

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4356454号  
(P4356454)

(45) 発行日 平成21年11月4日(2009.11.4)

(24) 登録日 平成21年8月14日(2009.8.14)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/705</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 14/705
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 B
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02
<b>G O 1 N</b>	<b>33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 11 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-538373 (P2003-538373)	(73) 特許権者	000000066
(86) (22) 出願日	平成14年10月23日(2002.10.23)		味の素株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/010984		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87) 国際公開番号	W02003/035873	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開日	平成15年5月1日(2003.5.1)		弁理士 川口 嘉之
審査請求日	平成17年7月20日(2005.7.20)	(74) 代理人	100090516
(31) 優先権主張番号	特願2001-325159 (P2001-325159)		弁理士 松倉 秀実
(32) 優先日	平成13年10月23日(2001.10.23)	(74) 代理人	100089244
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 遠山 勉
前置審査		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規グルタミン酸受容体とその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の(A)又は(B)に示すグルタミン酸受容体タンパク質:

(A) 配列番号7に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列においてアミノ酸番号12~584で表されるアミノ酸配列を含むグルタミン酸受容体タンパク質、

(B) 前記(A)に記載されたアミノ酸配列において、1のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含み、かつ、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得るグルタミン酸受容体タンパク質。

【請求項2】

ラットの小腸及び大腸において発現していることを特徴とする請求項1に記載のグルタミン酸受容体タンパク質。 10

【請求項3】

請求項1又は2に記載のグルタミン酸受容体タンパク質をコードするDNA。

【請求項4】

請求項1又は2に記載のグルタミン酸受容体タンパク質をコードするDNAを発現可能な形態で保持する細胞。

【請求項5】

請求項1又は2に記載のグルタミン酸受容体タンパク質をコードするDNAを発現可能な形態で保持する細胞を培地で培養し、同グルタミン酸受容体タンパク質を生成させることを特徴とする、グルタミン酸受容体タンパク質又はそれを保持する細胞の製造法。 20

## 【請求項 6】

請求項 1 又は 2 に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と同タンパク質に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターの探索方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と被検物質とを反応させ、該反応を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストの探索方法。

## 【請求項 8】

前記グルタミン酸受容体タンパク質を含む請求項 4 記載の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる、請求項 6 記載の方法。

10

## 【請求項 9】

前記反応の阻害又は促進を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生するセカンドメッセンジャーにより検出する請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

前記グルタミン酸受容体タンパク質を含む請求項 4 記載の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 11】

前記反応を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生するセカンドメッセンジャーにより検出する請求項 10 記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規グルタミン酸受容体とその利用に関し、詳しくは、グルタミン酸受容体とそれをコードする DNA、ならびにそれらを利用して同受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、及び受容体結合試験等に関する。

背景技術

グルタミン酸は、中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり、その制御異常は、記憶障害、虚血性脳障害、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン氏病、及びハンチントン舞踏病等の進行性脳障害などの病態形成に寄与していると広く考えられている (Mel drum, B. S., Neurology, 1994 Nov; 44 (11 Suppl 8): S14-23; Nishizawa, Y., Life Sci. 2001, Jun 15; 69 (4): 369-81)。そのため、グルタミン酸受容体に関する多くの研究が脳神経系を通じてこれまでなされ、多くの受容体 (イオン型受容体 3 種類、代謝型受容体 8 種類) が中枢神経系で発見され、上記疾患に対する治療薬の開発を目指して、今日もその受容体特異的な作用薬の開発が精力的になされている (詳しくは Barnard, E. A., Trends Pharmacol. Sci., 1997, May; 18 (5): 141-8; Schoepp, D. D., Conn, P. J., Trends Pharmacol. Sci. 1993 Jan; 14 (1): 13-20 を参照)。

30

一方、中枢神経系以外でのグルタミン酸受容体に関する研究は少ない。グルタミン酸は、体内のエネルギー源、不要となったアンモニアのトラップ源としての役割も兼ねており、血漿中に常に数十マイクロモルオーダー以上存在することが知られている。中枢神経系においては、血液脳関門の存在により、細胞外グルタミン酸濃度はナノモル以下である。そのため、上記中枢神経系で発見されたグルタミン酸受容体のグルタミン酸に対する親和性は、ナノモルオーダーからマイクロモルオーダーであり、グルタミン酸が神経終末より放出された時にのみ、作用することができる。尚且つ、グルタミン酸受容体は不活性化あるいはタキフィラキシーを起こしやすいため、中枢神経系においてはグリア細胞が特異的トランスポーターを介して常にグルタミン酸を取りこんで、細胞外濃度を下げている。一方、血液脳関門で守られない中枢神経系以外の場所では、仮にそのようなグルタミン酸受容体が発現していても、常にグルタミン酸受容体が刺激されている状態となり、実際には不

40

50

活化されており機能していないものと考えられていた。

しかし、2001年、Chaudhari, N., Landin, A. M., Roper, S. D.らは、ラット味蕾細胞から、うま味受容体として低親和性グルタミン酸受容体を発見した(Nat. Neurosci. 2000, Feb; 3(2): 113-9)。このうま味受容体は、ラット脳型代謝型グルタミン酸受容体のサブタイプであるタイプ4型(mGluR4)(Tanabe, Y. et al., Neuron, 1992, Jan; 8(1): 169-79; Flor, P. J. et al., Neuropharmacology, 1995, Feb; 34(2): 149-55)と宿主遺伝子を同じとし、スプライシング変異により、脳型mGluR4の細胞外ドメインを一部欠損した味蕾型mGluR4であった。

10

今日我々は、末梢性グルタミン酸受容体の生理機能を示唆する幾つかの知見を有している(Berk, M., Plein, H., Ferreira, D., Clin. Neuropharmacol., 2001, May-Jun; 24(3): 129-32; Karim, F., J. Neurosci. 2001, Jun 1; 21(11): 3771-9; Berk, M., Plein, H., Belsham, B., Life Sci. 2000; 66(25): 2427-32; Carlton, S. M., Coggeshall, R. E., Brain Res. 1999, Feb 27; 820(1-2): 63-70; Haxhiu, M. A., Erokwu, B., Dreshaj, I. A., J. Auton. Nerv. Syst. 1997, Dec 11; 67(3): 192-9; Inagaki, N., FASEB J. 1995, May; 9(8): 686-91; Erdo, S. L., Trends Pharmacol. Sci., 1991, Nov; 12(11): 426-9; Aas, P., Tanso, R., Fonnum, F., Eur. J. Pharmacol. 1989, May 2; 164(1): 93-102; Said, S. I., Dey, R. D., Dickman, K., Trends Pharmacol. Sci. 2001, Jul; 22(7): 344-5; Skerry, T. M., Genever, P. G., Trends Pharmacol. Sci. 2001, Apr; 22(4): 174-81)。

20

ところで、ヒトを含めた哺乳動物が正常に成長(growth)し、正常な生活(健康)を維持するためには、必要な時期に必要な量の栄養素を経口より摂取し、不必要なものは排泄する必要がある。それを実際に行っているのが、口腔、胃、小腸、大腸からなる一本の管である消化管であり、消化吸収プロセスは腸管内在神経叢と外在脳神経系により管理されている。必要な栄養素の摂取判断は、意識に上る経路(味覚)と、意識に上らない自律的な経路(内臓感覚)の脳内における統合により行われる。塩味(ナトリウム、カリウムなど)はミネラルのマーカースとして体液浸透圧の保持等に、甘味(グルコース)は炭水化物のマーカースとしてエネルギー補給に、うま味(グルタミン酸ナトリウム)はタンパク質源のマーカースとしてエネルギー・体蛋白補給、苦味は有害物質のマーカースとしての意味があると考えられている。即ち、味を頼りに、必要な栄養素は摂取される。そして、必要量を十分摂取したかどうかは、胃および小腸、及び肝臓-門脈系に存在する栄養素センサーを介して迷走神経求心路を活性化し、延髄孤束核へ入力され一連の脳内プロセスを得ることによって、満足感(satiety)として判断される(Bray, G. A., Proc. Nutr. Soc., 2000; 59: 373-84; Bray, G. A., Med. Clin. North Am. 1989; 73: 29)。そして、迷走神経遠心路を通じて、消化吸収調節(消化酵素分泌、消化管運動など)が行われると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明である。そして、最終的に満足感が得られると、摂食行動は終了する。万が一、生体にとって有害なもの(毒物)を摂取した場合は、液性および神経性応答を介して、嘔吐、下痢により体外へ排出すると考えられているが、その場合も不明な点が多い。

30

40

一方、消化管における栄養素認識(chemical sense)機構に関する生理学的検討は古くから行われており、消化管内には内容物を知覚するセンサーが存在すると想定されている(詳しくは、Mei, N., J. Auton. Nerv. Syst., 19

50

83; 9: 199 - 206; Mei, N., Lucchini, S., J. Auton. Nerv. Syst., 1992; 41: 15 - 8を参照)。これら消化管センサーとしては、グルコースセンサー (Mei, N., J. Physiol. (Lond.) 1978, 282, 485 - 506)、温度センサー (El Ouazzani, T., Mei, N., Exp. Brain Res. 1979; 15; 34: 419 - 34)、浸透圧センサー (Mei, N., Garnier, L., J. Auton. Nerv. Syst., 1986; 16: 159 - 70)、pHセンサー、アミノ酸センサー (Mei, N., Physiol. Rev., 1985; 65: 211 - 37)、圧センサー (Barber, W. D., Burks, T. F., Gastroenterol Clin. North Am. 1987; 16: 521 - 4) が挙げられる。

10

特に、グルタミン酸を認識するセンサーとしては、新島らが、主として胃、小腸を支配している迷走神経胃枝及び腹腔枝の神経活動を電氣的に捉える手法を用いて、グルタミン酸の消化管内投与時に神経興奮が起こることを見出し、迷走神経終末にグルタミン酸認識機構が存在すると仮定し、グルタミン酸センサーとしてその存在を示唆した (Niijima, A., Physiol. Behav., 1991; 49: 1025 - 8)。

#### 発明の開示

上述のように、グルタミン酸受容体及び消化管センサーについて多くの研究がなされているが、今日まで、グルタミン酸センサーの実体は不明であり、研究の進展は見られていない。グルタミン酸センサーを含んだ消化管粘膜上における栄養素認識に必要な受容機構 (受容体、トランスポーター等) が単離されていないことが、この分野の研究の進展を妨げ

20

ている。本発明者らは、グルタミン酸消化管センサーの実体が解明されれば、下記に挙げる栄養素認識機構の調節を目的とした薬剤等の開発が可能であると考えた。即ち、栄養素認識機構は、満足感 (satiety) あるいは飽きにも重要な役割を果たし、過食による体調不全、および偏食による摂取栄養素の偏りを是正する。この消化管における栄養素認識が正常に行われなくなると、当然ながら、消化吸収の全体のプロセスが乱れ、過食、偏食、食欲不振、消化不良、下痢、便秘等が引き起こされることが考えられる。より医学的には、心因性過食症、拒食症及び肥満症、胃酸分泌異常、消化管血流異常、消化酵素分泌異常等による消化性潰瘍 (胃潰瘍、十二指腸潰瘍)、ストレス性潰瘍、薬物性 (NSAIDs等) 急性潰瘍、虚血性潰瘍 (虚血性大腸炎)、インシュリン分泌異常又は消化管ホルモン分泌異常による糖尿病、運動性機能異常による胃もたれ、むかつき

30

、便秘、下痢、過敏性腸症候群などの要因として考えられる。また、近年、肥満者の急増は社会現象化し、問題となっている。これらの人は基礎代謝が低下した人が多く、また過食傾向にあると言われ、これらの人の食べたいという欲求を如何にコントロールするかは社会的関心が非常に大きい。無理なダイエットを試みる人も多いが、多くの場合、失敗に終わっている。消化管における栄養素認識機構を是正し、食事による満足感を如何に正常に得るかは、これらの人にとっても非常に重要である。

本発明は、上記観点からなされたものであり、消化管グルタミン酸センサーの実体を明らかにし、それを利用した技術を提供することを課題とする。

本発明者らは、代謝型グルタミン酸受容体 (4型) の細胞内ドメインを認識する抗体を用いた免疫組織学的手法により、消化管内における受容体分布を検討した。その結果、小腸・大腸粘膜層には代謝型グルタミン酸4型受容体 (GluR4) 陽性細胞が存在することを見い出した。小腸・大腸では粘液産生細胞 (杯細胞: goblet cell) がmGluR4陽性であった。そして、小腸・大腸サンプルから新規なグルタミン酸受容体と思われるcDNAをクローニングすることに成功した。このグルタミン酸受容体は、これまで実態が不明であった、消化管グルタミン酸センサーである可能性が高く、本受容体cDNA、精製受容体及び本受容体発現細胞は、消化管グルタミン酸センサーの機能調節剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

40

本発明は、上記知見に基づいてなされたものであり、その要旨は以下のとおりである。

(1) 下記性質を有するグルタミン酸受容体タンパク質:

(A) タイプ4型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質と共通の膜貫通ドメイン及び細胞

50

内ドメインを有する、

(B) タイプ4型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質よりも約316又は327アミノ酸残基短い細胞外ドメインを有する。

(2) ラットの小腸及び大腸において発現していることを特徴とする(1)のグルタミン酸受容体タンパク質。

(3) 配列番号7に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列においてアミノ酸番号12~584で表されるアミノ酸配列を有する(1)のグルタミン酸受容体タンパク質。

(4) 1又は複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含み、かつ、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得る(3)のグルタミン酸受容体タンパク質。

10

(5) (1)~(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質をコードし、かつ、タイプ4型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質を発現しないDNA。

(6) (1)~(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質をコードするDNAを発現可能な形態で保持する細胞。

(7) (1)~(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質をコードするDNAを発現可能な形態で保持する細胞を培地で培養し、同グルタミン酸受容体タンパク質を生成させ、前記細胞より前記グルタミン酸受容体タンパク質を採取することを特徴とする、グルタミン酸受容体タンパク質の製造法。

(8) 請求項1~4のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と同タンパク質に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターの探索方法。

20

(9) (1)~(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質と被検物質とを反応させ、該反応を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストの探索方法。

(10) 前記グルタミン酸受容体タンパク質を、(6)の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる(8)の方法。

(11) 前記結合の阻害又は促進を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生するセカンドメッセンジャーにより検出する(10)の方法。

(12) 前記グルタミン酸受容体タンパク質を、(6)の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる(9)の方法。

30

(13) 前記結合の阻害又は促進を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生するセカンドメッセンジャーにより検出する(12)の方法。

(14) (1)~(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質に特異的に結合する抗体。

(15) (1)~(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質と同タンパク質に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを探索する工程と、

前記ステップにより得られるグルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを有効成分として医薬組成物を調製する工程を含む、グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬の製造方法。

40

(16) (1)~(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質と被検物質とを反応させ、該反応を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストを探索する工程と、前記ステップにより得られるグルタミン酸のアゴニストを有効成分として医薬組成物を調製する工程を含む、

グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬の製造方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のグルタミン酸受容体タンパク質は、典型的には、配列表の配列番号7のアミノ酸

50

配列においてアミノ酸番号12～584で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。本タンパク質をコードするラットcDNAの塩基配列のオープンリーディング領域を配列番号6に示す。この配列の5'末端領域には、開始コドンの可能性のあるメチオニンコドンが2個(塩基番号1～3、34～36)見出された。N末端側のメチオニンコドンが開始コドンである可能性が高いが、2番目のメチオニンコドンが開始コドンである可能性もある。いずれにしても、配列番号6に示す塩基配列の上流に適切なプロモーターを連結し、適切な細胞で発現させれば、活性のあるグルタミン酸受容体を産生させることができる。

配列番号7のアミノ酸配列を、脳型代謝型グルタミン酸4型受容体(mGluR4)と比較したところ、C末端側(配列番号7中、アミノ酸番号15～584)は一致していたが、mGluR4に比べてN末端側は300アミノ酸残基以上短かった。後述するように、本発明のグルタミン酸受容体タンパク質は、mGluR4と共通の遺伝子に由来するスプライシング変異体(variant)であると考えられた。以下、本発明のグルタミン酸受容体タンパク質を、本明細書ではmGluR4変異体と呼ぶことがある。

図1に、mGluR4及びmGluR4変異体の構造を示す。mGluR4は、細胞内ドメインと、7つの膜貫通ドメインと、細胞外ドメインからなっている。mGluR4変異体も、mGluR4と細胞内ドメインと7つの膜貫通ドメインを有しており、mGluR4のそれらと同一の配列を有している。一方、細胞外ドメインは、mGluR4変異体は1番目のメチオニンコドンが開始コドンであるとする316アミノ酸残基、2番目のメチオニンコドンが開始コドンであるとする327アミノ酸残基、mGluR4よりも短い。

すなわち、本発明のmGluR4変異体は、タイプ4型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質と共通の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを有し、タイプ4型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質よりも約316又は327アミノ酸残基短い細胞外ドメインを有する。前記mGluR4変異体をコードするcDNA配列を、mGluR4 mRNA配列(O'Hara, et al., Neuron, 11:41, 1993)と比較したところ、これらは共通の遺伝子に由来することが示唆された。すなわち、mGluR4変異体の生成は、mGluR4遺伝子中の第2のエクソンが選択的スプライシング(alternative splicing)により脱落し、フレームシフトが生じるため、第1エクソン中に終止コドンが出現し、さらにその下流に新たに開始コドンが生じた結果であると推定される。

本発明のmGluR4変異体は、ラット由来のものでもよいし、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得るという性質を持つ限り、ヒト、サル、マウス、イヌ、ウシ、ウサギといった哺乳類や鳥類、魚類その他いかなる動物由来のmGluR4変異体でもよい。mGluR4変異体を医薬組成物の成分として用いる場合には、哺乳類由来のものが好ましい。

本発明のmGluR4変異体は、配列番号7に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列においてアミノ酸番号12～584で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質に加えて、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得るという性質を持つ限り、配列番号7に示すアミノ酸配列において1若しくは複数の位置での1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を有するものであってもよい。

ここで、「複数」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、配列番号7に示すアミノ酸配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上となるような数が挙げられる。より具体的には、2～115個、好ましくは、2～58個、より好ましくは2～30個である。

尚、本発明のグルタミン酸受容体は、精製又は単離された形態であってもよいが、活性を必要とする場合は、適切な細胞で発現され、同細胞の膜に局在化した形態、又は、mGluR4変異体が発現した細胞から調製される膜画分に含まれる形態であることが好ましい。したがって、本発明のグルタミン酸受容体には、このようなmGluR4変異体を発現している細胞又は同細胞から調製された膜画分も含まれる。

10

20

30

40

50

mG1uR4変異体は、例えば、mG1uR4変異体をコードするDNAを適当な宿主細胞に導入し、発現させることによって取得することができる。前記DNAとしては、マウス等の哺乳類細胞の染色体から単離したmG1uR4変異体をコードする遺伝子又はcDNAが挙げられる。尚、染色体遺伝子を用いる場合は、mG1uR4変異体を生成させるように、転写後のスプライシング等のプロセスを調節する必要があると考えられるため、cDNAを用いることが好ましい。

mG1uR4変異体cDNAは、ラット等の哺乳動物の小腸又は大腸から調製したRNAを鋳型とし、例えば配列番号1~5に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、mG1uR4変異体cDNAを増幅することによって、クローニングすることができる。また、本発明により、mG1uR4変異体の構造、特にN末端領域の特徴的な構造が明らかになったので、それらの構造に基づいて、mG1uR4変異体cDNAのクローニング及び同定は容易に行うことができる。こうして得られるmG1uR4変異体cDNAのオープンリーディング領域塩基配列が、配列番号6に示した配列である。

mG1uR4変異体をコードするDNAとしては、配列番号6に示す塩基配列以外にも、この塩基配列を有するDNA又は同塩基配列から調製され得るプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、mG1uR4変異体をコードするDNAが挙げられる。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、好ましくは75%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のスザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

mG1uR4変異体をコードするDNAを導入する細胞としては、mG1uR4変異体の活性を必要とする場合は、動物細胞、昆虫細胞又は酵母が好ましく、動物細胞が特に好ましい。例えば、mG1uR4変異体をコードするDNAを含む組換えベクターを導入し、一時的な機能発現が可能と考えられる細胞として、アフリカツメガエル卵母細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、baby hamster kidney(BHK)細胞、human embryonic kidney(HEK)細胞、Sf-9 insect細胞、PC12細胞、COCA-2細胞等が挙げられる。また、mG1uR4変異体をコードするDNAを染色体DNAに組み込み、mG1uR4変異体を永久的に発現させる場合には、上記の細胞のうち、アフリカツメガエル卵母細胞以外の細胞が挙げられる。

一方、mG1uR4変異体を、mG1uR4変異体に特異的に結合する抗体を作製するための免疫源として用いる場合のように、生理活性を必要としない場合には、mG1uR4変異体をコードするDNAを導入する細胞は、mG1uR4変異体を活性のある形態で発現しない細胞であってもよい。そのような細胞としては、エシェリヒア・コリをはじめとする異種蛋白質生産に通常用いられている微生物細胞を用いることができる。

mG1uR4変異体を宿主細胞中で産生させるためには、宿主細胞に適したプロモーターおよびエンハンサー等の発現調節配列に、mG1uR4変異体をコードするDNAを連結する。また、mG1uR4変異体をコードするDNAは、必要に応じて、プロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含んでいてもよい。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルス等に由来するプロモーターである。

細胞へのDNAの導入等の操作に必要な技術は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

10

20

30

40

50

上記のようにして得られる mGluR4 変異体をコードする DNA を発現可能な形態で保持する細胞を培地で培養し、mGluR4 変異体を生成させることにより、mGluR4 変異体及び mGluR4 変異体を保持する細胞を製造することができる。

活性な mGluR4 変異体、すなわちグルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得る mGluR4 変異体は、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターの探索等に利用することができる。例えば、mGluR4 変異体と、mGluR4 変異体に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーター（以下、これらを「リガンド」と総称することができる）を探索することができる。アロステリックモジュレーターは、mGluR4 変異体とグルタミン酸との結合部位以外の部位に結合し、アゴニスト又はアンタゴニストと同様の機能を示す。

10

また、グルタミン酸のアゴニストは、mGluR4 変異体と被検物質とを反応させ、該反応を検出することによっても、探索することができる。

活性な mGluR4 変異体としては、mGluR4 変異体を発現している細胞、又は同細胞から調製される膜画分が挙げられる。このような膜画分は、例えば、上記のように細胞に活性な mGluR4 変異体を発現させ、そして、細胞を超音波などで破碎後、密度勾配遠心法で膜画分を集めることにより調製することができる。

また、前記 mGluR4 変異体に結合する物質として、グルタミン酸もしくはグルタミン酸アゴニスト、又は mGluR4 に結合する公知のリガンド（L-AP4、CPPG、MAP-4 等）等が挙げられる。mGluR4 変異体の活性を調節する物質としては、細胞内カルシウム濃度に影響を与える薬剤（カルシウムチャンネルおよびナトリウムチャンネルオープナー、Na/Kポンプ阻害剤、Na/Ca交換系作用剤、Ca-ATPase阻害剤、プロテインキナーゼC作用剤）、細胞内 cAMP 濃度に影響を与える薬剤（フォスフォジエステラーゼ作用剤、アデニレートシクラーゼ作用剤）、細胞内 cGMP 濃度に影響を与える薬剤（cGMP 依存性フォスフォジエステラーゼ作用剤、グアニレートシクラーゼ作用剤）等が挙げられる。

20

mGluR4 変異体と、これに結合する物質との反応の阻害又は促進は、mGluR4 変異体にグルタミン酸等のリガンドが結合することによって発生するセカンドメッセンジャーを検出することによって、検出することができる。また、セカンドメッセンジャーを検出する代わりに、既知のリガンドを標識したものを用い、標識リガンドと mGluR4 変異体との結合を測定することによっても、前記反応の阻害又は促進を検出することができる。

30

また、mGluR4 変異体とグルタミン酸のアゴニストとの反応は、mGluR4 変異体とグルタミン酸のアゴニストとの結合により発生するセカンドメッセンジャーを検出することによって、検出することができる。

mGluR4 変異体は、細胞内ドメインは脳型及び味蕾型 mGluR4 と同一であり、脳型及び味蕾型 mGluR4 の細胞内シグナル伝達機序は同じであるから、mGluR4 変異体も同様であると予想される。したがって、前記セカンドメッセンジャーは、Gi (inhibitory GTP binding protein) を活性化しアデニレートシクラーゼを抑制することに伴う、細胞内 cAMP 産生の抑制である。また、シグナル伝達における cAMP の下流には、cAMP-responsive element 調節を介した遺伝子発現調節によるものと、細胞質・膜蛋白の磷酸化による急性期の機能調節がある。したがって、cAMP の細胞内蓄積量変化の計測、細胞内 Ca-ATPase 活性調節を介する細胞内カルシウム濃度変化の測定、チャンネル機能変化の測定等によって、セカンドメッセンジャーを検出することができる。

40

以下に、mGluR4 変異体を用いたリガンド探索の具体的な方法を例示する。

(1) アフリカツメガエル卵母細胞に、mGluR4 変異体 cRNA と、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) cRNA を共発現させ、2電極ボルテージクランプ法により、CF

50

TRに由来するクロライド電流の増強或いは減弱を指標に、mGluR4変異体に作用するリガンド検索を行う(Uezono et al., Receptors Channels 1993; 1(3): 233-41; Cunningham SA et al., Am. J. Physiol 1992 Mar; 262(3 pt 1): C783-8)。尚、CFTRは嚢胞性肺繊維症の疾患原因遺伝子産物であり、細胞内のcAMPにより活性が調節されるクロライドチャンネルである。

(2) mGluR4変異体発現細胞とリガンド候補化合物とを一定期間共存させた後、発現細胞の細胞内cAMP量を用いて計測し、cAMPの増加または減少によりリガンド検索を行う(Chaudhari N, Nat Neurosci 2000 Feb; 3(2): 113-9; Flor PJ, Neuropharmacology 1995 Feb; 34(2): 149-55)。cAMP量は、市販のアッセイキットを用いて測定することができる。

(3) mGluR4変異体発現細胞又は同細胞から調製した膜画分に、リガンド候補化合物、及びmGluR4に作用する既知のリガンド(例えばグルタミン酸、L-AP4、CPPG、MAP-4等)を一定期間作用させ、mGluR4変異体発現細胞の細胞膜又は膜画分に結合した既知リガンドの量を測定することにより、リガンド検索を行う(Naples MA, Neuropharmacology 2001; 40(2): 170-7; Thomsen C, Neuropharmacology 1997 Jan; 36(1): 21-30; H.I. Yamamura, S.J. Enna and M.J. Kuhar eds, 1958, Neurotransmitter Receptor Binding, 2nd ed., Raven Press, New York)。既知リガンドの量は、それらの物質の一部を放射活性ラベルし、細胞膜又は膜画分に結合する放射活性の量により、測定することができる。

(4) mGluR4変異体発現細胞に、あらかじめカルシウム感受性色素(例えばFura-2、Indo-1、Fluo-3等)を導入し、リガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたときの蛍光強度比(細胞内カルシウム濃度)変化を指標として、リガンド検索を行う。あるいは、mGluR4変異体アゴニストと、リガンド候補化合物と、カルシウム感受性色素を導入したmGluR4変異体発現細胞とを一定期間接触させたときの蛍光強度比(細胞内カルシウム濃度)変化により、リガンド検索を行う。

(5) mGluR4変異体発現細胞に、あらかじめcAMP感受性蛍光蛋白質(例えばFICHR等)を導入し、リガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたときの蛍光強度比(細胞内cAMP濃度)変化を指標として、リガンド検索を行う(Adams SR, Nature 1991 Feb 21; 349(6311): 694-7)。

(6) リガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたとき、あるいは、mGluR4変異体作動薬とリガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたときのプロトン産生量をサイトセンサーにより測定し、プロトン産生量を指標としてリガンド検索を行う(McConnell HM, Science 1992 Sep 25; 257(5078): 1906-12)。

上記のようにして検索されるグルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを有効成分として含む医薬組成物は、グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬として使用することができる。セカンドメッセンジャーを調節することによって、グルタミン酸受容体異常に起因する疾患、病態を改善、予防することができる。

グルタミン酸受容体異常に起因する迷走神経制御異常としては、求心路異常(栄養素認識障害)と遠心路異常がある。求心路異常に起因する疾患又は病態としては、過食症、拒食症及び肥満症等が挙げられる。また、遠心路異常に起因するものとしては、胃酸分泌異常、消化管血流異常、消化酵素分泌異常等による消化性潰瘍(胃潰瘍、十二指腸潰瘍)、ストレス性潰瘍、薬物性(NSAIDs等)急性潰瘍、虚血性潰瘍(虚血性大腸炎)、イン

10

20

30

40

50

シュリン分泌異常又は消化管ホルモン分泌異常による糖尿病、過食症、拒食症、肥満症、及び、運動性機能異常による胃もたれ、むかつき、便秘、下痢、過敏性腸症候群などが挙げられる。

mGluR4変異体を免疫源として用いることにより、mGluR4変異体に特異的に結合する抗体を作製することができる。特に、mGluR4変異体はN末端が新規なアミノ酸配列を有しているため、この部分をエピトープとする抗体、特にモノクローナル抗体は、mGluR4変異体に結合し、他のグルタミン酸受容体には結合しないと予想される。mGluR4変異体に特異的な抗体は、mGluR4変異体特異的な免疫染色等に用いることができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 実施例1 ラット腸組織からの新規な代謝型グルタミン酸受容体cDNAのクローニング

ウイスター(Wistar)ラット(CRJ)の小腸及び大腸試料由来の全RNAを鋳型として、superscript(Gibco-BRL社)及びSMART(Switching Mechanism at 5'end of RNA Transcript) RACE(rapid amplification of cDNA ends) cDNA amplification kit(Clontech社)を用いて逆転写を行った。得られたcDNAを鋳型として、LA Taq(Takara)を用いた5'-RACE及びそれに続くnested PCRによって、ラットmGluR4の5'末端フラグメントを増幅した。

遺伝子特異的プライマー(R-mGluR4: 5'-GAA GTT GAC GTT CCT GAT GTA CT-3'(配列番号1), R2-mGluR4: 5'-ACA GCG TCA ATC ACG AAC TGC AC-3'(配列番号2))は、脳型mRNA配列(O'Hara, et al., Neuron, 11:41, 1993)に基づいて合成した。

SMART-RACE kitからのプライマー(Universal primer mix: Long 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT-3'(配列番号3), Short 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'(配列番号4), 及びNested universal primer: 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT-3'(配列番号5))は、5'-RACE PCRを行うために用いた。

約30ngのラットcDNAを、遺伝子特異的プライマーR-mGluR4及びUniversal primer mixを用いて、10µlの10xLA PCR buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM dNTP mixture及び0.25 unitsのLa Taq酵素中で、増幅した。

PCRは、GeneAmp PCR system 9700を用いて、94 20秒、50 1分、及び68 3分を40サイクル行った後、68 10分の伸長を行った。

得られた反応産物は、R2-mGluR4及びNested universal primerを用いて、上記と同じ条件で再度増幅し、300bpの断片が得られた。

増幅産物は、アガロース電気泳動によって分離し、TA cloning kit(Invitrogen社)を用いて、二重プロモーター(Dual Promoter)を持つpCR-II vectorにクローニングした。

上記フラグメントについて、ABI Sequencer Model 3700(ABI社)を用いて塩基配列を解析したところ、大腸から010411-70及び010411-66、010528-3、小腸から010528-37と名付けられたクローンが同定された。これらは同一の塩基配列を含んでいた。

上記各クローンから決定された塩基配列を、配列番号6に示す。また、この塩基配列に含まれるオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列を配列番号7に示す。この塩基配列を脳のmGluR4 mRNA配列(O'Hara, et al.,

10

20

30

40

50

Neuron, 11:41, 1993)と比較したところ、配列番号6の塩基配列では、1724位のシトシンは1880位のアデニンに直接結合しており(塩基の位置は、mGluR4 mRNAを基準とする)、155bpのフラグメントが抜け落ちていた。1724位のシトシンの上流領域におけるフレームシフトにより、1684位又は1717位から始まる開始コドンによりコードされるメチオニンをN末端とする新規なペプチド(配列番号8)が翻訳され、このペプチドはグルタミン酸受容体の細胞外ドメインに位置する343位のグリシンに結合すると考えられた。残りの配列は、脳型受容体と同一の配列であった。尚、配列番号6及び配列番号7には、1684位から始まるコドンを開始コドンとして示した。2つのメチオニンコドンのいずれが開始コドンであるかは不明であるが、いずれにしても、オープンリーディングフレームと周辺配列を細胞に導入して発現させれば、生体中で発現している発現産物と同じ発現産物が得られると予想される。

10

上記オープンリーディングフレームがコードするタンパク質は、配列番号7に示すアミノ酸配列の1番目のメチオニンがN末端であるとした場合、分子量は約88kDである。N末端の14アミノ酸は、mGluR4 mRNAによりコードされるアミノ酸配列には存在しない配列である。

以上のことから、得られたクローンは、新規な細胞外ドメインを有するmGluR4のサブライシング変異体(variant)であることが示された。

#### 実施例2 免疫染色手法によるグルタミン酸受容体局在の同定

##### <1>ラット小腸及び大腸の切片標本の作製

ラット(Wistar系、雄、10~15週齢)をエーテル麻酔下で心臓右心耳を切開して放血し、その後すぐ小腸および大腸を採材した。小腸は胃幽門より約5センチの部分、大腸は回盲開口部より約7センチ肛門側の部分を採材した。消化物が多量に腸内に残っている場合は、生理食塩水で腸管を洗浄した。

20

切り出した腸管は切り開き、コルクボードに針で貼り付け、4%パラホルムアルデヒド(4)で一昼夜振蕩し、浸漬固定した。その後20%Sucrose-PBSに3~4日浸漬して凍結保護(Cryoprotection)した後、Tissue-Tek<sup>R</sup>(OCT compound)に包埋し、クリオスタットで5-7μmに薄切した。切片は室温にて乾燥させた後、各種染色に用いるまで4で保存した。

##### <2>抗代謝型グルタミン酸受容体抗体による免疫染色

切片の免疫染色は、Drengk, A. C. et al., J. Auto. Nerv. Sys. 78:109-112, 2000、及びMiampamba, M. et al., J. Auto. Nerv. Sys. 77:140-151, 1999に記載の方法に準じて行った。切片はまずPBSで洗浄した後、内因性ペルオキシダーゼによる反応を阻止するために、3%過酸化水素・メタノールで15分処理した。次に、切片をPBSで洗浄した後、10%正常馬血清を含む1%牛血清アルブミン添加PBS(1%BSA-PBS)を用いて1時間ブロッキングを行った。再びPBSで洗った後、1%正常馬血清を含む1%BSA-PBSで希釈した一次抗体(表1)を4で2晩反応させた。その後、切片をPBSで洗浄し、1%BSA-PBSで希釈した二次抗体(表1)を室温で1時間反応を行った。最後にVectorstain elite kit(Vector)を用いてABC(アビジン-ビオチン複合体)反応を行い、0.025%ジアミノベンチジン-0.25%塩化ニッケル-0.01%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で発色させた。反応終了後、切片をPBSで洗い、エタノール・キシレンで脱水、封入の後、顕微鏡にて観察した。一次抗体を用いないものをネガティブコントロールとした。使用した一次抗体、二次抗体の種類及び希釈倍率を、表1に示す。

30

40

表 1

一次抗体	一次抗体希釈倍率	二次抗体	一次抗体希釈倍率
anti-mGluR1a, rabbit, polyclonal, Chemicon, cat# AB1551	100	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150
anti-mGluR2/3, rabbit, polyclonal, Chemicon, cat# AB1553	100	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150
anti-mGluR4a, rabbit, Upstate Biotechnology, cat# 06-765	400	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150
anti-mGluR5, rabbit, polyclonal, Chemicon, cat# AB5323	400	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150

10

20

30

### < 3 > アルシアンブルー・PAS染色

切片は流水で洗い、3%酢酸に親和させた後に、アルシアンブルー液(pH 2.5、和光)で30~40分反応させた。次に流水で洗浄し、1%過ヨウ素酸溶液に10分間浸した後、シッフ試薬(Schiff's Reagent)(和光)で8~10分ほど反応させた。これによりムチンを染色し、腸管の杯細胞(goblet cell)を同定した。切片を再び流水で洗浄した後、最後にマイヤーのヘマトキシリン(Mayer's hematoxylin)(和光)で核染色し、色出しした後に、脱水・封入を行った。

### < 4 > 結果

免疫染色の結果を図2に示す。小腸(図2A)および大腸(図2B)では抗mGluR4により杯細胞が染色された。杯細胞には、mGluR4受容体は発現していないと一般的に考えられている。したがって、mGluR4変異体は、杯細胞に発現していると考えられ、機能的には粘液分泌との関連が示唆された。

40

### 実施例3 新規mGluR4変異体の機能の推定

ラット(Wistar系、雄、8~10週齢:日本チャールズリバー)を18時間絶食後、ウレタン麻酔(1g/kg, i.p.)下に開腹し、実態顕微鏡下で迷走神経腹腔枝を5mm前後剥離した。迷走神経束を切断後、小型オペ台(8x6mm)上に迷走神経束をのせて、周囲の脂肪及び結合組織を注意深く剥離し、その臓器側末端繊維を記録用のプラチナ製双極電極に載せ、流動パラフィン・ワセリン(1:1)混合液で周囲組織と絶縁した。また、MSG(L-グルタミン酸ナトリウム、味の素株式会社製)の投与ルートとして、経口で胃内および十二指腸起始部にシリコンチューブを留置した。

50

神経活動電位は、微小電位増幅器（WPI社製DAM-80）により10000倍に増幅し、ベッセルフィルター（4-pole, High Cut 10Hz, Low Cut 1kHz）によりノイズを低減させた後、A/D変換（Powerlab 4sp, ADI Instruments社製）後、コンピュータに取り込んだ（sampling rate 3kHz, iBook）。同時に、増幅信号をオシロスコープでモニタしながらウィンドー・ディスクリミネータ（ダイヤモンド社製DSE-435）によりノイズ成分と神経信号成分を分離し、スパイクカウンタ（Spike Counter、ダイヤモンド社製DSE-335P）で5秒積算後、チャートレコーダ（日本光電製WT-465G）で記録した。スパイク波形の解析は、SHEソフトウェア（ADI Instruments社製）を用いた。

10

結果を図3に示す。十二指腸内にMSG 150mMを投与した時の迷走神経腹腔枝の求心活動は亢進した。迷走神経求心路は内臓感覚、特に、胃および腸からの栄養情報を延髄孤束核に送り込み、満足感、不快感などの食後感覚、及び迷走神経遠心路調節による消化調節を行うシグナル伝導路と考えられている。したがって、MSGの消化管内投与により迷走神経求心路活動が亢進したことは、MSGがそのシグナル発生要因であり、消化管内腔に発現しているmGluR4変異体が、そのシグナル発生を仲介している可能性を示している。

#### 寒施例4 新規mGluR4変異体発現細胞の作製

##### <1>新規mGluR4変異体発現細胞の作製

新規mGluR4変異体の全長cDNAを、再度PFUポリメラーゼ（promega）を用いてRT-PCR法により増幅した。その後、Echoクロニングキット（Invitrogen社）を用いて常法に従いpUni-V5-His-TOPOにクロニング後、プラスミド融合法によってpcDNA3.1Eに組み込んだ。

20

作製したベクター（pcDNA3.1E）は、polyfect試薬（Qiagen社）を用いてCHO-K1細胞（大日本製薬株式会社）に導入した。48時間後、培養液（Modified Eagle Medium（MEM）、10%牛胎児血清、100U/mLペニシリンを含有；ナカライテスク）中にネオマイシン（600μg/mL）を添加し、2、3週間培養を継続して、遺伝子導入細胞の選別を行った。選別したCHO-K1細胞は、RT-PCR法により新規mGluR4変異体のmRNAの発現を確認後、機能評価に必要な細胞数にまで増殖させた。

30

##### <2>cAMP測定によるmGluR4変異体遺伝子の機能測定

上記で得た変異体発現細胞は、プレート（24-well）に $2.5 \times 10^5$  cells/wellとなるように分注し、20時間培養後、cAMP機能測定に用いた。各プレートはDulbecco'sリン酸緩衝液でよく洗浄し、20分間インキュベーションを行った。その後、各薬剤で10分間、37℃で刺激を行った。刺激後速やかに氷冷した2.5% perchloric acid（PCA）で30分処理し、KOHで中和後、遠心上清を得た（12,000rpm×10min, 4℃）。上清液中のcAMP含量は、cAMP assay kit（Amersham）を用いて一般的な酵素免疫法（ELISA）により定量した。

その結果、mGluR4変異体発現細胞中のcAMP量は、フォスホジエステラーゼ阻害剤（isobutyl-methyl-xanthine；IBMX；100μM）およびアデニルシクラーゼ活性化剤（forskolin；10μM）処置により、約9倍上昇した。本条件下において、グルタミン酸（1mM）および食塩（1mM）の作用を比較したところ、cAMP量は食塩添加群（コントロール）では1519 fmole（n=3）であり、グルタミン酸添加群では1235 fmole（n=3）であった。よって、mGluR4変異体発現細胞中のcAMP蓄積量は、グルタミン酸添加により約19%減少することが判明した。本実験結果より、新規mGluR4変異体は、ミリモルオーダーのグルタミン酸と反応し、cAMPを介するシグナルトランスダクション系を変動させることが明らかとなった。

40

#### 産業上の利用の可能性

50

本発明により、新規な代謝型グルタミン酸受容体が提供される。本グルタミン酸受容体は、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーター  
の探索に用いることができる。また、小腸、大腸等の消化管における代謝異常による疾患  
、症状を改善する医薬として用いることができる。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.  
 <120> Novel Glutamic Acid Receptor and the Use Thereof  
 <130> C013-OP1435  
 <140> 2002-10-23 10  
 <150> JP 2001-325159  
 <151> 2001-10-23  
 <160> 8  
 <170> PatentIn Ver. 2.0  
 <210> 1 20  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer  
 <400> 1  
 gaagttgacg ttccctgatgt act 23 30  
 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer  
 <400> 2 40  
 acagcgtaaa tcacgaactg cac 23  
 <210> 3  
 <211> 45  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg glaacaacgc agagt 45

<210> 4

10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

ctaatacgac tcactatagg gc 22 20

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

aagcagtggt aacaacgcag agt 23 30

<210> 6

<211> 1755

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

40

<222> (1)..(1755)

<400> 6

atg cca ggg gta tca tca tct ttg cca acg agg atg aca tca ggg ttc 48

Met Pro Gly Val Ser Ser Ser Leu Pro Thr Arg Met Thr Ser Gly Phe

1

5

10

15

gac cga tac ttc tcc agc cgc acg ctg gac aac aac agg cgc aac atc	96	
Asp Arg Tyr Phe Ser Ser Arg Thr Leu Asp Asn Asn Arg Arg Asn Ile		
20 25 30		
tgg ttt gcc gag ttc tgg gag gac aac ttc cat tgc aag ttg agc cgc	144	
Trp Phe Ala Glu Phe Trp Glu Asp Asn Phe His Cys Lys Leu Ser Arg		
35 40 45		
cac gcg ctc aag aag gga agc cac atc aag aag tgc acc aac cga gag	192	
His Ala Leu Lys Lys Gly Ser His Ile Lys Lys Cys Thr Asn Arg Glu		
50 55 60		
cgc atc ggg cag gac tgc gcc tat gag cag gag ggg aag gtg cag ttc	240	10
Arg Ile Gly Gln Asp Ser Ala Tyr Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe		
65 70 75 80		
gtg att gac gct gtg tac gcc atg ggc cac gcg ctg cac gcc atg cac	288	
Val Ile Asp Ala Val Tyr Ala Met Gly His Ala Leu His Ala Met His		
85 90 95		
cgt gac ctg tgt ccc gcc cgc gta gga ctc tgc cct cgc atg gac ccc	336	
Arg Asp Leu Cys Pro Gly Arg Val Gly Leu Cys Pro Arg Met Asp Pro		
100 105 110		
gtg gat ggc acc cag ctg ctt aag tac atc agg aac gtc aac ttc tca	384	
Val Asp Gly Thr Gln Leu Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Ser		20
115 120 125		
ggc att gcg ggg aac cct gta acc ttc aat gag aac gga gac gca ccg	432	
Gly Ile Ala Gly Asn Pro Val Thr Phe Asn Glu Asn Gly Asp Ala Pro		
130 135 140		
ggg cgc tac gac atc tac cag tac caa ctg cgc aat ggc tgc gcc gag	480	
Gly Arg Tyr Asp Ile Tyr Gln Tyr Gln Leu Arg Asn Gly Ser Ala Glu		
145 150 155 160		
tac aag gtc atc gcc tgc tgg aca gac cac ctg cac ctc aga ata gag	528	
Tyr Lys Val Ile Gly Ser Trp Thr Asp His Leu His Leu Arg Ile Glu		
165 170 175		
cgg atg cag tgg cca ggg agt ggc cag cag ctg ccg cgc tcc atc tgc	576	30
Arg Met Gln Trp Pro Gly Ser Gly Gln Gln Leu Pro Arg Ser Ile Cys		
180 185 190		
agt ctg ccc tgc cag ccc ggg gag cga aag aag act gtg aag ggc atg	624	
Ser Leu Pro Cys Gln Pro Gly Glu Arg Lys Lys Thr Val Lys Gly Met		
195 200 205		
gct tgc tgc tgg cac tgc gag ccc tgc acc ggg tac cag tac caa gtg	672	
Ala Cys Cys Trp His Cys Glu Pro Cys Thr Gly Tyr Gln Tyr Gln Val		
210 215 220		
gac cgc tac acc tgt aag acc tgc ccc tac gac atg cgg ccc aca gag	720	
Asp Arg Tyr Thr Cys Lys Thr Cys Pro Tyr Asp Met Arg Pro Thr Glu		40
225 230 235 240		
aac cgc acg agc tgc cag ccc atc ccc atc gtc aag ttg gag tgg gac	768	

Asn	Arg	Thr	Ser	Cys	Gln	Pro	Ile	Pro	Ile	Val	Lys	Leu	Glu	Trp	Asp				
				245					250					255					
tcg	ccg	tgg	gcc	gtg	ctg	ccc	ctc	ttc	ctg	gcc	gig	gtg	ggc	atc	gcc	816			
Ser	Pro	Trp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Phe	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Ile	Ala				
			260					265					270						
gcc	acg	ctg	ttc	gtg	gtg	gtc	acg	ttt	gtg	cgc	tac	aac	gat	acc	ccc	864			
Ala	Thr	Leu	Phe	Val	Val	Val	Thr	Phe	Val	Arg	Tyr	Asn	Asp	Thr	Pro				
		275					280					285							
atc	gtc	aag	gcc	tcg	ggc	cgg	gaa	ctg	agc	tac	gtg	ctg	ctg	gcg	ggc	912			
Ile	Val	Lys	Ala	Ser	Gly	Arg	Glu	Leu	Ser	Tyr	Val	Leu	Leu	Ala	Gly			10	
	290				295					300									
atc	ttt	ctg	tgc	tac	gcc	act	acc	ttc	ctc	atg	atc	gca	gag	ccg	gac	960			
Ile	Phe	Leu	Cys	Tyr	Ala	Thr	Thr	Phe	Leu	Met	Ile	Ala	Glu	Pro	Asp				
305					310					315					320				
ctg	ggg	acc	tgt	tcg	ctc	cgc	cgc	atc	ttc	cta	ggg	ctc	ggc	atg	agc	1008			
Leu	Gly	Thr	Cys	Ser	Leu	Arg	Arg	Ile	Phe	Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Ser				
			325						330				335						
atc	agc	tac	gcg	gcc	ctg	ctg	acc	aag	acc	aac	cgc	att	tac	cgc	atc	1056			
Ile	Ser	Tyr	Ala	Ala	Leu	Leu	Thr	Lys	Thr	Asn	Arg	Ile	Tyr	Arg	Ile				
			340					345				350							20
ttt	gag	cag	ggc	aaa	cgg	tcg	gtc	agt	gcc	ccg	cgt	ttc	atc	agc	ccg	1104			
Phe	Glu	Gln	Gly	Lys	Arg	Ser	Val	Ser	Ala	Pro	Arg	Phe	Ile	Ser	Pro				
			355				360					365							
gcc	tcg	cag	ctg	gcc	atc	acc	ttc	atc	ctc	atc	tcc	ctg	cag	ctg	ctc	1152			
Ala	Ser	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Phe	Ile	Leu	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Leu				
			370				375				380								
ggc	atc	tgc	gtg	tgg	ttc	gtg	gig	gac	ccc	tcc	cac	tcg	gtg	gtg	gac	1200			
Gly	Ile	Cys	Val	Trp	Phe	Val	Val	Asp	Pro	Ser	His	Ser	Val	Val	Asp				
385					390					395					400				
ttc	cag	gac	caa	cgg	aca	ctt	gac	ccc	cgc	ttt	gcc	agg	ggc	gtg	ctc	1248			30
Phe	Gln	Asp	Gln	Arg	Thr	Leu	Asp	Pro	Arg	Phe	Ala	Arg	Gly	Val	Leu				
			405					410					415						
aag	tgc	gac	atc	tcg	gac	ctg	tcc	ctc	atc	tgc	ctg	ctg	ggc	tac	agc	1296			
Lys	Cys	Asp	Ile	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Ser				
			420					425					430						
atg	ctg	ctg	atg	gtc	acg	tgt	act	gtg	tac	gcc	atc	aag	acc	cga	ggc	1344			
Met	Leu	Leu	Met	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Tyr	Ala	Ile	Lys	Thr	Arg	Gly				
			435				440					445							
gtg	ccc	gag	acc	ttc	aac	gag	gcc	aag	ccc	atc	ggc	ttc	acc	atg	tac	1392			
Val	Pro	Glu	Thr	Phe	Asn	Glu	Ala	Lys	Pro	Ile	Gly	Phe	Thr	Met	Tyr				
	450					455					460								40
acc	acc	tgc	att	gtc	tgg	ctg	gcc	ttc	atc	ccc	atc	ttt	ttt	ggc	acc	1440			
Thr	Thr	Cys	Ile	Val	Trp	Leu	Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Phe	Phe	Gly	Thr				





450		455		460	
Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr					
465		470		475	480
Ser Gln Ser Ala Asp Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Val					
		485		490	495
Ser Val Ser Leu Ser Ala Ser Val Ser Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro					
		500		505	510
Lys Val Tyr Ile Ile Leu Phe His Pro Glu Gln Asn Val Pro Lys Arg					
		515		520	525
Lys Arg Ser Leu Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Asn Lys					
		530		535	540
Phe Thr Gln Lys Gly Asn Phe Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Ser Glu					
545		550		555	560
Leu Cys Glu Asn Leu Glu Thr Pro Ala Leu Ala Thr Lys Gln Thr Tyr					
		565		570	575
Val Thr Tyr Thr Asn His Ala Ile					
		580			

10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

20

&lt;400&gt; 8

Met Pro Gly Val Ser Ser Ser Leu Pro Thr Arg Met Thr Ser

1

5

10

30

## 【図面の簡単な説明】

図1は、mGluR4及びmGluR4変異体の構造の概要を示す図である。

図2は、抗mGluR4抗体による免疫染色の結果を示す写真である。(A)小腸。(B)大腸。

図3は、迷走神経腹腔枝求心性神経活動に対するL-グルタミン酸の作用を示す図である。横軸は時間。縦軸は神経活動を表す。

【 図 1 】

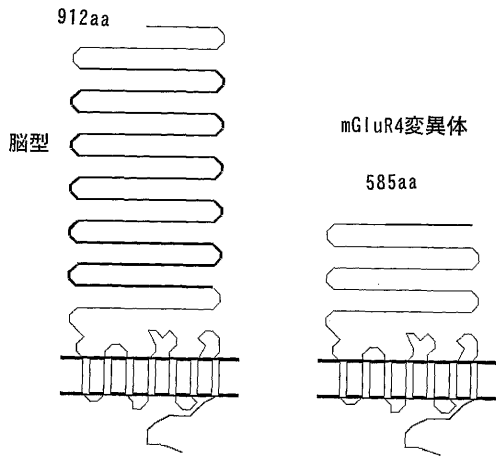


Fig. 1

【 図 2 】

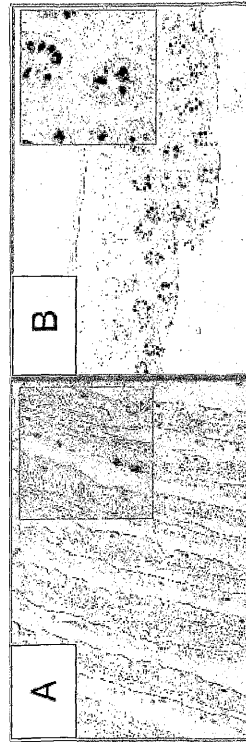
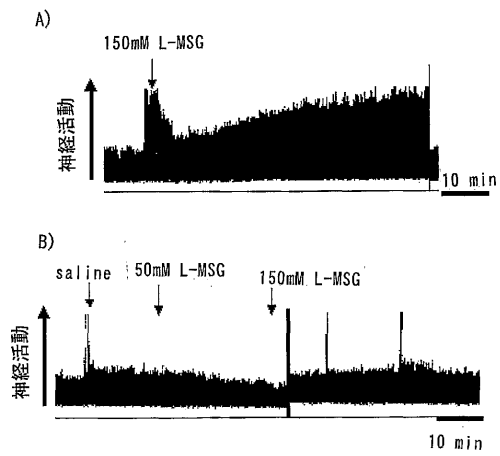


Fig. 2

【 図 3 】

Fig. 3



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 33/50 (2006.01)** G 0 1 N 33/50 Z

- (72)発明者 サン ガブリエル アナ  
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 前川 誉実  
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 畝山 寿之  
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 鳥居 邦夫  
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 小暮 道明

- (56)参考文献 Chaudhari, N. et al., A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor, *Nature Neuroscience*, 2000年 2月, Vol.3, No.2, pp.113-119  
 O'Hara, P.J., et al., The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins, *Neuron*, 1993年, Vol.11, pp.41-52  
 Han, G. & Hampson, D.R., Ligand binding to the amino-terminal domain of the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor, *J. Biol. Chem.*, 1999年, Vol.274, No.15, p.10008-10013  
 Peltekova, V., et al., Constraints on proper folding of the amino terminal domains of group III metabotropic glutamate receptors, *Molecular Brain Research*, 2000年, Vol.76, pp.180-190  
 Nijima, A., Effects of oral and intestinal stimulation with umami substance on gastric vagus activity, *Physiology & Behavior*, 1991年, Vol.49, No.5, pp.1025-1028  
 Dingledine, R. & Conn, P.J., Peripheral glutamate receptors: molecular biology and role in taste sensation, *Journal of Nutrition*, 2000年 4月, Vol.130, No.4S Suppl., pp.1039S-1042S

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90  
 C07K 1/00-19/00  
 G01N33/00-33/98  
 A61K45/00  
 CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
 SwissProt/PIR/GeneSeq