATG CATGTCCAGT GACTCTTGTG 300
 TTTGCTGCTG CTTCCCTCTC AGATTCTTCT CACCGTTGTG GTCAGCTCTG CTTTAGGCAT 360
 ATTAATCCAT AGTGGAGGCT GGGATGGGTG AGAGAATTGA GGTGACTTTT CCATAATTCA 420
 GACCTAATCT GGGAGCCTGC AAGTGACAAC AGCCTTTGCG GTCCTTAGAC AGCTTGGCCT 480
 GGAGGGAGAAC ACATGAAAAGA AAGAACCTCA AGAGGCTTTG TTTTCTGTGA AACAGTATTT 540
 CTATACAGTT GCTCCA ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC 589
 Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe
 1 5 10

CAG AAT GCA CAG ATG TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT AAT GAC 637
 Gln Asn Ala Gln Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Asn Asp
 15 20 25

AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC CCT 685
 Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro
 30 35 40

GAG CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG GTG 733
 Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val
 45 50 55

10

20

30

40

GAG CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC GCC Glu Gln Asp Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala 60 65 70 75	781
AAG CAT GTG ATC ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT CTC TGC ATG GTG GTG Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val 80 85 90	829
GTC GTG GCT ACC ATT AAG TCA GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT GGG Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly 95 100 105	877
CAG CTA ATC TAT ACC CCA TTC ACA GAA GAT ACC GAG ACT GTG GGC CAG Gin Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gin 110 115 120	925
AGA GCC CTG CAC TCA ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATC AGT GTC ATT Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile 125 130 135	973
GTT GTC ATG ACT ATC CTC CTG GTG GTT CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAT Val Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr 140 145 150 155	1021
AAG GTC ATC CAT GCC TGG CTT ATT ATA TCA TCT CTA TTG TTG CTG TTC Lys Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Phe 160 165 170	1069
TTT TTT TCA TTC ATT TAC TTG GGG GAA GTG TTT AAA ACC TAT AAC GTT Phe Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val 175 180 185	1117
GCT GTG GAC TAC ATT ACT GTT GCA CTC CTG ATC TGG AAT TTG GGT GTG Ala Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Leu Gly Val 190 195 200	1165
GTG GGA ATG ATT TCC ATT CAC TGG AAA GGT CCA CTT CGA CTC CAG CAG Val Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln 205 210 215	1213
GCA TAT CTC ATT ATG ATT AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTG TTT ATC AAG Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys 220 225 230 235	1261
TAC CTC CCT GAA TGG ACT GCG TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA GTA Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 240 245 250	1309
TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCG AAA GGT CCA CTT CGT ATG CTG Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu 255 260 265	1357
GTT GAA ACA GCT CAG GAG AGA AAT GAA ACG CTT TTT CCA GCT CTC ATT Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile 270 275 280	1405
TAC TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA GGA GAC CCG Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro 285 290 295	1453
GAA GCT CAA AGG AGA GTA TCC AAA AAT TCC AAG TAT AAT GCA GAA AGC Glu Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser 300 305 310 315	1501
ACA GAA AGG GAG TCA CAA GAC ACT GTT GCA GAG AAT GAT GAT GGC GGG Thr Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly 320 325 330	1549
TTC AGT GAG GAA TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT CTA GGG CCT CAT Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His 335 340 345	1597

CGC TCT ACA CCT GAG TCA CGA GCT GTC CAG GAA CTT TCC AGC AGT Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser 350 355 360	1645
ATC CTC GCT CGT GAA GAC CCA GAG GAA AGG GGA GTA AAA CTT GGA TTG Ile Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu 365 370 375	1693
GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT GGT AAA GCC TCA GCA ACA Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr 380 385 390 395	1741
GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGT TTC GTA GCC ATA TTA Ala Ser Gly Asp Thr Asn Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu 400 405 410	1789
ATT GGT TTG TGC CTT ACA TTA TTA CTC CTT GCC ATT TTC ARG AAA GCA Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala 415 420 425	1837
TTG CCA GCT CTT CCA ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTT GTT TTC TAC TTT Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe 430 435 440	1885
GCC ACA GAT TAT CTT GTA CAG CCT TTT ATG GAC CAA TTA GCA TTC CAT Ala Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His 445 450 455	1933
CAA TTT TAT ATC TAGCATATTG GCGGTTAGAA TCCCCATGGAT GTTTCTTCTT Gln Phe Tyr Ile 460	1985
TGACTATAAC CAAATCTGGG GAGGACAAAG GTGATTTCC TGTGTCCACA TCTAACAAAG 2045	20
TCAAGATTCC CGGCTGGACT TTTCAGCTT CCTTCCAAGT CTTCTGACC ACCTTGCCT 2105	
ATTGGACTTT GGAAGGGAGGT GCCTATAGAA AACGATTTG AACATACCTC ATCGCAGTGG 2165	
ACTGTGTCTT CGGTGCAGAA ACTACCAGAT TTGAGGGACG AGGTCAAGGA GATATGATAG 2225	
GCCCCGAAGT TGCTGTGCCCT CATCAGCAGC TTGACCGCTG GTCACAGGAC GATTTCACTG 2285	
ACACTGCGAA CTCTCAGGAC TACCGGTTAC CAAGAGGTTA GGTGAAGTGG TTTAAACCAA 2345	
ACGGAACCTCT TCATCTTAAA CTACACGTTG AAAATCAACC CAATAATTCT GTATTAACIG 2405	
AATTCTGAAC TTTTCAGGAG GTACTGTGAG GAAGAGCAGG CACCAGCAGC AGAATGGGGA 2465	
ATGGAGAGGT GGGCAGGGGT TCCAGCTTCC CTTTGATTGGT TTGCTGCAGA CTCATCCTT 2525	
TTAAATGAGA CTTGTTTCC CCTCTCTTGT AGTCAAGTCA AATATGTAGA TGCCTTGGC 2585	30
AATTCTTCTT CTCAAGCACT GACACTCATT ACCGTCTGTG ATTGCCATT CTTCCCAAGG 2645	
CCAGTCTGAA CCTGAGGTTG CTTTATCCTA AAAGTTTAA CCTCAGGTTG CAAATTCACT 2705	
AAATTTGGAA AACAGTACAC CTATTCCTCA TCAATTCTCT ATCATGTTGA AGTCAAATT 2765	
GGATTTCCA CCAAATTCTG AATTGTAGA CATACTGTA CGCTCACTTG CCCCCAGATGC 2825	
CTCCTCTGTC CTCATTCTTC TCTCCACAC AAGCAGTCTT TTTCTACAGC CAGTAAGGCA 2885	
GCTCTGTCGT GGTAGCAGAT GGTCCCACTT ATTCTAGGGT CTTACTCTT GTATGATGAA 2945	
AAGAATGTGT TATGAATCGG TGCTGTCAAGC CCTGCTGTCA GACCTCTTC CACAGCAAAT 3005	
GAGATGTATG CCCAAAGCGG TAGAATTTAA GAAGAGTAAA ATGGCTGTG AAGCAAAAAA 3065	40
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	3086

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 463アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号4:

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met		
1 5 10 15		
Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Asn Asp Asn Arg Glu Arg Gln		
20 25 30		
Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu Pro Leu Ser Asn		
35 40 45		
Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu		
50 55 60		
Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met		
65 70 75 80		
Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val Ala Thr Ile		10
85 90 95		
Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr		
100 105 110		
Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser		
115 120 125		
Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile		
130 135 140		
Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala		
145 150 155 160		
Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile		
165 170 175		
Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr Ile		20
180 185 190		
Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Leu Gly Val Val Gly Met Ile Ser		
195 200 205		
Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met		
210 215 220		
Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp		
225 230 235 240		
Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala		
245 250 255		
Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln		
260 265 270		
Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met		30
275 280 285		
Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg		
290 295 300		
Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser Thr Glu Arg Glu Ser		
305 310 315 320		
Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp		
325 330 335		

Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu
 340 345 350
 Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile Leu Ala Gly Glu
 355 360 365
 Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe
 370 375 380
 Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp
 385 390 395 400
 Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu
 405 410 415
 Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu Pro 10
 420 425 430
 Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp Tyr Leu
 435 440 445
 Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe Tyr Ile
 450 455 460

(2) 配列番号5の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 2494 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎮の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状 20

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..2494

(D) 他の情報 : /注 = 「1Ex1n2」

(xi) 配列 : 配列番号5 :

AAGCTTTTGT GTGTAAAAAG TATTAGAATC TCATGTTTT GAACAAGGTT GGCAGTGGGT 60
 TGGGAGGAGG GATTGGAGAT TGATGCGATA GGAATGTGAA GGGATAGCTT GGGGTGGATT 120
 TTATTTTTA ATTTAAATTT TTATTTKTTG AGATGGACTC TTGCTCTGTC TCCCAGGCTG 180
 GAGTGCAGTG GTGTGATCTC AGCTCACGGG TTCAAGCGAT TCTCCTGCTG CAGCCTCCCG 240
 AGTAGCTGGG ATTACAGGAG CGCGCCACCA CACCCGGNTA ATTTNNTTGT ATTTTTAGTA 300
 GAGACGGGGT TTCAACCATGT TGGGTTAGGC TGGTCTAGAA CTCCCAACCT CATGATCCGC 360
 CTGCTTCGGC CTCCCAAAGT GCCGGAATTA CAGGCGTGAG CGACTGCACC CGGCCGCTTG 420
 GGGGTGGATT TTTAAAGAAA CTTTAAAGAAT ATGTAACCTG SCCAGATAACC ATGTACCGTT 480
 AATTTCAATT TCGGTTTTK GAATACCCAT GTTTGACATT TMTCCGTTCA CCTTGATTAA 540
 ATAAGGTAGT ATTCAATTAGC TTTTGGATAT ATGTGTAAGT GTGGTATGCT 600
 GTCTAATGAA TTAAGACAAT TGGTNCTKTC TTTACCCMAM ANCTGGACMA AGAGCAGGCA 660
 AGATGCAAAA ATCAAGTGAC CCAGCAAACC AGACACATTT TCTGCTCTCA GCTAGCTTGC 720
 CACCTAGAAA GACTGGITGT CAAAGTTGGA GTCCAAGAAT CGCGGAGGAT GTTTAAAATG 780
 CAGTTTCTCA GGTTCTCNCC ACCCACCAGA AGTTTTGATT CATTGACTGG TGGGAGACGG 840
 CAGAGATATT TGCGATTITTA ACAGCATTCT CTTGATTGTG ATGCAGCTGG TTCSCAAATA 900
 GGTACCCCAA AGAAATGACA GGTGTTAAAT TTAGGATGGC CATCGCTTGT ATGCCGGGAG 960

AAGCACACGC TGGGCCAAT TTATATAGGG GCTTCGTCC TCAGCTCGAG CARCCTCAGA	1020
ACCCCGACAA CCYACGCCAG CKCTCTGGC GGATTCRTC AGKTGGGAA GSCTCAGGTGG	1080
AGCTCTGGKT TCTCCCCGCA ATCGTTCTC CAGGCCGGAG GCCCCGCCCC CTTCCCTCCTG	1140
GCTCCCTCCC TCCTCCGTGG GCCGNCCGCC AACGACGCCA GAGCCGGAAA TGACGACAAC	1200
GGTGACGGTT CTCGGGCGGG GCCTGGGACA GGCAGCTCCG GGGTCCGCGG TTTTCACATC	1260
GGAAACAAAA CAGCGGCTGG TCTGGAAGGA ACCTGAGCTA CGACCCCGCGG CGGCAGCGGG	1320
GCGGCGGGGA AGCGTATGTG CGTGATGGGG AGTCCGGCA AGCCAGGAAG GCACCGCGGA	1380
CATGGGCGGC CGCGGGCAGG GNCCGGNCCT TTGTGGCGC CCGGGCCGCG AAGCCGGTGT	1440
CCTAAAGAT GAGGGGCGGG CGCGGGCGGG TTGGGGCTGG GGAACCCCGT GTGGGAAACC	1500
AGGAGGGCGG GCCCGTTCT CGGGCTTCGG GCGCGGCCGG GTGGAGAGAG ATTCCGGGA	1560
GCCTTGGTCC GGAAATGCTG TTTGCTGAA GACGTCTCAG GGCGCAGGTG CTTGGGCCG	1620
GGATTAGTAG CCGTCTGAAC TGGAGTGGAG TAGGAGAAAG AGGAAGCGTC TTGGCTGGG	1680
TCTGCTTGAG CAACTGGTGA AACTCCGCGC CTCACGCCCG GGGTGTGTCC TTGTCCAGGG	1740
GCGACGAGCA TTCTGGCGA AGTCCGCACG CCTCTTGTTC GAGGCAGGAAG ACGGGGTCTT	1800
GATGCTTCT CTTGGTCGG GACTGTCTCG AGGCATGCAT GTCCAGTGAC TCTTGTGTTT	1860
GCTGCTGCTT CCCTCTCAGA TTCTTCTCAC CGTTGTGGTC AGCTCTGCTT TAGGCATATT	1920
AATCCATAGT GGAGGCTGGG ATGGGTGAGA GAATTGAGGT GACTTTCCA TAATTCAAGT	1980
GAGATGTGAT TAGAGTTCGG ATCCTNCGGT GGTGGCAGAG GCTTACCAAG AAACACTAAC	2040
GGGACATGGG AACCAATTGA GGATCCAGGG AATAAAAGTGT GAAGTTGACT AGGAGGTTTT	2100
CAGTTAAGA ACATGGCAGA GACATTCTCA GAAATAAGGA AGTTAGGAAG AAAGACCTGG	2160
TTTAGAGAGG AGGGCGAGGA ACTGGTTGG AAGTGTCACT TTGGAAGTGC CAGCAGGTGA	2220
AAATGCCCTG TGAACAGGAC TGGAGCTGAA AACAGGAATC AATTCCATAG AATTCCAGTT	2280
GATGTTGGAG CAGTGGAGAA GTCTAANCTA AGGAAGGGGA AGAGGAGGCC AAGCCAAACA	2340
CTTAGGAACA CTTNCNACGA GGGGGTGGAA GAAGAGCAAG GAGCCAGCTG AGGAGAATGA	2400
GTGTGGTTGG AGAACCAACCA CAGCNCAGGG TCGCCAGANC TGAGGAAGGG GAGGGAAAGCT	2460
TATCGAGKAM SGWCRACMKC GAGTTGGCAG GGAT	2494

(2) 配列番号 6 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 1 1 7 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..1117

(D) 他の情報 : /注 = 「1Ex3n4」

(xi) 配列 : 配列番号 6 :

10

20

30

40

GGATCCGCC	GCCTTGGCCT	CCCAAAGTGC	TGGGATTACA	GGCATGAGCC	ACCGCTCCTG	60
GCTGAGTCTG	CGATTCTTG	CCAGCTCTAC	CCAGTTGTGT	CATCTTAAGC	AAGTCACTGA	120
ACTTCTCTGG	ATTCCTTCT	CCTNNWGTAA	AATAAGNATG	TTATCTGNCC	NNCCTGCCTT	180
GGGCATTGTG	ATAAGGATAA	GATGACATTA	TAGAATNTNG	CAAATTAAA	AGCGCTAGAC	240
AAATGATTT	ATGAAAATAT	AAAGATTAGN	TTGAGTTGG	GCCAGCATAG	AAAAAGGAAT	300
GTTGAGAACA	ITCCNTTAAG	GATTACTCAA	GCYCCCCTT	TGSTGNWAA	TCAGANNGTC	360
ATNNAMNTAT	CNINTGTGGG	YTGAAAATGT	TTGGTTGTCT	CAGGCGGTTC	CTACTTATTG	420
CTAAAGAGTC	CTACCTGAG	CTTATAGTAA	ATTTGTCACT	TAGTTGAAAG	TCGTGACAAA	480
TTAATACATT	CCTGGTTTAC	AAATTGGTCT	TATAAGTATT	TGATTGGTNT	AAATGNATT	540
ACTAGGATT	AACTAACAAAT	GGATGACCTG	GTGAAATCCT	ATTCAGACC	TAATCTGGGA	600
GCCTGCAAGT	GACAAACAGCC	TTTGCAGTCC	TTAGACAGCT	TGGCCTGGAG	GAGAACACAT	660
GAAAGAAAAGG	TTTGWNTCTG	NTTAWTGTAA	TCTATGRAAG	TGTTTTTWT	-MACAGTATAA	720
TTGTMTGMA	AAAGTTCTGT	TTTCTTTCC	CTTNCAGAA	CCTCAAGAGG	CTTTGTTTTC	780
TGTGAAACAG	TATTTCTATA	CAGTTGCTCC	AATGACAGAG	TTACCTGCAC	CGTTGTCTTA	840
CTTCCAGAAT	GCACAGATGT	CTGAGGACAA	CCACCTGAGC	AATACTGTAC	GTAGCCAGGT	900
ACAGCGTCAG	TYTCTNAAAC	TGCCTYYGNC	AGACTGGATT	CACTTATCAT	CTCCCCTCAC	960
CTCTGAGAAA	TGCTGAGGGG	GSTAGGNAGG	GCTTTCTCTA	CTTNACCACA	TTTNATAATT	1020
ATTTTTGGGT	GACCTTCAGC	TGATCGCTGG	GAGGGACACA	GGGCTTNTTT	AACACATAGG	1080
GTGTTGGATA	CAGNCCCTCC	CTAATTCA	TTTCANC			1117

(2) 配列番号 7 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 1 7 2 7 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : misc_feature
- (B) 存在位置 : 1..1727
- (D) 他の情報 : /注 = 「1Ex5」

(xi) 配列 : 配列番号 7 :

10

30

GGATCCCTCC CCTTTTTAGA CCATACAAGG TAACTTCCGG ACGTTGCCAT GGCATCTGTA	60
AACTGTCATG GTGTTGGCGG GGAGTGTCTT TTAGCATGCT AATGTATTAT AATTAGCGTA	120
TAGTGAGCAG TGAGGATAAC CAGAGGTAC TCTCCTCACC ATCTTGGTT TGGTGGGTTT	180
TGGCCAGCTT CTTTATTGCA ACCAGTTTA TCAGCAAGAT CTTTATGAGC TGTATCTTGT	240
GCTGACTTCC TATCTCATCC CGNAACTAAG AGTACCTAAC CTCTGCAAA TTGMAGNCCA	300
GNAGGTCTTG GNCTTATTTN ACCCAGCCCC TATTCAARAT AGAGTNGYTC TTGGNCCAAA	360
CGCCYCTGAC ACAAGGATT TAAAGTCTTA TTAAATTAGG TAAGATAGKT CCTTGSATAT	420
GTGGTCTGAA ATCACAGAAA GCTGAATTG GAAAAGGTG CTTGGASCTG CAGCCAGTAA	480
ACAAGTTTC ATGCAGGTGT CAGTATTAA GGTACATCTC AAAGGATAAG TACAATTGTG	540
TATGTTGGGA TGAACAGAGA GAATGGAGCA ANCCAAGACC CAGGTAAAAG AGAGGACCTG	600
ATGCCCTCA GTGAACAATG ATAGATAATC TAGACTTTA AACTGCATAC TTCTGTACA	660
TTGTTTTTC TTGCTTCAGG TTTTAAAC TCATAGTGC GGGTCTGTG TTAATCCCAG	720
GTCTAACCGT TACCTTGATT CTGCTGAGAA TCTGATTAC TGAAAATGTT TTTCTTGTGC	780
TTATAGAATG ACAATAGAGA ACGGCAGGAG CACAACGACA GACGGAGCCT TGGCCACCC	840
GAGCCATTAT CTAATGGACG ACCCCAGGGT AACTCCCAGC AGGTGGTGGA GCAAGATGAG	900
GAAGAAGATG AGGAGCTGAC ATTGAAATAT GGCGCCAAGC ATGTGATCAT GCTCTTGTG	960
CCTGTGACTC TCTGCATGGT GGTGGTCGTG GCTACCATTA AGTCAGTCAG CTTTATACC	1020
CGGAAGGATG GGCAGCTGTA CGTATGAGTT TKGTTTTATT ATTCTCAAAS CCAGTGTGCC	1080
TTTCTTAC AGCATGTCTCAT CTCACCTTG AAGGCCTCTN CATTGAAGGG GCATGACTTA	1140
GCTGGAGAGC CCATCCTCTG TGATGGTCAG GAGCAGTTGA GAGANCAGGG GGTTATTACT	1200
TCATGTTTA AGTGGAGAAA AGGAACACTG CAGAAAGTATG TTTCTGTAT GGTATTACTG	1260
GATAGGGCTG AAGTTATGCT GAATTGAACA CATAAATTCT TTTCCACCTC AGGGNCATIG	1320
GGCGCCCATT GNTCTTCTGC CTAGAATATT CTTTCTTIN CTNACTTKGG NGGATTAAAT	1380
TCCTGTCTCATC CCCCTCCTCT TGGTGTATA TATAAAGTNT TGGTGGCGCA AAAGAACTAG	1440
CACTCGAATA TAAAATTTTC CTTTAATTTC TCAGCAAGGN AAGTTACTTC TATATAGAAG	1500
GGTGCACCCN TACAGATGGA ACAATGGCAA GCGCACATTG GGGACAAGGG AGGGAAAGG	1560
GTCTTATCC CTGACACACG TGGTCCNGC TGNTGTGTNC TNCCCCCACT GANTAGGGTT	1620
AGACTGGACA GGCTTAAACT AATTCCAATT GGNTAATTAA AAGAGAATNA TGGGGTGAAT	1680
GCTTTGGGAG GAGTCACAGGA AGAGNAGGTA GNAGGTAAC TGAATGA	1727

(2) 配列番号 8 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 8 3 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..1883

(D) 他の情報 : /注 = 「1Ex6」

(xi) 配列 : 配列番号 8 :

10

20

30

40

CNCGTATAAA AGACCAACAT TGCCANCAC AACCACAGGC AAGATCTTCT CCTACCTTCC 60
 CCCNNGGTGT AATACCAAGT ATTNCACAT TTGTGATAAA CTTTCATTEG AAAGTGACCA 120
 CCCTCCTTGG TTAATACATT GTCTGTGCCT GCTTCACAC TACAGTAGCA CAGTTGAGTG 180
 TTTGCCCTGG AGACCATATG ACCCATAGAG CTTAAAATAT TCAGTCTGGC TTTTACAGA 240
 GATGTTTCTG ACTTTGTTAA TAGAAAATCA ACCCAACTGG TTTAAATAAT GCACATACTT 300
 TCTCTCTCAT AGAGTAGTGC AGAGGTAGNC AGTCCAGATT AGTASGGTGG CTTCACGTT 360
 ATCCAAGGAC TCAATCTCT TCTTCTTCT TTAGCTCTA ACCTCTAGCT TACTTCAGGG 420
 TCCAGGCTGG AGCCCTASCC TTCACTTCTG ACAGTAGGAA GGAGTAGGGG AGAAAAGAAC 480
 ATAGGACATG TCAGCAGAAT TCTCTCCTTA GAAGTTCCAT ACACAACACA TCTCCCTAGA 540
 10
 AGTCATTGCC CTTACTTGTG CTCATAGCCA TCCTAAATAT AAGGGAGTCA GAAGTAAAGT 600
 CTKKNTGGCT GGGAAATATTG GCACCTGGAA TAAAATGTT TTTCTGTGAA TGAGAAACAA 660
 GGGGAAGATG GATATGTGAC ATTATCTTAA GACAACCTCA GTTGCATTAA CTCTGCAGAT 720
 GAGAGGCACT AATTATAAGC CATATTACCT TTCTTCTGAC AACCACTTGT CAGCCNCGT 780
 GTTCTGTG GCAGAACTTG GTTCYATAMC AAGTCTCTAA TAANCTGTAS CCNAAAAAAT 840
 TTGATGAGGT ATTATAATTAA TTCAATATA AAGCACCCAC TAGATGGAGC CAGTGTCTGC 900
 TTCACATGTT AAGTCCTTCT TTCCATATGT TAGACATTTT CTTGAAGCA ATTTAGAGT 960
 GTAGCTGTTT TTCTCAGGTT AAAAATTCTT AGCTAGGATT GGTGAGTTGG CGAAAAGTGA 1020
 20
 CTTATAAGAT NCGAATTGAA TTAAGAAAAA GAAAATTCTG TGTTGGAGGT GGTAAATGTGG 1080
 KTGGTGATCT YCATTAACAC TGANCTAGGG CTTTKGKGTT TGKTTTATTG TAGAATCTAT 1140
 ACCCCATTCA CAGAAGATAAC CGAGACTGTG GCCCAGAGAG CCCTGCACTC AATTCTGAAT 1200
 GCTGCCATCA TGATCAGTGT CATTGTTGTC ATGACTATCC TCCTGGTGGT TCTGTATAAA 1260
 TACAGGTGCT ATAAGGTGAG CATGAGACAC AGATCTTGN TTCCACCCCT GTTCTTCTTA 1320
 TGGTTGGGTA TTCTTGTCACT AGTAACCTAA CTGATCTAGG AAAGAAAAAA TGTTTTGTCT 1380
 TCTAGAGATA AGTTAATTIT TAGTTTCTT CCTCCTCACT GTGGAACATT CAAAAAATAC 1440
 30
 AAAAAGGAAG CCAGGTGCAT GTGTAATGCC AGGCTCAGAG GCTGAGGCAG GAGGATCGCT 1500
 TGGGCCAGG AGTCACAAAG CAGCTTGGGC AACGTAGCAA GACCCTGCCT CTATTAAAGA 1560
 AAACAAAAAA CAAATATTGG AAGTATTTTA TATGCATGGA ATCTATATGT CATGAAAAAA 1620
 TTAGTGTAAA ATATATATAT TATGATTAGN TATCAAGATT TAGTGATAAT TTATGTTATT 1680
 TTGGGATTTC AATGCCTTT TAGGCCATTG TCTCAAMAAA TAAAAGCAGA AAACAAAAAA 1740
 AGTTGTAACT GAAAAATAAA CATTCCATA TAATAGCACA ATCTAAGTGG GTTTTGNTT 1800
 GTTTGTTGN TTGTTGAAGC AGGGCCTTGC CCTNYCACCC AGGNTGGAGT GAAGTGCAGT 1860
 GGCACGATTT TGGCTCACTG CAG
 1883

(2) 配列番号 9 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 823 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..823

(D) 他の情報 : /注 = 「1Ex7」

(xi) 配列 : 配列番号 9 :

CAGGAGTGG	CTAGGTAAT	GNAAGNTGTT	TTAAAGAGAG	ATGNGGNNG	GGACATAGTG	60
GTACACANCT	GTAAATGCTCA	NCACAKATGG	GGAGTACTGA	AGGNGGNSGG	ATCACTTNG	120
GGTCNGGART	NTGAGANCAG	CCTGGGCAAN	ATGGCGAAC	CCTGTCTCTA	CTAAAAATAG	180
CCANAAWNWA	GCCTAGCGTG	GTGGCGCRCA	CGCGTGGTTC	CACCTACTCA	GGAGGCNTAA	240
GCACGAGNAN	TNCTTGAACC	CAGGAGGCAG	AGGNTGTGTT	GARCTGAGAT	CGTGCCTACTG	300
CACTCCAGTC	TGGCGACMA	AGTGAGACCC	TGTCTCCNNN	AAGAAAAAAA	AAATCTGTAC	360
TTTTTAAGGG	TTGTGGGACC	TGTTAATTAT	ATTGAAATGC	TTCTTTCTA	GGTCATCCAT	420
GCCTGGCTTA	TTATATCATC	TCTATTGTTG	CTGTTCTTTT	TTTCATTCTAT	TTACTTGGGG	480
TAAGTTGTGA	AAATTGGGGT	CTGTCTTTCA	GAATTAACCA	CCTNNGTGCT	GTGTAGCTAT	540
CATTTAAAGC	CATGTACTTT	GNTGATGAAT	TACTCTGAAG	TTTTAATTGT	NTCCACATAT	600
AGGTCAACT	TGGTATATAA	AAGACTAGNC	AGTATTACTA	ATTGAGACAT	TCTTCTGTNG	660
CTCCTNGCTT	ATAATAAGTA	GAACTGAAAG	NAACTTAAGA	CTACAGTTAA	TTCTAAGCCT	720
TTGGGGAGG	ATTATATAGC	CTTCTAGTAG	GAAGTCTTGT	GCNATCAGAA	TGTTTNTAAA	780
GAAAGGGTNT	CAAGGATNG	TATAANACC	AAAAATAATT	GAT		823

(2) 配列番号 1 0 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 945 塩基対

20

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..945

(D) 他の情報 : /注 = 「1Ex8」

(xi) 配列 : 配列番号 1 0 :

GTINTCCNAA	CCAACTTCTAGG	AGNTTGGACC	TGGGRAAGAC	CNACNTGATC	TCCGGGAGGN	60
AAAGACTNCA	GTTGAGCCGT	GATTGCACCC	ACTTTACTCC	AAGCCTGGC	AACCRAAATG	120
AGACACTGGC	TCCAAACACA	AAAACAAAAA	CAAAAAAAGA	GTAAATTAAT	TTANAGGGAA	180
GNATTAAATA	AATAATAGCA	CAGTTGATAT	AGGTTATGGT	AAAATTATAA	AGGTGGGANA	240
TTAATATCTA	ATGTTTGGGA	GCCATCACAT	TATTCTAAAT	AATGTTTTGG	TGGAAATTAT	300
TGTACATCTT	TTAAAATCTG	TGTAATTTTT	TTTCAGGGAA	GTGTTTAAA	CCTATAAACGT	360
TGCTGTGGAC	TACATTACTG	TTGCACTCCT	GATCTGGAAT	TTTGGTGTGG	TGGGAATGAT	420
TTCCATTACAC	TGGAAAGGTC	CACTTCGACT	CCAGCAGGCA	TATCTCATTA	TGATTACTCC	480
CCTCATGGCC	CTGGTGTTTA	TCAAGTACCT	CCCTGAATGG	ACTGGTGGC	TCATCTTGGC	540
TGTGATTTC	GTATATGGTA	AAACCCAAGA	CTGATAATT	GTGTCACA	GGAATGCC	600
ACTGGAGTGT	TTTCTTCCCT	CATCTCTTTA	TCTTGATTTA	GAGAAAAATGG	TAACGTGTAC	660
ATCCCATAAC	TCTTCAGTAA	ATCATTAAATT	AGCTATAGTA	ACTTTTCAT	TTGAAGATTT	720
CGGCTGGGCA	TGGTAGCTCA	TGCCTGTAAT	CTTAGCATT	TGGGAGGCTG	AGGCAGGCAG	780
ATCACCTAAG	CCCAGAGTTC	AAGACCAGCC	TGGGCAACAT	GGCAAAACCT	CGTATCTACA	840
GAAAATACAA	AAATTAGCCG	GGCATGGTGG	TGCACACCTG	TAGTCCAGC	TACTTAGGAG	900
GCTGAGGTGG	GAGGATCGAT	TGATCCCAGG	AGGTCAAGNC	TGCAG		945

(2) 配列番号 1 1 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 540 塩基対

50

(B) 型：核酸

(C) 鎌の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 1 1 :

CTGCAGCTTT CCTTTAAACT AGGAAGACTT GTTCCTATAC CCCAGTAACG ATACACTGTA	60
CACTAAGCAA ATAGCAGTCA AACCCAAATG AAATTTNTAC AGATGTTCTG TGTCATTTA	120
TNTTGTCTTAT GTTGTCTCCC CCACCCCCAC CAGTTCACCT GCCATTTATT TCATATTCAT	180
TCAACGTCTN NNTGTGAAA AAGAGACAAA AAACATTAAC CTTTTTCCT TCGTTAATT	240
CTCCCTACCA CCCATTTACA AGTTTAGCCC ATACATTTA TTAGATGTCT TTTATGTTT	300
TCTTTTNCTA GATTTAGTGG CTGTTTGTG TCCGAAAGGT CCACITCGTA TGCTGGTTGA	360
AACAGCTCA GAGAGAAATG AAACGCTTTT TCCAGCTCTC ATTTACTCCT GTAACTATT	420
GGAGAATGAT ATTGAATTAG TAATCAGNGT AGAATTATC GGGAACTTGA AGANATGTNA	480
CTATGGCAAT TTCANGGNAC TTGTCATC TTAAATGANA GNATCCCTGG ACTCCTGNAG	540

(2) 配列番号 1 2 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：509 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎌の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：misc_feature

(B) 存在位置：1..509

(D) 他の情報：/注 = 「1Ex10」

(xi) 配列：配列番号 1 2 :

CCCCGTCNAT GCATACTTGT TGTGTCCAGT GCTTACCTGG AATCCNGTCT TTCCCAACAG	60
CAACAATGGT GTGGTTGGTG AATATGGCAG AAGGAGACCC GGAAGCTCAA AGGAGAGTAT	120
CCAAAAATTG CAAAGTATAAT GCAGAAAGTA GGTAACCTYYY NTTAGATAMN ATCTTGATT	180
TNCAGGGTCA CTGTTATAAG CTAACAGTAT AGNAATGTTT TTATCGTCTT TCTNKGGNCA	240
TAGACTCCTN KGAGAATCTC TTGAGAACTA TGATAATGCC CAGTAATAC NCAGATAAGT	300
ATTTAAGGAG TNCAGATACT CAAANCCAA CAATAACNGTC AAAGCATCCT AGGTTAAGAC	360
AMCNCCCATT AAATAACAGAA TACCAAGCATG GAAAGGTCA GGCTGAGGTT ATGATTGGGT	420
TTGGGTTTTG CGNNNGTTTT TTATAAGTCA TGATTTAAA AAGAAAAAAAT AAACCTCTCTC	480
CAAACATGTA AAAGTAAGAA TCTCCTAAA	509

(2) 配列番号 1 3 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1092 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎌の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：misc_feature

(B) 存在位置：1..1092

(D) 他の情報：/注 = 「1Ex11」

(xi) 配列：配列番号 1 3 :

10

20

30

40

GTCTAGATAA GNCAACATTG AGGGCTAGAA GGGGACTGTT TATTTTTCC TTTAGTCTCT	60
CTTAAAGAGT GAGAAAAATT TTCCCAGGAA TCCCGGTGGA CTTGCTTCA CCACTCATAG	120
GTTCATACCA AGTTACAACC CCACAAACCTT AGAGCTTTG TTAGGAAGAG GCTTGGTGGG	180
ATTACCGTGC TTGGCTTGGC TTGGTCAGGA TTCACCACCA GAGTCATGTG GGAGGGGGTG	240
CGAACCCAAA CAATTAGGA TTCTGCCCTC AGGAAATAAA GGAGAAAATA GCTGTTGGAT	300
AAACTACCAG CAGGCACTGC TACAGCCCCT GCTTGTGGT TAAAGGGCCA GCTAGTTACA	360
ATGACAGCTA GTIAGCTGTT CCATGTAATT TTCTTAAAGG TATTAATTT TTCTAAATAT	420
TAGAGCTGTA ACTTCCACTT TCTCTTGAAG GCACAGAAAG GGAGTCACAA GACACTGTTG	480
CAGAGAATGA TGATGGCGGG TTCAGTGGAGG AATGGGARCC CCAGAGGGAC AGTCATCTAG	540
GGCCTCATCG CTCTACACCT GAGTCACGAG CTGCTGTCCA GGAACCTTCC <u>AGCAGTATCC</u>	600
TCGCTGGTGA AGACCCAGAG GAAAGTATGT TCANTTCTCC ATNTTCAAA GTCATGGATT	660
CCTTCTAGGTA GCTACATTAT CAACCTTTT GAGAATAAAA TGAATTGAGA GTGTTACAGT	720
CTAATTCTAT ATCACATGTA ACTTTTATTT GGATATATCA GTAATAGTGC TTTTTTNTTT	780
TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTNGGNCA NAGAGTCTCG CTCTGTCGCC AGGTTGGAGT	840
GCAATGGTGC GATCTGGCT CACTGAAAGC TCCACCNCCC GGGTTCAAGT GATTCTCCTG	900
CCTCAGCCNC CCAACTAGNT GGGACTACAG GGGTGCGCCA CCACGCCTGG GATAATTITG	960
GGNTTTTTAG TAGAGATGGC GTTCACCAN CTTGGNGCAG GCTGGTCTTG GAACTCCTGA	1020
NATCATGATC TGCTGCCTT AGCCTCCCCA AAGTGCTGGG ATTNCAGGGG TGAGCCACTG	1080
TTCCCTGGGCC TC	1092

(2) 配列番号 1 4 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 0 0 3 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..1003

(D) 他の情報 : /注 = 「1Ex12」

(xi) 配列 : 配列番号 1 4 :

10

20

30

CTGCAGTGAG CCGAGATCAT GCTGCTGTAC TCCAGCCTGG GCCACAGAGC CAAACTCCAT 60
 CTCCCAAAAA AAAAATATAT TAATTAATAT GATNAAATGA TGCCATCTC AGAATTCTG 120
 TAAGGATTTC TTGKACAAG TGCTGGGTAT AACTATANA TTCTATAGAT GNCGATTATT 180
 ACTTAYTATT GTTATTGATA AATAACAGCA GCATCTACAG TTAAGACTCC AGAGTCAGTC 240
 ACATAGAACAT TGGNACTCCT ATTGTAGNAA ACCCCNMMAC AAAGAAAACA CAGCTGAAGC 300
 CTAATTTGT ATATCATTTA CTGACTCTC TCATTCATTG TGGGGTTGAG TAGGGCAGTG 360
 ATATTTTGAG ATTGTGAAAT CATANCAAG AGTGACCAAC TTTTAATAT TTGTAACCTT 420
 TCCCTTTAG GGGGAGTAA ACTTGGATTG GGAGATTCA TTTCTACAG TGTCTGGTT 480
 GGTAAAGCCT CAGCAACAGC CAGTGGAGAC TGGAACACAA CCATAGCCTG TTTCTAGCC 540
 10
 ATATTAATTG TMMSTATAACA CTAATAAGAA TGTGTCAGAG CTCTTAATGT CMAAACTTTG
 ATTACACAGT CCCTTAAAGG CAGTCTGTT TTAACCCCAG GTGGGTTAAA TATTCCAGCT 600
 ATCTGAGGAG CTTTNGATA ATTGGACCTC ACCTTAGTAG TTCTCTACCC TGGCCACACA 660
 TTAGAACAC TTGGGAGCTT TAAAAACTGT AAGCTCTGCC CTGAGATATT CTTACTCAAT 720
 TTAATTGTGT AGTTTAAAGG ATTCCCCAGG AAATTCTGGT ATTTCTGTTT AGGAACCCCT 780
 GCCTCAAGCC TAGCAGCACAA GATATGTAGG AAATTAGCTC TGTAAAGGTTG GTCTTACAGG 840
 GATAAACAGA TCCCTCCTTA GTCCCTGGAC TTAATCACTG AGAGTTGGGG TGGTGGTTT 900
 960
 GGATTTAATG ACACAACTG TAGCATGCAG TGTTACTTAA GAC 1003 20

(2) 配列番号 15 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 736 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..736

(D) 他の情報 : /注 = 「1Ex13」

30

(xi) 配列 : 配列番号 15 :

GTCTTTCCCA TCTTCTCCAC AGGGTTTGTG CCTTACATTA TTACTCCTTG CCATTTCAA 60
 GAAAGCATTG CCAGCTCTTC CAATCTCCAT CACCTTTGGG CTTGTTTCT ACCTTGCCAC 120
 AGATTATCTT GTACAGCCTT TTATGGACCA ATTACATTC CATCAATTAT ATATCTAGCA 180
 TATTTGCGGT TAGAATCCCA TGGATGTTTC TTCTTTGACT ATAACAAAT CTGGGGAGGA 240
 CAAAGGTGAT TTCCCTGTGTC CACATCTAAC AAATCAAGAT CCCCCGCTGG ACTTTTGGAG 300
 GTTCTTCCA AGTCTTCTG ACCACCTTGC ACTATTGGAC TTTGGAAGGA GGTGCCTATA 360
 GAAAACGATT TTGAACATAC TTCACTGCAG TGGACTGTGT CCTCGGTGCA GAAACTACCA 420
 GATTTGAGGG ACGAGGTCAA GGAGATATGA TAGGCCCGGA AGTTGCTGTG CCCCACAGC 480
 40
 AGCTTGACGC GTGGTCACAG GACGATTTTC ACTGACACTG CGAACTCTCA GGACTACCGT
 TACCAAGAGG TTAGGTGAAG TGGTTAAAC CAAACGGAAC TCTTCATCTT AACTACACG
 TTGAAAATCA ACCCAATAAT TCTGTATTAA CTGAATTCTG AACTTTTCAG GAGGTACTGT
 GAGGAAGAGC AGGCACCAACC AGCAGAATGG GGAATGGAGA GGTGGGCAGG GGTCCAGCT
 TCCCTTTGAT TTTTG 736

(2) 配列番号 16 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1964 塩基対

(B) 型 : 核酸

50

(C) 鎌の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：188..1588

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：misc_feature

(B) 存在位置：1..1964

(D) 他の情報：/注 = 「mPS1」

(xi) 配列：配列番号 1 6 :

ACCAACACANC GGCAGCTGAG GCGGAAACCT AGGCTCCGAG CCGGCCGCC GGGCGGGAG	60	10
ACAGAAAGGAA CCAACACAAG ACAGCAGCCC TTTCGAGGTCT TTAGGCAGCT TGGAGGAGAA	120	
CACATGAGAG AAAGAAATCCC AAAGAGGTTTT GTTTTCTTTG AGAAGGTATT TCTGTCCAGC	180	
TGCTCCA ATG ACA GAG ATA CCT GCA CCT TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCC	229	
Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala	1 5 10	
CAG ATG TCT GAG GAC AGC CAC TCC AGC AGC GCC ATC CGG AGC CAG AAT	277	
Gln Met Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn	15 20 25 30	
GAC AGC CAA GAA CGG CAG CAG CAT GAC AGG CAG AGA CTT GAC AAC	325	
Asp Ser Gln Glu Arg Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp Asn	35 40 45	20
CCT GAG CCA ATA TCT AAT GGG CGG CCC CAG AGT AAC TCA AGA CAG GTG	373	
Pro Glu Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg Gln Val	50 55 60	
GTG GAA CAA GAT GAG GAG GAA GAC GAA GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGA	421	
Val Glu Gln Asp Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly	65 70 75	
GCC AAG CAT GTC ATC ATG CTC TTT GTC CCC GTG ACC CTC TGC ATG GTC	469	
Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val	80 85 90	
GTC GTC GTG GCC ACC ATC AAA TCA GTC AGC TTC TAT ACC CGG AAG GAC	517	
Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp	95 100 105 110	
GGT CAG CTA ATC TAC ACC CCA TTC ACA GAA GAC ACT GAG ACT GTA GGC	565	
Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly	115 120 125	30
CAA AGA GCC CTG CAC TCG ATC CTG AAT GCG GCC ATC ATG ATC AGT GTC	613	
Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val	130 135 140	
ATT GTC ATT ATG ACC ATC CTC CTG GTG GTC CTG TAT AAA TAC AGG TGC	661	
Ile Val Ile Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys	145 150 155	
TAC AAG GTC ATC CAC GCC TGG CTT ATT ATT TCA TCT CTG TTG TTG CTG	709	
Tyr Lys Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu	160 165 170	
TTC TTT TTT TCG TTC ATT TAC TTA GGG GAA GTA TTT AAG ACC TAC AAT	757	
Phe Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn	175 180 185 190	
GTC GCC GTG GAC TAC GTT ACA GTA GCA CTC CTA ATC TGG AAT TTT GGT	805	
Val Ala Val Asp Tyr Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly	195 200 205	
GTG GTC GGG ATG ATT GCC ATC CAC TGG AAA GGC CCC CTT CGA CTG CAG	853	
Val Val Gly Met Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln	210 215 220	
CAG GCG TAT CTC ATT ATG ATC AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTA TTT ATC	901	
Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile	225 230 235	

AAG TAC CTC CCC GAA TGG ACC GCA TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser 240 245 250	949
GTA TAT GAT TTG GTG GCT GTT TTA TGT CCC AAA GGC CCA CTT CGT ATG Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 255 260 265 270	997
CTG GTT GAA ACA GCT CAG GAA AGA AAT GAG ACT CTC TTT CCA GCT CTT Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu 275 280 285	1045
ATC TAT TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCT GAA GGA GAC Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp 290 295 300	1093
CCA GAA CCC CAA AGG AGG GTA CCC AAG AAC CCC AAG TAT AAC ACA CAA Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Pro Lys Asn Pro Lys Tyr Asn Thr Gln 305 310 315	1141
AGA GCG GAG AGA GAG ACA CAG GAC AGT GGT TCT GGG AAC GAT GAT GGT Arg Ala Glu Arg Glu Thr Gln Asp Ser Gly Ser Gly Asn Asp Asp Gly 320 325 330	1189
GCG TTC ACT GAG GAG TGG GAG GCC CAA AGA GAC AGT CAC CTG GGG CCT Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro 335 340 345 350	1237
CAT CGC TCC ACT CCC GAG TCA AGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT TCT GGG His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Gly 355 360 365	1285
AGC ATT CTA ACG ACT GAA GAC CCG GAG GAA AGA GCA GTA AAA CTT GGA Ser Ile Leu Thr Ser Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly 370 375 380	1333
CTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT CGT AAG GCC TCA GCA Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala 385 390 395	1381
ACC GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGC TTT GTA GCC ATA Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile 400 405 410	1429
CTG ATC GGC CTG TGC CTT ACA TTA CTC CTG CTC GCC ATT TTC AAG AAA Leu Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys 415 420 425 430	1477
GCG TTG CCA GCC CTC CCC ATC TCC ATC ACC TTC GGG CTC GTG TTC TAC Ala Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr 435 440 445	1525
TTC GCC ACG GAT TAC CTT GTG CAG CCC TTC ATG GAC CAA CTT GCA TTC Phe Ala Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe 450 455 460	1573
CAT CAG TTT TAT ATC TAGCCTTCT GCAGTTAGAA CATGGATGTT TCTTCTTTGA His Gln Phe Tyr Ile 465	1628
TTATCAAAAA CACAAAAACA GAGAGCAAGC CCGAGGGAGGA GACTGGTGAC TTTCTGTGT CCTCAGCTAA CAAAGGCAGG ACTCCAGCTG GACTTCTGCA GCTTCCTTCC GAGTCTCCCT AGCCACCCGC ACTACTGGAC TGTGGAAGGA AGCGTCTACA GAGGAACGGT TTCCAACATC CATCGCTGCA GCAGACGGTG TCCCTCAGTG ACTTGAGAGA CAAGGACAAG GAAATGTGCT GGGCCAAGGA GCTGCCGTGC TCTGCTAGCT TTGACCGTGG GCATGGAGAT TTACCCGCAC	1688
TGTGAACCTCT CTAAGGTAAA CAAAGTGAGG TGAACC (2) 配列番号17の情報： (i) 配列の特徴： (A) 長さ：467アミノ酸 (B) 型：アミノ酸 (D) トポロジー：直鎖状 (ix) 配列の種類：タンパク質 (xi) 配列：配列番号17：	1748
	1808
	1868
	1928
	1964

(2) 配列番号17の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：467アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号17：

Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met		
1 5 10 15		
Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn Asp Ser		
20 25 30		
Gln Glu Arg Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp Asn Pro Glu		
35 40 45		
Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg Gln Val Val Glu		
50 55 60		
Gln Asp Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys		
65 70 75 80		
His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val		10
85 90 95		
Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln		
100 105 110		
Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg		
115 120 125		
Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val		
130 135 140		
Ile Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys		
145 150 155 160		
Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Phe Phe		
165 170 175		
Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala		20
180 185 190		
Val Asp Tyr Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val		
195 200 205		
Gly Met Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala		
210 215 220		
Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr		
225 230 235 240		
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr		
245 250 255		
Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val		
260 265 270		
Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr		
275 280 285		
Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu		
290 295 300		
Ala Gln Arg Arg Val Pro Lys Asn Pro Lys Tyr Asn Thr Gln Arg Ala		
305 310 315 320		
Glu Arg Glu Thr Gln Asp Ser Gly Ser Gly Asn Asp Asp Gly Gly Phe		
325 330 335		

Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg
 340 345 350
 Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Gly Ser Ile
 355 360 365
 Leu Thr Ser Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly
 370 375 380
 Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala
 385 390 395 400
 Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile
 405 410 415
 Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu
 420 425 430
 Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala
 435 440 445
 Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln
 450 455 460
 Phe Tyr Ile
 465

(2) 配列番号 1 8 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 2 2 2 9 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : CDS

(B) 存在位置 : 366..1712

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..2226

(D) 他の情報 : /注 = 「hPS2」

(xi) 配列 : 配列番号 1 8 :

GAATTCGGCA CGAGGGCATT TCCAGCAGTG AGGAGACAGC CAGAAGCAAG CTTTTGGAGC
 60
 TGAAGGAACC TGAGACAGAA GCTAGTCCCC CCTCTGAATT TTACTGATGA AGAAACTGAG
 120
 GCCACAGAGC TAAAGTGAAT TTTCCAAGG TCGCCCAGCG AGGACGTGGG ACTTCTCAGA
 180
 CGTCAGGAGA GTGATGTGAG GGAGCTGTGT GACCATAGAA AGTGAACGTGT TAAAAAACCAG
 240
 CGCTGCCCTC TTTGAAAGCC AGGGAGCATC ATTCAATTAG CCTGCTGAGA AGAAGAAACC
 300
 AAGTGTCCGG GATTCAAGAC CTCTCTGCAG CCCCAAGTGT TCGTGGTGCT TCCAGAGGCA
 360
 GGGCT ATG CTC ACA TTC ATG GCC TCT GAC AGC GAG GAA GAA GTG TGT
 Met Leu Thr Phe Met Ala Ser Asp Ser Glu Glu Glu Val Cys
 1 5 10
 407

GAT GAG CGG ACG TCC CTA ATG TCG GCC GAG AGC CCC ACG CCG CGC TCC
 Asp Glu Arg Thr Ser Leu Met Ser Ala Glu Ser Pro Thr Pro Arg Ser
 15 20 25 30
 455

TGC CAG GAG GGC AGG CAG GGC CCA GAG GAT GGA GAG AAT ACT GCC CAG
 Cys Gln Glu Gly Arg Gln Gly Pro Glu Asp Gly Glu Asn Thr Ala Gln
 35 40 45
 503

TGG AGA AGC CAG GAG AAC GAG GAG GAC GGT GAG GAG GAC CCT GAC CGC Trp Arg Ser Gln Glu Asn Glu Glu Asp Gly Glu Glu Asp Pro Asp Arg 50 55 60	551
TAT GTC TGT AGT GGG GTT CCC GGG CGG CCG CCA GGC CTG GAG GAA GAG Tyr Val Cys Ser Gly Val Pro Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu 65 70 75	599
CTG ACC CTC AAA TAC GGA GCG AAG CAT GTG ATC ATG CTG TTT GTG CCT Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro 80 85 90	647
GTC ACT CTG TGC ATG ATC GTG GTG GTA GCC ACC ATC AAG TCT GTG CGC Val Thr Leu Cys Met Ile Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Arg 95 100 105 110	695
TTC TAC ACA GAG AAG AAT GGA CAG CTC ATC TAC ACG CCA TTC ACT GAG Phe Tyr Thr Glu Lys Asn Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu 115 120 125	743
GAC ACA CCC TCG GTG GGC CAG CGC CTC CTC AAC TCC GTG CTG AAC ACC Asp Thr Pro Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Asn Ser Val Leu Asn Thr 130 135 140	791
CTC ATC ATG ATC AGC GTC ATC GTG GTT ATG ACC ATC TTC TTG GTG GTG Leu Ile Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile Phe Leu Val Val 145 150 155	839
CTC TAC AAG TAC CGC TGC TAC AAG TTC ATC CAT GGC TGG TTG ATC ATG Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Phe Ile His Gly Trp Leu Ile Met 160 165 170	887
TCT TCA CTG ATG CTG CTG TTC CTC TTC ACC TAT ATC TAC CTT GGG GAA Ser Ser Leu Met Leu Leu Phe Leu Phe Thr Tyr Ile Tyr Leu Gly Glu 175 180 185 190	935
GTG CTC AAG ACC TAC AAT GTG GCC ATG GAC TAC CCC ACC CTC TTG CTG Val Leu Lys Thr Tyr Asn Val Ala Met Asp Tyr Pro Thr Leu Leu Leu 195 200 205	983
ACT GTC TGG AAC TTC GGG GCA GTG GGC ATG GTG TGC ATC CAC TGG AAG Thr Val Trp Asn Phe Gly Ala Val Gly Met Val Cys Ile His Trp Lys 210 215 220	1031
GGC CCT CTG GTG CTG CAG CAG GCC TAC CTC ATC ATG ATC AGT GCG CTC Gly Pro Leu Val Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu 225 230 235	1079
ATG GCC CTA GTG TTC ATC AAG TAC CTC CCA GAG TGG TCC GCG TGG GTC Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Ser Ala Trp Val 240 245 250	1127
ATC CTG GGC GCC ATC TCT GTG TAT GAT CTC GTG GCT GTG CTG TGT CCC Ile Leu Gly Ala Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro 255 260 265 270	1175
AAA GGG CCT CTG AGA ATG CTG GTA GAA ACT GCC CAG GAG AGA AAT GAG Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu 275 280 285	1223
CCC ATA TTC CCT GCC CTG ATA TAC TCA TCT GCC ATG GTG TGG ACG GTT Pro Ile Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Ala Met Val Trp Thr Val 290 295 300	1271
GGC ATG GCG AAG CTG GAC CCC TCC TCT CAG GGT GCC CTC CAG CTC CCC Gly Met Ala Lys Leu Asp Pro Ser Ser Gln Gly Ala Leu Gln Leu Pro 305 310 315	1319
TAC GAC CCG GAG ATG GAA GAC TCC TAT GAC AGT TTT GGG GAG CCT Tyr Asp Pro Glu Met Glu Asp Ser Tyr Asp Ser Phe Gly Glu Pro 320 325 330	1367

10

20

30

40

TCA TAC CCC GAA GTC TTT GAG CCT CCC TTG ACT GGC TAC CCA GGG GAG Ser Tyr Pro Glu Val Phe Glu Pro Pro Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Glu 335 340 345 350	1415
GAG CTG GAG GAA GAG GAG GAA AGG GGC GTG AAG CTT GGC CTC GGG GAC Glu Leu Glu Glu Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp 355 360 365	1463
TTC ATC TTC TAC AGT GTG CTG GTG GGC AAG GCG GCT GCC ACG GGC AGC Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser 370 375 380	1511
GGG GAC TGG AAT ACC ACG CTG GCC TGC TTC GTG GCC ATC CTC ATT GGC Gly Asp Trp Asn Thr Thr Leu Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly 385 390 395	1559
TTG TGT CTG ACC CTC CTG CTG CTT GCT GTG TTC AAG AAG GCG CTG CCC Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Val Phe Lys Lys Ala Leu Pro 400 405 410	1607
GCC CTC CCC ATC TCC ATC ACG TTC GGG CTC ATC TTT TAC TTC TCC ACG Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Phe Ser Thr 415 420 425 430	1655
GAC AAC CTG GTG CGG CCG TTC ATG GAC ACC CTG GCC TCC CAT CAG CTC Asp Asn Leu Val Arg Pro Phe Met Asp Thr Leu Ala Ser His Gln Leu 435 440 445	1703
TAC ATC TGA GGGACATGGT GTGCCACAGG CTGCAAGCTG CAGGAAATT Tyr Ile *	1752
TCATTGGATG CAGTTGTATA GTTTTACACT CTAGTGCAT ATATTTTAA GACTTTCTT TCCTTAAAAA ATAAAGTACG TGTTTACTTG GTGAGGAGGA GGCAGAACCA GCTTTGGT GCCAGCTGTT TCATCACCCAG ACTTTGGCTC CCGCTTTGGG GAGCCCTCG TTTCACGGAC AGGAAGCACA GCAGGTTTAT CCAGATGAAC TGAGAAGGTC AGATTAGGGT GGGGAGAAGA GCATCCGGCA TGAGGGCTGA GATGCCAAA GAGTGTGCTC GGGAGTGGCC CCTGGCACCT GGGTGCTCTG GCTGGAGAGG AAAAGCCAGT TCCCTACGAG GAGTGTCCC AATGCTTTGT CCATGATGTC CTIGTTATTT TATTNCCYTT ANAAACTGAN TCCCTNTNTT NTTDCGGCAG TCACMCTNCT GGGRAGTGGC TTAATAGTAA NATCAATAAA NAGNTGAGTC CTNTTAG	1812 1872 1932 1992 2052 2112 2172 2229
(2) 配列番号 19 の情報 :	20
(i) 配列の特徴 :	30
(A) 長さ : 449 アミノ酸	
(B) 型 : アミノ酸	
(D) トポロジー : 直鎖状	
(ii) 配列の種類 : タンパク質	
(xi) 配列 : 配列番号 19 :	
Met Leu Thr Phe Met Ala Ser Asp Ser Glu Glu Glu Val Cys Asp Glu 1 5 10 15	
Arg Thr Ser Leu Met Ser Ala Glu Ser Pro Thr Pro Arg Ser Cys Gln 20 25 30	
Glu Gly Arg Gln Gly Pro Glu Asp Gly Glu Asn Thr Ala Gln Trp Arg 35 40 45	40
Ser Gln Glu Asn Glu Glu Asp Gly Glu Glu Asp Pro Asp Arg Tyr Val 50 55 60	

Cys Ser Gly Val Pro Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Leu Thr
 65 70 75 80
 Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr
 85 90 95
 Leu Cys Met Ile Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Arg Phe Tyr
 100 105 110
 Thr Glu Lys Asn Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr
 115 120 125
 Pro Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Asn Ser Val Leu Asn Thr Leu Ile
 130 135 140
 Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile Phe Leu Val Val Leu Tyr
 145 150 155 160 10
 Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Phe Ile His Gly Trp Leu Ile Met Ser Ser
 165 170 175
 Leu Met Leu Leu Phe Leu Phe Thr Tyr Ile Tyr Leu Gly Glu Val Leu
 180 185 190
 Lys Thr Tyr Asn Val Ala Met Asp Tyr Pro Thr Leu Leu Leu Thr Val
 195 200 205
 Trp Asn Phe Gly Ala Val Gly Met Val Cys Ile His Trp Lys Gly Pro
 210 215 220
 Leu Val Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala
 225 230 235 240
 Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Ser Ala Trp Val Ile Leu
 245 250 255 20
 Gly Ala Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly
 260 265 270
 Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Pro Ile
 275 280 285
 Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Ala Met Val Trp Thr Val Gly Met
 290 295 300
 Ala Lys Leu Asp Pro Ser Ser Gln Gly Ala Leu Gln Leu Pro Tyr Asp
 305 310 315 320
 Pro Glu Met Glu Glu Asp Ser Tyr Asp Ser Phe Gly Glu Pro Ser Tyr
 325 330 335 30
 Pro Glu Val Phe Glu Pro Pro Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Glu Glu Leu
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile
 355 360 365
 Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Asp
 370 375 380
 Trp Asn Thr Thr Leu Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Leu Leu Ala Val Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu
 405 410 415
 Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Phe Ser Thr Asp Asn
 420 425 430 40
 Leu Val Arg Pro Phe Met Asp Thr Leu Ala Ser His Gln Leu Tyr Ile
 435 440 445

(2) 配列番号 20 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1895 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎮の数 : 一本鎮

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : CDS

(B) 存在位置 : 140..1762

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : misc_feature

(B) 存在位置 : 1..1895

(D) 他の情報 : / 注 = 「DmPS」

(xi) 配列 : 配列番号 2 0 :

TATATGAGTC GCTTTAAAC AAAAGAAAGT TTTTACCAAGC TACATTCCTT TGGTTTCCTT	60
AACTAAATCC CATCACACAA CTACGGCTTC GCAGGGGAG CGGTCCAGCG CTACGGAGGC	120
GAACGAACGC ACACCACTG ATG GCT GTC AAT CTC CAG GCT TCG TGC TCC Met Ala Ala Val Asn Leu Gln Ala Ser Cys Ser	172
1 5 10	10
TCC GGG CTC GCC TCT GAG GAT GAC GCC AAT GTG GGC AGC CAG ATA GGC Ser Gly Leu Ala Ser Glu Asp Asp Ala Asn Val Gly Ser Gln Ile Gly	220
15 20 25	
GCG GCG GAG CGT TTG GAA CGA CCT CCA AGG CGG CAA CAG CAG CGG AAC Ala Ala Glu Arg Leu Glu Arg Pro Pro Arg Arg Gln Gln Arg Asn	268
30 35 40	
AAC TAC GGC TCC AGC AAT CAG GAT CAA CCG GAT GCT GCC ATA CTT GCT Asn Tyr Gly Ser Ser Asn Gln Asp Gln Pro Asp Ala Ala Ile Leu Ala	316
45 50 55	
GTG CCC AAT GTG GTG ATG CGT GAA CCT TGT GGC TCG CGC CCT TCA AGA Val Pro Asn Val Val Met Arg Glu Pro Cys Gly Ser Arg Pro Ser Arg	364
60 65 70 75	20
CTG ACC GGT GGA GGA GGC GGC AGT GGT GGT CCG CCC ACA AAT GAA ATG Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Pro Pro Thr Asn Glu Met	412
80 85 90	
GAG GAA GAG CAG GGC CTG AAA TAC GGG GCC CAG CAT GTG ATC AAG TTA Glu Glu Glu Gln Gly Leu Lys Tyr Gly Ala Gln His Val Ile Lys Leu	460
95 100 105	
TTC GTC CCC GTC TCC CTT TGC ATG CTG GTA GTG GTG GCT ACC ATC AAC Phe Val Pro Val Ser Leu Cys Met Leu Val Val Ala Thr Ile Asn	508
110 115 120	
TCC ATC AGC TTC TAC AAC AGC ACG GAT GTC TAT CTC CTC TAC ACA CCT Ser Ile Ser Phe Tyr Asn Ser Thr Asp Val Tyr Leu Leu Tyr Thr Pro	556
125 130 135	
TTC CAT GAA CAA TCG CCC GAG CCT AGT GTT AAG TTC TGG AGT GCC TTG Phe His Glu Gln Ser Pro Glu Pro Ser Val Lys Phe Trp Ser Ala Leu	604
140 145 150 155	30
GCG AAC TCC CTG ATC CTG ATG AGC GTG GTG GTG GTG ATG ACC TTT TTG Ala Asn Ser Leu Ile Leu Met Ser Val Val Val Val Met Thr Phe Leu	652
160 165 170	
CTG ATT GTT TTG TAC AAG AAG CGT TGC TAT CGC ATC ATT CAC GGC TGG Leu Ile Val Leu Tyr Lys Lys Arg Cys Tyr Arg Ile Ile His Gly Trp	700
175 180 185	

CTG ATT CTC TCC TCC TTC ATG TTG TTG TTC ATT TTT ACG TAC TTA TAT Leu Ile Leu Ser Ser Phe Met Leu Leu Phe Ile Phe Thr Tyr Leu Tyr 190 195 200	748
TTG GAA GAG CTT CTT CGC GCC TAT AAC ATA CCG ATG GAC TAC CCT ACT Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ala Tyr Asn Ile Pro Met Asp Tyr Pro Thr 205 210 215	796
GCA CTA CTG ATT ATG TGG AAC TTT GGA GTG GTC GGA ATG ATG TCC ATC Ala Leu Leu Ile Met Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met Met Ser Ile 220 225 230 235	844
CAT TGG CAG GGA CCT CTG CGG TTG CAG CAA GGA TAT CTC ATT TTC GTG His Trp Gln Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Gly Tyr Leu Ile Phe Val 240 245 250	892
GCA GCC TTG ATG GCC TTG GTG TTC ATT AAA TAC CTG CCT GAA TGG ACT Ala Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr 255 260 265	940
GCC TGG GCT GTA TTG GCT GCC ATT TCT ATT TGG GAT CTT ATT GCT GTC Ala Trp Ala Val Leu Ala Ile Ser Ile Trp Asp Leu Ile Ala Val 270 275 280	988
CTT TCG CCA AGA GGA CCC CTC CGC ATT CTG GTG GAA ACG GCT CAG GAG Leu Ser Pro Arg Gly Pro Leu Arg Ile Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu 285 290 295	1036
CGA AAT GAG CAA ATC TTC CCC GCT CTG ATT TAT TCA TCC ACT GTC GTT Arg Asn Glu Gln Ile Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Val Val 300 305 310 315	1084
TAC GCA CTT GTA AAC ACT GTT ACG CCG CAG CAA TCG CAG GCC ACA GCT Tyr Ala Leu Val Asn Thr Val Thr Pro Gln Gln Ser Gln Ala Thr Ala 320 325 330	1132
TCC TCC TCG CCG TCG TCC AGC AAC TCC ACC ACA ACC ACG AGG GCC ACG Ser Ser Ser Pro Ser Ser Asn Ser Thr Thr Thr Arg Ala Thr 335 340 345	1180
CAG AAC TCG CTG GCT TCG CCA GAG GCA GCA GCG GCT AGT GGC CAA CGC Gln Asn Ser Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Ala Ser Gly Gln Arg 350 355 360	1228
ACA GGT AAC TCC CAT CCT CGA CAG AAT CAG CGG GAT GAC GGC AGT GTA Thr Gly Asn Ser His Pro Arg Gln Asn Gln Arg Asp Asp Gly Ser Val 365 370 375	1276
CTG GCA ACT GAA GGT ATG CCA CTT GTG ACT TTT AAA AGC AAT TTG CGC Leu Ala Thr Glu Gly Met Pro Leu Val Thr Phe Lys Ser Asn Leu Arg 380 385 390 395	1324
GGA AAC GCT GAG GCT GCG GGT TTC ACG CAA GAG TGG TCA GCT AAC TTG Gly Asn Ala Glu Ala Gly Phe Thr Gln Glu Trp Ser Ala Asn Leu 400 405 410	1372
AGC GAA CGT GTG GCT CGT CGC CAG ATT GAA GTT CAA AGT ACT CAG AGT Ser Glu Arg Val Ala Arg Arg Gln Ile Glu Val Gln Ser Thr Gln Ser 415 420 425	1420
GGA AAC GCT CAG CGC TCC AAC GAG TAT AGG ACA GTA ACA GCT CCG GAT Gly Asn Ala Gln Arg Ser Asn Glu Tyr Arg Thr Val Thr Ala Pro Asp 430 435 440	1468
CAG AAT CAT CCG GAT GGG CAA GAA GAA CGT GGC ATA AAG CTT GGC CTC Gln Asn His Pro Asp Gly Gln Glu Glu Arg Gly Ile Lys Leu Gly Leu 445 450 455	1516
GGC GAC TTC ATC TTC TAC TCG GTA TTA GTG GGC AAG GCC TCC AGC TAC Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ser Tyr 460 465 470 475	1564

10

20

30

40

GGC GAC TGG ACG ACC ACA ATC GCT TGC TTT GTG GCC ATC CTC ATT GGA Gly Asp Trp Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly 480 485 490	1612
CTC TGC CTC ACT CTT CTG CTT CTG GCC ATT TGG CGC AAG GCG CTA CCC Leu Cys Leu Thr Leu Leu Ala Ile Trp Arg Lys Ala Leu Pro 495 500 505	1660
GCC CTG CCC ATC TCA ATA ACG TTC GGA TTG ATA TTT TGC TTC GCC ACT Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Cys Phe Ala Thr 510 515 520	1708
AGT GCG GTG GTC AAG CCG TTC ATG GAG GAT CTA TCG GCC AAG CAG GTG Ser Ala Val Val Lys Pro Phe Met Glu Asp Leu Ser Ala Lys Gln Val 525 530 535	1756
TTT ATA TAAACTTGAA AAGACAAGGA CACATCAAGT GTCTTACAGT ATCATAGTCT Phe Ile 540	1812
AACAAAGCTT TTTGTAATCC AATTCTTAT TTAACCAAAT GCATAGTAAC AACCTCGACT AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA	1872
	1895

(2) 配列番号 21 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 541 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 21 :

Met Ala Ala Val Asn Leu Gln Ala Ser Cys Ser Ser Gly Leu Ala Ser 1 5 10 15	20
Glu Asp Asp Ala Asn Val Gly Ser Gln Ile Gly Ala Ala Glu Arg Leu 20 25 30	20
Glu Arg Pro Pro Arg Arg Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Gly Ser Ser 35 40 45	20
Asn Gln Asp Gln Pro Asp Ala Ala Ile Leu Ala Val Pro Asn Val Val 50 55 60	20
Met Arg Glu Pro Cys Gly Ser Arg Pro Ser Arg Leu Thr Gly Gly Gly 65 70 75 80	20
Gly Gly Ser Gly Gly Pro Pro Thr Asn Glu Met Glu Glu Gln Gly 85 90 95	20
Leu Lys Tyr Gly Ala Gln His Val Ile Lys Leu Phe Val Pro Val Ser 100 105 110	20
Leu Cys Met Leu Val Val Val Ala Thr Ile Asn Ser Ile Ser Phe Tyr 115 120 125	20
Asn Ser Thr Asp Val Tyr Leu Leu Tyr Thr Pro Phe His Glu Gln Ser 130 135 140	20
Pro Glu Pro Ser Val Lys Phe Trp Ser Ala Leu Ala Asn Ser Leu Ile 145 150 155 160	20
Leu Met Ser Val Val Val Val Met Thr Phe Leu Leu Ile Val Leu Tyr 165 170 175	20
Lys Lys Arg Cys Tyr Arg Ile Ile His Gly Trp Leu Ile Leu Ser Ser 180 185 190	20

Phe Met Leu Leu Phe Ile Phe Thr Tyr Leu Tyr Leu Glu Glu Leu Leu
 195 200 205
 Arg Ala Tyr Asn Ile Pro Met Asp Tyr Pro Thr Ala Leu Leu Ile Met
 210 215 220
 Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met Met Ser Ile His Trp Gln Gly Pro
 225 230 235 240
 Leu Arg Leu Gln Gln Gly Tyr Leu Ile Phe Val Ala Ala Leu Met Ala
 245 250 255
 Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Ala Val Leu
 260 265 270
 Ala Ala Ile Ser Ile Trp Asp Leu Ile Ala Val Leu Ser Pro Arg Gly
 275 280 285
 Pro Leu Arg Ile Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Gln Ile
 290 295 300
 Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Val Val Tyr Ala Leu Val Asn
 305 310 315 320
 Thr Val Thr Pro Gln Gln Ser Gln Ala Thr Ala Ser Ser Ser Pro Ser
 325 330 335
 Ser Ser Asn Ser Thr Thr Thr Arg Ala Thr Gln Asn Ser Leu Ala
 340 345 350
 Ser Pro Glu Ala Ala Ala Ser Gly Gln Arg Thr Gly Asn Ser His
 355 360 365
 Pro Arg Gln Asn Gln Arg Asp Asp Gly Ser Val Leu Ala Thr Glu Gly
 370 375 380
 Met Pro Leu Val Thr Phe Lys Ser Asn Leu Arg Gly Asn Ala Glu Ala
 385 390 395 400
 Ala Gly Phe Thr Gln Glu Trp Ser Ala Asn Leu Ser Glu Arg Val Ala
 405 410 415
 Arg Arg Gln Ile Glu Val Gln Ser Thr Gln Ser Gly Asn Ala Gln Arg
 420 425 430
 Ser Asn Glu Tyr Arg Thr Val Thr Ala Pro Asp Gln Asn His Pro Asp
 435 440 445
 Gly Gln Glu Glu Arg Gly Ile Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe
 450 455 460
 Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ser Tyr Gly Asp Trp Thr Thr
 465 470 475 480
 Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu
 485 490 495
 Leu Leu Leu Ala Ile Trp Arg Lys Ala Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser
 500 505 510
 Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Cys Phe Ala Thr Ser Ala Val Val Lys
 515 520 525
 Pro Phe Met Glu Asp Leu Ser Ala Lys Gln Val Phe Ile
 530 535 540

(2) 配列番号 2 2 の情報 : 40

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 2 2 :

CTNCCNGART GGACNGYCTG G 21

(2) 配列番号 2 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 塩基対 50

【図3】

hPS1	MTELTPALPSYFQNAQMSEDNHLNSNTVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPE	48
mPS1	MTEBIPALPSYFQNAQMSEDNSHSSAIRSQNDSQERQQHQDRQLRDNPNE	48
hPS1	PLSNGRPQGSNSRQVVEQDDEEDEELTLKYGAKHIVMLFVPTILCMVV	96
mPS1	PISNGRPQGSNSRQVVEQDDEEDEELTLKYGAKHIVMLFVPTILCMVV	96
hPS1	VATIKSVSFYTRKDQGQLYTPTFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISIVV	144
mPS1	VATIKSVSFYTRKDQGQLYTPTFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISIVV	144
hPS1	VMTILLVVLKXCYKVKVIIHAWLILISSLLLLFFPSFIYLGEVFKTYNV	192
mPS1	IMTILLVVLKXCYKVKVIIHAWLILISSLLLLFFPSFIYLGEVFKTYNV	192
hPS1	VDYITVALLIWNFGVGWMISIHWKGPLRLQOQAYLIMISALMALVFIKY	240
mPS1	VDYITVALLIWNFGVGWMIAIIHWKGPLRLQOQAYLIMISALMALVFIKY	240
hPS1	LPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAAQERNETLFPALIY	288
mPS1	LPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAAQERNETLFPALIY	288
hPS1	SSTMVWLNVNAEGBDPEAQRRVSKNSKNYNAESTERESDPTVAENIDGGF	336
mPS1	SSTMVWLNVNAEGBDPEAQRRVPKPNKYNTQRAERETDGSGSNDDGGF	336
hPS1	SEEWEAQRDSDHLSGPHRSTPESRAAVQELSSILAGEDPEERGVKLGLG	384
mPS1	SEEWEAQRDSDHLSGPHRSTPESRAAVQELSGSILSTEDPEERGVKLGLG	384
hPS1	DFIFYSVLVGKASATASGDNNTTIACFVAILIGLCLLLLLIAFKKAL	432
mPS1	DFIFYSVLVGKASATASGDNNTTIACFVAILIGLCLLLLLIAFKKAL	432
hPS1	PALPISITFGLVFVYFATDYLVQPFMDQLAHFQFYI	467
mPS1	PALPISITFGLVFVYFATDYLVQPFMDQLAHFQFYI	467

FIG. 3

【 図 4 】

hPS1	-----MT-ELPAPLSYFQNA-QMSEDNHLSNTV	26
hPS2	MLTFMADSSEEEVCDERTSLSMAE5PTPRSC-QEGRGPGEDPE--NTA	45
hPS1	--RSQ-N--DDNRRQEHHNDRR--SLGHPEPLSNSGRPGQNSRQVQEDE	67
hPS2	QWRSQNEENEGD-E--EDPDRVYVCS-GVP----GRPPGL---E--	76
hPS1	EEDEEELTLKYGAKHVINMLFVFPVTLCMVVVVATIKSFSVYTRKDQGLY	115
hPS2	---EEELTLKYGAKHVINMLFVFPVTLCMVVVVATIKSFSVRFYTERKNGOLY	121
hPS1	TPFPTEDTETVQGQLAHSLTINNAIMISVIVVMTILLWVLYKXRYCKVXH	163
hPS2	TPFPTEDTPSVQGQLLNSVILNTLIMISVIVVMTIEWVLYKXRYCKVXH	169
hPS1	AWLIISSLLLLFFPSFIYLGEVFKTYIVNAVYDITVALLI-WNFGVVG	210
hPS2	GWLIMSSIMLLEFLETYIXYLGEVLKTYIVNAMDYPTL-LITWVNEGAVG	216
hPS1	ISIHWKCP1RLQOAYIIMISALMALVF1K1LPWETAWLIL-AVISVD	257
hPS2	VCIHWKCPGLVLOOAYIIMISALMALVF1K1LPWESAWVILGA-ISVVD	263
hPS1	LVAVLCPKGPRLMLVETAAQERNETLFFPAPIYSSSTMVWLVMMAEGBPPE	305
hPS2	LVAVLCPKGPRLMLVETAAQERNEPIFPALIYSSSAMWVTVGMKAQLDP--	309
hPS1	QRRVSKNSKYNAAESTERESQDPTVAEENDGGFSB-EWEAQRDSHLG-PH	351
hPS2	----S-SQGAL-----QLPY----DP----EMB-EDSYDSF-GEP-	334
hPS1	RSTPESRAAVQE--LSSSILAGEPD--EERGVKLGDFIFYFVSLVG	394
hPS2	-SYPE-----VFEPPPLTGYP--GSELEEEERGVKLGDFIFYFVSLVG	375
hPS1	KASATASGQDNTTIAACFVAILISLCLTILLLAFFKKALPALPISITPG	442
hPS2	KAAATGSGQDNTTIAACFVAILIGLCIUTLLLAFFKKALPALPISITPG	423
hPS1	LVFVYFATDYLVQOPPMDQLAHFQFYI	467
hPS2	LIFYFYSTDNLVRPPMDTALASHQLYI	448

FIG. 4

【図5】

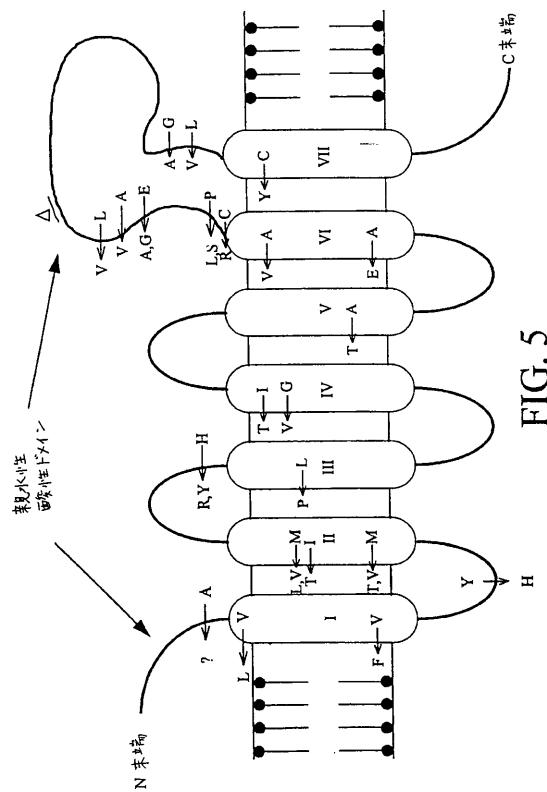


FIG. 5

【図6】

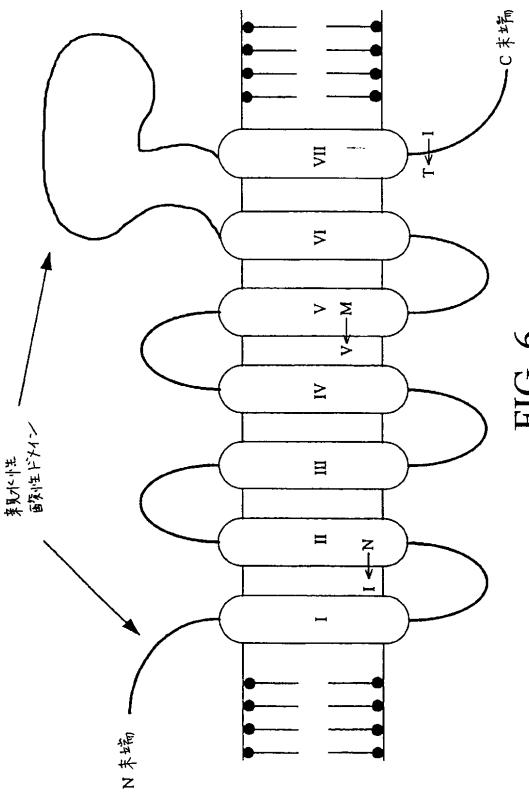


FIG. 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 K	14/47	(2006.01) C 0 7 K 14/47
C 1 2 Q	1/68	(2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01) G 0 1 N 33/53 D
A 6 1 K	38/00	(2006.01) A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	31/7088	(2006.01) A 6 1 K 31/7088
A 6 1 P	25/28	(2006.01) A 6 1 P 25/28
A 0 1 K	67/027	(2006.01) A 0 1 K 67/027
A 6 1 K	48/00	(2006.01) A 6 1 K 48/00

(31)優先権主張番号 08/509,359

(32)優先日 平成7年7月31日(1995.7.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 セイント ジョージ - ヒスロップ, ピーター エイチ.

カナダ国 エム5ピー 3ジー3 オンタリオ, トロント, リッチビュー アベニュー 210

(72)発明者 フレイザー, ポール イー.

カナダ国 エム6エス 3エル9 オンタリオ, トロント, ウィンダーメア アベニュー 61
1

(72)発明者 ロメンズ, ジョアンナ エム.

カナダ国 エム5ティー 2エックス4 オンタリオ, トロント, マックコール ストリート
105

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 Nature, 1995年 8月, Vol.376, p.775-778

Science, 1995年 8月, Vol.269, p.973-977

FEBS, 1996年 2月, Vol.381, p.7-11

Nature, 1995年 6月, Vol.375, p.754-760

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 16/46

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq