



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101809153 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 01

(21) 申请号 200880108759. 4

C12N 1/19(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 09. 25

C12N 1/21(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/10(2006. 01)

250461/07 2007. 09. 27 JP

G01N 33/15(2006. 01)

G01N 33/50(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/53(2006. 01)

2010. 03. 25

G01N 33/569(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12Q 1/68(2006. 01)

PCT/JP2008/067300 2008. 09. 25

(56) 对比文件

(87) PCT国际申请的公布数据

Dominguez, G. 等人. GenBank 登录号 :

W02009/041501 JA 2009. 04. 02

NP_050267. 1. 《GenBank》. 2004,

(73) 专利权人 日本烟草产业株式会社

GERALDINA DOMINGUEZ 等人. Human

地址 日本东京都

Herpesvirus 6B Genome Sequence:

专利权人 株式会社威鲁斯医科学研究所

Coding Content and Comparison with

(72) 发明人 近藤一博 小林伸行

Human Herpesvirus 6A.. 《JOURNAL OF

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

VIROLOGY》. 1999,

11105

审查员 廖雅静

代理人 张平元

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006. 01)

A01K 67/027(2006. 01)

C07K 14/03(2006. 01)

C07K 16/08(2006. 01)

C12M 1/00(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

权利要求书2页 说明书26页

序列表4页 附图8页

(54) 发明名称

参与疱疹病毒的潜伏感染的因子及其利用

(57) 摘要

本发明的蛋白质以及基因是参与疱疹病毒的潜伏感染的因子。在约 50% 的精神障碍患者体内检测出针对此因子的抗体，而在健康者体内几乎未检测出此种抗体。另外，导入有 SITH-1 的小鼠表现出躁郁症或抑郁症样的精神障碍。因此，基于上述事实，可以提供一种能够客观地判定精神障碍的方法以及精神障碍模型动物。

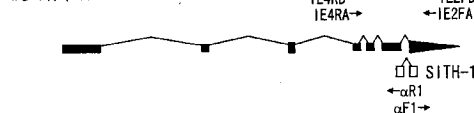
增殖感染时的 mRNA



潜伏感染时的 mRNA



正义转录物



反义转录物

CN 101809153 B

1. 一种基因,其为:
 - (a) 编码下述蛋白质的基因:由序列编号 1 所示的氨基酸序列所构成的蛋白质;
 - (c) 由序列编号 2 所示的碱基序列构成的基因,所述序列编号 2 所示的碱基序列作为开放阅读框区域。
2. 一种蛋白质,其为:
 - (a) 由序列编号 1 所示的氨基酸序列所构成的蛋白质;或
 - (c) 由权利要求 1 所述基因编码的蛋白质。
3. 一种抗体,其特征在于:其可识别根据权利要求 2 所述的蛋白质。
4. 一种重组表达载体,其特征在于:其包含根据权利要求 1 所述的基因。
5. 一种转化体,其特征在于:其是导入根据权利要求 1 所述的基因或根据权利要求 4 所述的重组表达载体而成,但该转化体不是动植物。
6. 一种基因检测工具,其特征在于:使用根据权利要求 1 所述的基因的碱基序列或其互补序列作为探针。
7. 一种检测工具,其特征在于:使用根据权利要求 2 所述蛋白质作为探针来检测权利要求 3 所述的抗体。
8. 一种判定套件,其特征在于用于下述的判定方法:

使用从被实验对象生物体内分离出的生物学样本来判定被实验对象生物体内是否存在根据权利要求 3 所述的抗体的判定方法,或者

使用从被实验对象生物体内分离出的生物学样本来判定被实验对象生物体内是否存在根据权利要求 3 所述的抗体、并且使用根据权利要求 2 所述的蛋白质,从免疫学上检测是否存在根据权利要求 3 所述的抗体的判定方法;

所述判定套件包含选自以下所示的 (i) ~ (ii) 的物质中的至少一种物质,

 - (i) 根据权利要求 2 所述的蛋白质,
 - (ii) 将 (i) 固定化而得到的工具。
9. 一种诊断套件,其采用下述诊断方法来诊断被实验者是否有精神障碍,所述诊断方法包括:
 - (i) 判定步骤,使用下述判定方法,判定所述被实验者体内是否存在根据权利要求 3 所述的抗体,

所述判断方法为:

使用从被实验对象生物体内分离出的生物学样本来判定被实验对象生物体内是否存在根据权利要求 3 所述的抗体的判定方法,或者

使用从被实验对象生物体内分离出的生物学样本来判定被实验对象生物体内是否存在根据权利要求 3 所述的抗体、并且使用根据权利要求 2 所述的蛋白质,从免疫学上检测是否存在根据权利要求 3 所述的抗体的判定方法;以及

 - (ii) 判断步骤,在所述判定步骤 (i) 中判定存在根据权利要求 3 所述的抗体时,判断所述被实验者患有精神障碍;

所述诊断套件包含选自以下所示的 (i) ~ (ii) 的物质中的至少一种物质,

 - (i) 根据权利要求 2 所述的蛋白质,
 - (ii) 将 (i) 固定化而得到的工具。

10. 一种用于实施模型动物的判定方法的试剂盒,所述模型动物的判定方法判定被实验动物是否可用作精神障碍的模型动物且该模型动物的判定方法具有以下步骤:

(i) 判定步骤,判定从所述被实验动物体内分离出来的生物学样本中是否存在根据权利要求 3 所述的抗体;以及

(ii) 判断步骤,在所述判定步骤(i)中,以从所述被实验动物体内分离出来的生物学样本中存在根据权利要求 3 所述的抗体的情况作为指标,判定所述被实验动物可用作精神障碍的模型动物,

所述试剂盒具备:

(i) 权利要求 2 所述的蛋白质,

(ii) 将(i)固定化而得到的检测工具。

11. 权利要求 2 所述蛋白质在制备用于检测和 / 或分析权利要求 3 所述的抗体的试剂中的用途。

参与疱疹病毒的潜伏感染的因子及其利用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种参与疱疹病毒的潜伏感染的因子及其利用,尤其涉及一种在疱疹病毒的潜伏感染时进行特异性表达的新颖蛋白质、及编码此蛋白质的基因、以及其利用。

背景技术

[0002] 疱疹病毒科的病毒是如下的病毒:在核心蛋白质的周围,分子量为 $80 \sim 150 \times 10^6$ 道尔顿的多链线状 DNA 进入由 162 个壳粒所构成的直径约为 100nm 的 20 面体的衣壳中,且包膜包围此核衣壳 (nucleocapsid) 而成的整体大小约为 150 ~ 200nm 的病毒。疱疹病毒几乎在所有哺乳动物或两栖类中均有发现,尤其是以人类为宿主的疱疹病毒科的病毒被称为人类疱疹病毒 (HHV, human herpesvirus)。HHV 被分类为: α (单纯疱疹病毒、水痘、带状疱疹病毒等)、 β (巨细胞病毒等)、以及 γ (EB 病毒 (Epstein-Barr virus) 等) 亚科。

[0003] 此种疱疹病毒以“潜伏感染”为特征。所谓“潜伏感染”是指病毒在宿主细胞内不产生感染性病毒粒子而持续存在的感染状态,但在此潜伏感染中,病毒基因以及辅助此病毒基因存在的基因产物也保存在宿主细胞内。已知当宿主由于某种原因(例如年龄增加、身体不适(包括疲劳))而发生异常时,表现为潜伏感染的疱疹病毒会再次开始产生病毒粒子并复制大量的病毒(再活化)。

[0004] 即,疱疹病毒具有如下的特异的性质:如果宿主无异常,那么继续潜伏感染,一旦宿主的身体发生异常,并察觉到宿主的危机,则为了寻找其他健康的宿主而再活化。

[0005] 对于病毒的潜伏感染、再活化的理解,是研究此种疱疹科的病毒的生态所不可或缺的。但是,疱疹病毒之中,关于潜伏感染的见解较多的只有属于 γ -疱疹病毒的 EB 病毒,而其他病毒尚有许多不明之处。

[0006] 尤其是,关于参与 β -疱疹病毒的潜伏感染的因子,目前除本发明者先前所揭示的见解以外尚无其他信息。例如非专利文献 1 中揭示了 HHV-6 在末梢血液中分化度较高的巨噬细胞中潜伏感染,从而明确了 HHV-6 在宿主体内的潜伏感染部位。另外非专利文献 2 中记载有 HHV-6 于初感染时以非常高的比率转移到脑内,并产生持续感染、潜伏感染。非专利文献 3 中揭示有在 HHV-6 的潜伏感染时进行表达的基因(潜伏感染基因),且提示此基因具有控制病毒的潜伏感染与再活化的作用。

[0007] 另外,非专利文献 4 中揭示了 HHV-6 的潜伏感染状态中存在比较稳定且基因表达活跃的状态即“中间阶段:intermediate stage”,潜伏感染基因与由此基因编码的蛋白质(潜伏感染蛋白质)在此中间阶段大量表达。此外非专利文献 5 中记载有于慢性疲劳症候群患者的血清中存在针对在中间阶段表达亢进的潜伏感染蛋白质的抗体。

[0008] [非专利文献 1]

[0009] Kondo. K et al. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages (J Gen Virol 72:1401-1408, 1991)

[0010] [非专利文献 2]

[0011] Kondo. K et al. Association of human herpesvirus 6 infection of the

centralnervous system with recurrence of febrile convulsions. (J Infect Dis167: 1197-1200,1993.)

[0012] [非专利文献 3]

[0013] Kondo. K et al. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. (J Virol. 76 :4145-4151,2002)

[0014] [非专利文献 4]

[0015] Kondo K et al. Recognition of a Novel Stage of Beta-Herpesvirus Latency in Human Herpesvirus 6. (J Virol. 77 :2258-2264,2003)

[0016] [非专利文献 5]

[0017] 近藤一博着,“疱疹病毒感染与疲劳”,病毒,第 55 卷第 1 号 p9-18 2005

发明内容

[0018] 但是,与疾病有特异性相关的潜伏感染基因以及潜伏感染蛋白质尚未得到鉴定,其功能或与慢性疲劳症候群的发病机理的关系也不明确。此外,HHV-6 有可能也参与慢性疲劳症候群以外的疾病。

[0019] 因此,业界强烈期待明确 HHV-6 的感染与疾病的关联性,并且开发出有助于疾病的客观诊断或模型动物的建立的技术。

[0020] 本发明是鉴于所述问题研究而成,其目的在于确定参与 HHV-6 的潜伏感染的因子,并且提供此因子的利用方法。

[0021] 本发明者为解决所述课题而进行了努力研究的结果,基于如下的独自观点:由于 HHV-6 具有潜伏感染、再活化这种特征性质,因此通过鉴定参与此潜伏感染、再活化的因子,应可获得关于 HHV-6 的感染与精神障碍的关联性的见解,本发明者基于所述观点反复进行高度复杂的实验,结果鉴定出在 HHV-6 的潜伏感染中于特异性基因活跃表达的中间阶段 (intermediate stage) 进行表达的新颖基因、以及由此新颖基因所编码的新颖蛋白质 SITH-1 (Small protein encoded by the Intermediate Transcript of HHV-6-1, 由 HHV-6 的中间转录物编码的小蛋白 -1)。而且,对这些基因以及由此基因所编码的蛋白质 SITH-1 的功能进行了分析,结果发现如下的新的事实:(i) SITH-1 蛋白质具有使细胞内钙浓度上升的功能,(ii) 另外,在情绪障碍患者体内有意义地检测出针对这些 SITH-1 蛋白质的抗体,另一方面,在健康者体内几乎未检测出此种抗体,从而完成本发明。本发明是基于所述新的见解而成的,其包含以下的发明。

[0022] (1) 一种基因,其特征在于:其编码以下 (a) 或 (b) 中所记载的蛋白质。

[0023] (a) 由序列编号 1 所示的氨基酸序列所构成的蛋白质。

[0024] (b) 由序列编号 1 的氨基酸序列中,一个或数个氨基酸经取代、缺失、插入及/或附加的氨基酸序列所构成,且具有使细胞内钙浓度上升的活性的蛋白质。

[0025] (2) 一种基因,其特征在于:其含有序列编号 2 所示的碱基序列作为开放阅读框 (open reading frame) 区域。

[0026] (3) 一种基因,其特征在于:其是在严格的杂交条件下与由下述碱基序列构成的 DNA 杂交,且编码具有使细胞内钙浓度上升的活性的蛋白质,其中,所述碱基序列与由序列编号 2 或者 3 所示的碱基序列所构成的 DNA 互补。。

- [0027] (4) 一种蛋白质,其特征在於:其由根据(1)~(3)中任一项所述的基因所编码。
- [0028] (5) 一种蛋白质,其特征在於:其是以下(a)或(b)中所记载的蛋白质:
- [0029] (a) 由序列编号1所示的氨基酸序列所构成的蛋白质,
- [0030] (b) 由序列编号1的氨基酸序列中,一个或数个氨基酸经取代、缺失、插入及/或附加的氨基酸序列所构成,且具有使细胞内钙浓度上升的活性的蛋白质。
- [0031] (6) 一种抗体,其特征在於:其可识别根据(4)或(5)所述的蛋白质。
- [0032] (7) 一种重组表达载体,其包含根据(1)~(3)中任一项所述的基因。
- [0033] (8) 一种转化体,其特征在於:其是导入根据(1)~(3)中任一项所述的基因或根据(7)所述的重组表达载体而成。
- [0034] (9) 一种基因检测工具,其特征在於:使用根据(1)~(3)中任一项所述的基因中的至少一部分碱基序列或其互补序列作为探针。
- [0035] (10) 一种检测工具,其特征在於:使用具有根据(4)或(5)所述的蛋白质中的至少一部分氨基酸序列的多肽作为探针。
- [0036] (11) 一种判定方法,其特征在於:判定被实验对象生物体内是否存在根据(6)所述的抗体。
- [0037] (12) 根据(11)所述的判定方法,其特征在於:所述判定方法是使用根据(4)或(5)所述的蛋白质或者其部分片段,从免疫学上检测是否存在根据(6)所述的抗体。
- [0038] (13) 根据(11)或(12)所述的判定方法,其特征在於:所述判定方法是使用从被实验对象生物体内分离出的生物学样本来进行。
- [0039] (14) 一种判定套件,其特征在於:其是用于根据(11)~(13)中任一项所述的判定方法。
- [0040] (15) 根据(14)所述的判定套件,其特征在於:其包含选自以下所示的(i)~(iii)的物质中的至少一种物质:
- [0041] (i) 根据(4)或(5)所述的蛋白质,
- [0042] (ii) (i)的部分片段,
- [0043] (iii) 将(i)或(ii)固定化而得到的工具。
- [0044] (16) 一种诊断方法,其诊断被实验者是否有精神障碍,其特征在於包括:判定步骤,使用根据(11)~(13)中任一项所述的判定方法,判定所述被实验者体内是否存在根据(6)所述的抗体;以及判断步骤,在所述判定步骤中判定存在根据(6)所述的抗体时,判断所述被实验者患有精神障碍。
- [0045] (17) 根据(16)所述的诊断方法,其特征在於:所述诊断方法是使用从被实验者体内分离出的生物学样本来进行。
- [0046] (18) 一种诊断方法,其诊断被实验动物是否有精神障碍,其特征在於包括:判定步骤,使用根据(11)~(13)中任一项所述的判定方法,判定所述被实验动物体内是否存在根据(6)所述的抗体;以及判断步骤,在所述判定步骤中判定存在根据(6)所述的抗体时,判断所述被实验动物有精神障碍。
- [0047] (19) 一种诊断套件,其特征在於:其是用于根据(16)~(18)中任一项所述的诊断方法。
- [0048] (20) 根据(19)所述的诊断套件,其特征在於:其包含选自以下所示的(i)~

(iii) 的物质中的至少一种物质：

[0049] (i) 根据 (4) 或 (5) 所述的蛋白质，

[0050] (ii) (i) 的部分片段，

[0051] (iii) 将 (i) 或 (ii) 固定化而得到的工具。

[0052] (21) 一种模型动物的判定方法，其判定被实验动物是否可用作精神障碍的模型动物，其特征在于包括：诊断步骤，通过根据 (18) 所述的诊断方法，诊断所述被实验动物是否有精神障碍；以及判定步骤，在所述诊断步骤中，以被实验动物有精神障碍作为指标，判定所述被实验动物可用作精神障碍的模型动物。

[0053] (22) 一种模型动物，其特征在于：其是导入根据所述 (1) ~ (3) 中任一项所述的基因、此基因产物、或者根据所述 (7) 所述的重组表达载体而成。

[0054] (23) 一种筛选方法，其筛选精神治疗药物的候选物质，其特征在于包括：对精神障碍的模型动物给予被实验物质的步骤；通过根据 (18) 所述的诊断方法，诊断所述模型动物的精神障碍是否得到治愈或改善的步骤；以及以所述模型动物的精神障碍得到治愈或改善作为指标，判定所述被实验物质是精神治疗药物的候选物质的步骤。

[0055] 此外，在所述 (23) 的筛选方法中，更优选结合根据 (18) 所述的诊断方法，进行例如采用（迄今为止已知的）动物的异常行动或恐怖反应等的诊断方法。

[0056] 本发明的基因或蛋白质是在疱疹病毒的潜伏感染时进行特异性表达，且具有控制潜伏感染与再活化的功能。另外，如下所述，由于明确本发明的蛋白质的抗体有意义地存在于精神障碍患者体内，因此通过检测有无此抗体，可发挥客观诊断精神障碍的效果。

[0057] 另外，本发明的基因或蛋白质除用于本文中所记载用途以外，也可用于对各种疾病的诊断，还可用于药剂的筛选方法、模型动物的制作方法、以及各种套件等。

[0058] 本发明的其他目的、特征、以及优点可以通过以下所记载的内容而充分理解。另外，本发明的优点可以通过参照随附图式的以下说明而明了。

附图说明

[0059] 图 1 是示意性地表示潜伏感染特异性基因的结构与分析用引物的位置的图。

[0060] 图 2 是表示通过 PCR 法对 HHV-6 基因产物进行扩增的结果的图。

[0061] 图 3 是表示通过 RACE 法对新颖潜伏感染特异性基因 mRNA 进行分析的结果的图。

[0062] 图 4 是表示通过酵母双杂交 (Yeast Two-hybrid) 法，鉴定与蛋白质 SITH-1 结合的宿主蛋白质的结果的图。

[0063] 图 5 是表示利用蛋白质 SITH-1 使星形胶质细胞样神经胶质细胞株内的 CAML 增加的图。

[0064] 图 6 是表示由 SITH-1 所引起的神经胶质细胞内钙浓度的上升的图。

[0065] 图 7 是表示对于具有精神障碍的患者的 SITH-1 的抗体效价的图。

[0066] 图 8 是表示通过悬尾实验所获得的 SITH-1 的效果的研究结果的图。

[0067] 图 9 是表示通过强迫游泳实验所获得的 SITH-1 的效果的研究结果的图。

[0068] 图 10 是表示通过恐怖反应 (Prepulse inhibition, 前脉冲抑制) 所获得的 SITH-1 的效果的研究结果的图。

[0069] 图 11 是表示利用腺病毒载体使 SITH-1 在小鼠的神经胶质细胞内表达，3 周后通过

转轮旋转来测定自主活动量的结果的图。

[0070] 图 12 是表示利用慢病毒载体使 SITH-1 在小鼠的神经胶质细胞内表达,8 周后通过转轮旋转来测定自主活动量的结果的图。

[0071] 图 13 是表示以 SITH-1 作为指标,对并发抑郁症的其他疾病进行诊断的结果的图。

具体实施方式

[0072] 以下,对本发明的一个实施方式进行详细说明,但本发明并不限于以下所记载的内容。

[0073] 首先,为了有助于理解本发明,对本发明者完成本发明的经过进行简单说明。本发明者推测:人类疱疹病毒中 HHV-6 的感染很可能是导致精神障碍、特别是伴有情绪障碍的精神障碍的原因之一。其理由如下:(i) 在先前认为 HHV-6 是其致病原因之一的慢性疲劳症候群(CFS, chronic fatiguesyndrome)的症状中,可见抑郁症状等在精神障碍中常见的症状;(ii)HHV-6 在脑内产生潜伏感染;(iii)此外在 CFS 患者的血清中,高比率地检测出与目前为止所鉴定出的 HHV-6 的潜伏感染特异性基因的蛋白质产生反应的抗体,或者虽然基因或蛋白质尚未鉴定,但与在 HHV-6 的潜伏感染细胞中进行表达的未知蛋白质产生反应的抗体。

[0074] 另外,本发明者根据 HHV-6 在脑内主要在负责人类的思考或情感的额叶或海马区域等中潜伏感染这一事实、及在脑内产生潜伏感染的病毒包括 HHV-6 在内仅有几种这一事实,推测出 HHV-6 与精神障碍的关系。此外,已知 HHV-6 在星形胶质细胞等神经胶质细胞中产生潜伏感染,而此星形胶质细胞等神经胶质细胞在血清素等与抑郁症有关的脑内物质的代谢中具有重要作用,就此方面而言,本发明者也独自认为 HHV-6 有可能与情绪障碍等精神障碍有关。

[0075] 因此,本发明者推测在 CFS 患者中,因 HHV-6 在脑中的潜伏感染而导致产生精神症状的患者应占相当大的比率。其中,本发明者尤其怀疑 HHV-6 与抑郁症或躁郁症等情绪障碍有关。

[0076] 情绪障碍是可见于抑郁症或躁郁症等精神障碍的症状,其代表为:仅可见抑郁症状的“抑郁症”、以及反复可见躁狂状态与抑郁状态的“躁郁症”。原因可以列举压力、基因异常、感染等各种原因,但尚未确定。情绪障碍最近有增加的倾向,成为严重的社会问题,因而期待尽早辨明病因、病态,并开发出诊断方法以及治疗方法。其中,也存在情绪障碍倾向于定性上的诊断,而客观诊断较困难的问题。另外,有助于情绪障碍的研究或治疗法的开发的模型动物的开发也不充分,而延缓原因查明或治疗方法的开发。

[0077] 因此,本发明者认为有必要明确 HHV-6 的感染与情绪障碍、精神障碍的关联性,并且开发出一种有助于情绪障碍、精神障碍的客观的诊断或模型动物的建立的技术。

[0078] 再者,当然这些推测是本发明者长年在本研究领域进行努力研究才摸索到的独自推测,不是一般的从业人员能够容易想到的。

[0079] 以下,依序对本发明的蛋白质、基因等进行详细说明。

[0080] (1) 本发明的蛋白质、基因

[0081] (1-1) 结构

[0082] 本发明提供一种参与疱疹病毒的潜伏感染的因子,更详细而言提供一种在疱疹病

毒的潜伏感染时进行特异性表达的蛋白质以及编码此蛋白质的基因。此处,所谓“在疱疹病毒的潜伏感染时进行特异性表达”是指在感染疱疹病毒的宿主中,当疱疹病毒潜伏感染(未增殖感染)时,源自疱疹病毒的基因或基因产物进行特异性表达。

[0083] 作为所述蛋白质以及基因,例如可以列举(a)由序列编号1所示的氨基酸序列所构成的蛋白质、以及编码此蛋白质的基因。

[0084] 由序列编号1所示的氨基酸序列所构成的蛋白质,如下述实施例所示,是被分离、鉴定出其是在人类疱疹病毒-6(HHV-6)的潜伏感染时进行特异性表达的蛋白质,以下将其称为SITH-1(Small protein encoded by the Intermediate Transcript of HHV-6-1)蛋白质。SITH-1蛋白质是具有序列编号1所示的氨基酸序列,由159个氨基酸所构成,且分子量约为17.5kDa的蛋白质。

[0085] SITH-1蛋白质是由SITH-1基因进行编码。此SITH-1基因的cDNA如序列编号3所示,具有1795个碱基对(约1.79kbp)的长度,第954位至第956位的碱基序列为起始密码子(Kozak ATG),第1431位至第1433位的碱基序列为终止密码子(TAA)。因此,所述SITH-1基因具有序列编号3所示的碱基序列中的第954位至第1430位为止的碱基序列作为开放阅读框(ORF)区域,此ORF具有477个碱基对(约0.48kbp)的长度。将SITH-1的cDNA之中表示ORF区域的碱基序列示于序列编号2。再者,序列编号2所示的碱基序列是以包含终止密码子的3个碱基的形式进行记载。

[0086] 另外,作为本发明的蛋白质以及基因,可以列举(b)由序列编号1的氨基酸序列中,一个或数个氨基酸经取代、缺失、插入及/或附加的氨基酸序列所构成,且在疱疹病毒的潜伏感染时进行特异性表达的蛋白质,以及编码此蛋白质的基因。

[0087] 所述“一个或数个氨基酸经取代、缺失、插入及/或附加”,是指通过部位特异性突变诱发法等公知的变异肽制作法,使可以取代、缺失、插入及/或附加的程度的数量(优选10个以下,更优选7个以下,再更优选5个以下)的氨基酸经取代、缺失、插入及/或附加。如此,所述(b)的蛋白质可以称为所述(a)的蛋白质的变异蛋白质。再者,此处的“变异”主要是指通过公知的变异蛋白质制作法而人为导入的变异,但也可以是将天然存在的相同的变异蛋白质分离纯化者。

[0088] 此外,作为本发明的基因,可以列举(c)在严格的杂交条件下与由下述碱基序列构成的DNA杂交,且编码在疱疹病毒的潜伏感染时进行特异性表达的蛋白质,其中,所述碱基序列与由序列编号2所示的碱基序列所构成的DNA互补。。

[0089] 所述“在严格的杂交条件下杂交”是指只当在序列间存在至少90%的同源性,优选至少95%的同源性,最优选至少97%的同源性时产生杂交。作为“严格的杂交条件”的具体例,例如可以列举如下条件:在杂交溶液(包含50%的甲酰胺、5×SSC(150mM的NaCl、15mM的柠檬酸三钠)、50mM的磷酸钠(pH为7.6)、5×Denhardt溶液、10%的硫酸葡聚糖、以及20μg/ml的变性剪切鲑鱼精子DNA)中于42℃下培养一晚后,在约65℃下于0.1×SSC中清洗过滤器。另外,所述杂交可以通过J.Sambrook et al.Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2d Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory(1989)中所记载的方法等先前公知的方法来进行,并无特别限定。通常,温度越高、盐浓度越低,则严格度越高(变得难以杂交)。

[0090] 此外,在本说明书中,术语“基因”可以与“多核苷酸”、“核酸”或“核酸分子”交换使用。“多核苷酸”是指核苷酸的聚合物。因此,本说明书中的术语“基因”中不仅包括双

链 DNA,也包括构成其的正义链 (sense strand) 以及反义链 (antisense strand) 之类的各单链 DNA 或 RNA (mRNA 等)。反义链可以用作探针或反义药剂。“DNA”例如包括通过克隆 (cloning) 或化学合成技术、或者这些技术的组合而获得的 cDNA 或基因组 DNA 等。即, DNA 可以是包括作为动物的基因组中所含有的形态的内含子等非编码序列的“基因组”型 DNA,也可以是利用逆转录酶或聚合酶并经由 mRNA 而获得的 cDNA,即不含有内含子等非编码序列的“转录”型 DNA。此外,本发明的基因也可以是除了编码所述 (a) 或 (b) 中所记载的氨基酸的序列以外,还包含非翻译区域 (UTR) 的序列或载体序列 (包含表达载体序列) 等序列的基因。另外,这些 mRNA 或者 cDNA 的翻译区域的末端及 / 或内部也可以包含调节序列或聚腺苷酸序列等任意多核苷酸。另外,当本发明的蛋白质可以由多个等位基因编码时,所有等位基因、其转录产物、以及 cDNA 包括在所述核酸的范畴内。此外,在本说明书中,“核酸”这一术语包括任意单纯核苷酸及 / 或包含修饰核苷酸的多核苷酸,例如 cDNA、mRNA、全 RNA、hnRNA 等。“修饰核苷酸”除了含有肌苷 (inosine)、乙酰胞苷 (acetylcytidine)、甲基胞苷 (methylcytidine)、甲基腺苷 (methyladenosine)、甲基鸟苷 (methylguanosine) 的磷酸酯以外,还包括可以在紫外线或化学物质的作用下后天生成的核苷酸。

[0091] 术语“碱基序列”可以与“核酸序列”交换使用,其是以脱氧核糖核苷酸 (分别简称为 A、G、C 以及 T) 的序列来表示。另外,多核苷酸或多核苷酸的“碱基序列”是指相对于 DNA 分子或多核苷酸的脱氧核糖核苷酸的序列,并且是指相对于 RNA 分子或多核苷酸的核糖核苷酸 (A、G、C 以及 U) 的对应序列 (此处所确定的脱氧核苷酸序列中的各胸腺嘧啶脱氧核苷酸 (T) 可以被核糖核苷酸的尿苷 (U) 取代)。

[0092] 例如,使用脱氧核糖核苷酸的略语所表示的“具有序列编号 2 或 4 的序列的 RNA 分子”是指具有序列编号 2 或 4 的各脱氧核苷酸 A、G 或 C 被对应的核糖核苷酸 A、G 或 C 取代,而且脱氧核苷酸 T 被核糖核苷酸 U 取代的序列的 RNA 分子。另外,“包含序列编号 2 或 4 中所示的碱基序列的多核苷酸或其片段”是指包含序列编号 2 或 4 的各脱氧核苷酸 A、G、C 及 / 或 T 所示的序列的多核苷酸或其片段部分。

[0093] 另外,本发明的基因的片段 (部分序列) 例如可以用作聚合酶链反应 (PCR) 的引物、或者杂交探针。所述片段 (多核苷酸) 可以将本发明的基因的同系物 (homolog)、直系同源物 (ortholog) 特异性地 PCR 扩增,另外也可以用作将本发明的基因的同系物、直系同源物特异性杂交的杂交探针。即,在优选实施方式中,本发明的基因的片段可以作为用于通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增靶序列的引物、或者作为根据先前的 DNA 杂交技术的探针中的任意者而用于诊断。

[0094] 另外,作为本发明的基因的片段的其他用途,可以列举 Verma 等人所著的 Human Chromosomes : a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988) 中所记载的针对用于提供正确的染色体位置的分裂中期染色体展开物的原位 (in situ) 杂交 (例如 FISH); 以及用于检测本发明的 mRNA 在特定组织中的表达的北方墨点分析。

[0095] 另外,本发明的基因中可以包含以下的物质,但并不限于这些物质:由其本身编码成熟蛋白质的氨基酸序列的多核苷酸;成熟的蛋白质的编码序列以及进一步的序列 (例如编码前导序列 (leader sequence) 的序列) (例如前蛋白 (preprotein) 序列或蛋白原 (proprotein) 序列或前蛋白原 (preproprotein) 序列); 内含子、非编码 5' 序列以及非编码 3' 序列 (例如在转录、mRNA 加工 (包含重组以及聚腺苷酸化信号) 中承担作用的转录非

翻译序列) ;对如提供进一步的功能性的进一步的氨基酸进行编码的进一步的编码序列。

[0096] 因此,例如编码蛋白质的序列可以与标记序列(marker sequence)(例如对使经融合的蛋白质的纯化变得容易的肽进行编码的序列)融合。在本发明的优选实施方式中,标记氨基酸序列可以是6×组氨酸肽(例如pQE载体(Qiagen, INC.)中所提供的标签)。如Gentz等人所著的Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :821-824(1989)中所记载般,6×组氨酸肽可用于融合蛋白质的简便纯化。另外,除所述以外,也能够利用许多公共的及/或可以从商业途径获得的标记氨基酸序列。例如,如Wilson等人所著的Cell 37 :767(1984)中所记载般,“HA”标签是与源自流感血凝素(HA)蛋白质的抗原表位对应的用于纯化的肽。除此以外,使本发明的蛋白质的N末端或C末端融合Fc而成的融合蛋白质也可以用于纯化。

[0097] 另外,本发明也包括本发明的基因的变异体。所述变异体如天然等位基因变异体般,可以天然形成。利用“等位基因变异体”可谋求占据生物的染色体上的特定的基因座的基因的多个可交换形态之一。另外,天然中不存在的变异体例如可以使用此领域中公知的诱变技术来生成。此种变异体如上所述般,包含通过一个或数个核苷酸取代、缺失或附加而生成的变异体。取代、缺失或附加可以包含一个以上的核苷酸。变异体可以在编码或非编码区、或者此两者间变化。编码区中的变异可以生成保存性或非保存性氨基酸取代、缺失或附加。

[0098] 另外,作为本发明中所含有的优选蛋白质,除成熟蛋白质以外,可以列举包含细胞外区域、跨膜区域、细胞内区域、或者跨膜区域的全部或一部分缺失的细胞外及细胞内区域的蛋白质。在本说明书中,术语“蛋白质”可以与“多肽”或“肽”交换使用。此外,本发明提供由序列编号2所示的碱基序列所编码的蛋白质的一个或数个氨基酸经取代、附加或缺失的多肽。优选保存性或非保存性氨基酸取代、缺失或附加,特别优选沉默取代(silent substitution)、附加以及缺失,这些不会使本发明的蛋白质或其一部分的特性以及活性发生变化。就这些方面而言,特别优选保存性取代。

[0099] 此外,本发明的蛋白质不仅可为从天然中分离出的蛋白质,也可以化学合成或重组生成。即,本发明的蛋白质可以是从小细胞、组织等中分离纯化的状态,也可以是编码蛋白质的基因导入到宿主细胞中,并使该蛋白质在细胞内表达的状态。另外,本发明的蛋白质也可以是包含附加多肽的蛋白质。

[0100] 另外,本发明涉及具有本说明书中所记载的蛋白质的抗原表位保有部分的氨基酸序列的多肽。具有本发明的蛋白质的抗原表位保有部分的氨基酸序列的多肽,只要包含具有至少6个、7个、8个、9个、10个氨基酸的多肽的部分即可,此外,也可包含至由序列编号2或4所示的碱基序列编码的蛋白质、或者具有序列编号1所示的氨基酸序列的蛋白质的所有氨基酸序列的长度为止的任意长度(包含整体)的抗原表位保有部分多肽。

[0101] 即,本发明提供本发明的蛋白质的抗原表位保有肽。如下述的实施例所示,本发明的蛋白质是免疫原性蛋白质。因此,在本发明的蛋白质中,引起抗体应答的抗原表位部分可以通过该领域中公知的方法鉴定。例如在Geysen, H. M. 等人所著的Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :3998-4002(1984)中揭示有:充分纯化至可以用于酶联免疫吸附测定的反应的程度的数百个肽在固体支持体上的迅速同时合成的顺序。继而,合成肽与抗体的相互作用可以不将其从支持体上去除而容易地检测出。在此方式中,保有所需的蛋白质的免疫原性表位的肽可以由从业人员日常性地鉴定。例如Geysen等人通过合成可包括蛋白质的全部213

个氨基酸序列的所有 208 种六肽的重复组进行 7 氨基酸的辨明,而对口蹄疫病毒的外壳蛋白质中在免疫学上较重要的抗原决定部位进行了定位。继而,合成所有 20 个氨基酸依次在抗原表位内的各位置被取代的肽的完整的取代组,然后确定赋予用以与抗体的反应的特异性的特定氨基酸。因此,本发明的抗原表位保有肽的肽类似物可以通过该方法而日常性地制作。在 Geysen(1987) 的美国专利第 4,708,781 号中,更加详细地记载了对保有所需的蛋白质的免疫原性表位的肽进行鉴定的此方法。

[0102] 当蛋白质整体为免疫原时,将“免疫原性表位”定义为引起抗体应答的蛋白质的一部分。一般认为这些免疫原性表位被分子上的 2、3 的焦点所限制。另一方面,能够结合抗体的蛋白质分子的区域可以定义为“抗原性表位”。蛋白质的免疫原性表位的数量通常少于抗原性表位的数量。例如参照 Geysen, H. M. 等人所著的 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3998-4002(1984)。

[0103] 本发明的抗原性表位保有肽在引发产生包含与本发明的蛋白质特异性结合的单克隆抗体的抗体方面有用。因此,通过使来自经抗原之抗原表位保有肽进行免疫化的供体的脾脏细胞融合而获得的杂交瘤 (hybridoma) 的大部分,通常会分泌出与天然的蛋白质具有反应性的抗体。由抗原性表位保有肽引发产生的抗体可用于检测模拟蛋白质,而且针对不同的肽的抗体可以用于追踪接受翻译后加工的蛋白质前体的各区域的最终结果。已知在免疫沉淀分析法中,连较短的肽(例如约 9 个氨基酸)也可以与更长的肽结合并且取代,因此肽以及抗肽抗体可以用于有关模拟蛋白质的各种定性或定量的分析法,例如竞争性分析法。例如参照 Wilson, I. A. 等人所著的 Cell 37 :767-778(1984)777。另外,本发明的抗蛋白质抗体也可用于模拟蛋白质的纯化(例如使用该领域中众所周知的方法,并采用吸附层析法)。

[0104] 根据所述的准则而设计的本发明的抗原性表位保有肽,优选包含本发明的蛋白质的氨基酸序列内所含有的至少 7 个、更优选至少 9 个、最优选约 15 个~约 30 个氨基酸之间的序列。但是,包含本发明的蛋白质的氨基酸序列的约 30 个~约 50 个氨基酸或乃至全部的任意长度以及整体的,包含本发明的蛋白质的氨基酸序列的更大部分的肽或多肽也认为是本发明的抗原表位保有肽,而且其在诱导与模拟蛋白质反应的抗体方面有用。优选以在水性溶剂中提供实质性的溶解性的方式选择抗原表位保有肽的氨基酸序列(即,抗原表位保有肽的序列包含相对亲水性的残基,而且优选避免为高度疏水性序列);而且特别优选包含脯氨酸残基的序列。

[0105] 本发明的抗原表位保有肽可以通过使用本发明的基因制造重组蛋白质的任意先前方法来产生。例如,较短的抗原表位保有氨基酸序列可以在重组体产生及纯化期间、以及用于产生抗蛋白质抗体的免疫化期间与作为载体而发挥作用的更大的多肽融合。另外,抗原表位保有肽可以使用化学合成的公知方法来合成。

[0106] 另外,本发明还包括如下者:为了实现向经翻译的蛋白质的小胞体的管腔内、或者周质空间内、或者细胞外环境内的分泌,而将适当的分泌信号编入所表达的蛋白质中。所述分泌信号可以相对于多肽而为内因性,这些信号也可以是异种信号。

[0107] 因此,本发明的蛋白质能够以如融合蛋白质般经改造的形态进行表达,而且不仅可以包含分泌信号,也可以包含附加的异种的功能性区域。例如,为了改善附加的氨基酸,特别是带电氨基酸的区域在宿主细胞内的于纯化期间、或者连续操作及保存期间的稳定性

以及持续性,可以将其附加在蛋白质的 N 末端。另外,为了使纯化变得容易,可以将肽部分附加在蛋白质上。此种区域可以在最终制备蛋白质之前去除。尤其是为了产生分泌或排出、改善稳定性、以及使纯化变得容易而进行的肽部分对蛋白质的附加,是在本领域中已众所周知且日常性的技术。

[0108] 优选的融合蛋白质,包含源自对蛋白质的可溶化有用的免疫球蛋白的异种区域。例如,EP A 0 464 533(另外,加拿大对应申请案 2045869)中揭示有包含其他人类蛋白质或其一部分,并且包含免疫球蛋白分子中的恒定区的各种部分的融合蛋白质。在大多数情况下,融合蛋白质中的 Fc 部分十分有利于在治疗以及诊断中使用,因此例如产生经改善的药物动力学的特性(EP A 0232 262)。另一方面,在几种应用中,较理想的是融合蛋白质以所记载的有利的形态获得表达、检测以及纯化后可缺失 Fc 部分。此种情形是判明 Fc 部分是在治疗以及诊断中的使用的妨碍的情形(例如将融合蛋白质用作免疫抗原的情形)。在药物筛选中,例如 hIL-5 之类的人类蛋白质以用于鉴定 hIL-5 的拮抗剂的高处理能力筛选分析法为目的而与 Fc 部分融合。参照 D. Bennett 等人所著的 *Journal of Molecular Recognition* Vol. 8 :52-58(1995)、以及 K. Johanson 等人所著的 *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 270, No. 16, 9459-9471 页 (1995)。

[0109] (1-2) 功能

[0110] 关于本发明的蛋白质的功能,列举上述的 SITH-1 蛋白质为例进行详细说明。

[0111] SITH-1 基因如下述实施例所示,常在 HHV-6 潜伏感染的细胞的细胞质中进行表达,另一方面,在增殖感染细胞中未见其表达。编码 SITH-1 蛋白质的基因,是由与目前为止所报告的 HHV-6 潜伏感染特异性基因(H6LT)具有互补链关系的 DNA 所编码,其表达会在 HHV-6 的潜伏感染的中间阶段增强。

[0112] 根据这些事实,可以认为 SITH-1 蛋白质是在 HHV-6 的潜伏感染时进行特异性表达的蛋白质,且可知其是与目前为止鉴定出的参与 HHV-6 的潜伏感染的蛋白质明显不同的蛋白质。

[0113] 此外,本发明者进行 SITH-1 蛋白质的功能分析的结果,可知 SITH-1 蛋白质与作为宿主蛋白质的 CAML(calcium-modulating cyclophilin ligand,钙离子信号调节亲环素配体,Accession# ;U18242)结合,并使星形胶质细胞等神经胶质细胞的细胞内钙浓度上升。CAML 是如下的蛋白质:已知其在宿主生物体内大量存在于脑与淋巴球中,且使细胞内的钙浓度上升。另外,可以认为由 SITH-1 蛋白质的表达所引起的细胞内钙浓度的上升会带来潜伏感染细胞内的全面的信号传递活化,并有助于 HHV-6 的有效率的再活化。

[0114] 此处所谓“神经胶质细胞”是指包含星形胶质细胞(astrocyte)、少突胶质细胞(oligodendrocyte)、小胶质细胞(microglia)以及室管膜细胞(ependymal cell)之类的中枢神经系统的神经胶质细胞的成熟细胞、前体细胞的所有神经胶质细胞,除此以外,还可包括末梢神经系统中的卫星细胞(satellite cell)、雪旺细胞(Schwann cell)以及末梢神经胶质细胞(terminal gliocyte)。

[0115] 已知 HHV-6 在脑内的星形胶质细胞等神经胶质细胞中潜伏感染,可认为如果潜伏感染时或处于活性较高的潜伏感染状态即中间阶段的 HHV-6 使 SITH-1 获得表达,则星形胶质细胞等神经胶质细胞内的钙浓度会上升。根据最近的精神科学领域的研究,一般认为使脑的细胞中的细胞内钙浓度上升与情绪障碍等精神障碍有很大的关系。

[0116] 另外,实际上已知如实施例所示,如果使 SITH-1 蛋白质在小鼠的星形胶质细胞等神经胶质细胞中表达,则会产生作为精神障碍的情绪障碍样症状与过敏性亢进。此现象强烈显示在星形胶质细胞等神经胶质细胞中潜伏感染的 HHV-6 可以经由 SITH-1 蛋白质而引起精神障碍。

[0117] 另外,HHV-6 不仅可以在星形胶质细胞中潜伏感染,也可以在小胶质细胞等其他神经胶质细胞中潜伏感染,因此抑郁症或躁郁症等精神障碍的原因不仅在于星形胶质细胞,也可能是其他神经胶质细胞。

[0118] 根据以上的见解,本发明的蛋白质是保持与作为宿主蛋白质的 CAML 的结合活性,并具有使细胞内钙浓度上升的功能的蛋白质。另外,已判明通过使本发明的蛋白质在被认为是此蛋白质会最强烈地进行表达的星形胶质细胞等神经胶质细胞中表达,可以诱导精神障碍。因此,可以认为本发明的蛋白质会在疱疹病毒的潜伏感染时或者再活化早期进行表达,并具有使宿主产生精神障碍的功能。

[0119] (1-3) 基因以及蛋白质的获得方法

[0120] 本发明的基因以及蛋白质的获得方法(或者生产方法)并无特别限定,可以列举以下所示的各方法作为代表性方法。

[0121] <蛋白质的获得方法>

[0122] 获得本发明的蛋白质的方法(或者蛋白质的生产方法)如上所述并无特别限定,首先可以列举从含有本发明的蛋白质的生物学样本(例如细胞、组织、生物个体等)等中单纯纯化的方法。另外,纯化方法也无特别限定,只要利用公知方法从细胞或组织中制备细胞提取液,然后通过公知方法,例如使用管柱等对该细胞提取液进行纯化即可。例如可以将将从细胞或组织中提取的粗蛋白质分层注入高效液相色谱仪(HPLC)中,来纯化、分离本发明的蛋白质。

[0123] 另外,作为其他获得本发明的蛋白质的方法,也可列举使用基因重组技术等的方法。于此种情况时,例如可以采用如下的方法等:将本发明的基因装在载体等之上,然后通过公知方法,将其可表达地导入到宿主细胞中,然后对在细胞内被翻译而获得的所述蛋白质进行纯化。关于基因的导入(转化)或基因的表达等的具体方法见下文。

[0124] 此外,当如上所述般将外源基因导入宿主中时,由于结合外源基因表达之用而于宿主内发挥功能的启动子(promoter)的表达载体、以及宿主存在多样的选择,因此只要选择符合目的者即可。对所产生的蛋白质进行纯化的方法因所使用的宿主、蛋白质的性质而各异,但可以通过利用标签等而较容易地纯化目标蛋白质。

[0125] 关于制作变异蛋白质的方法也无特别限定。例如可以使用以下等众所周知的变异蛋白质制作法:利用部位特异性突变诱发法(Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275(1995)等)、PCR法将点突变导入碱基序列中来制作变异蛋白质的方法,或者通过插入转座子来制作突变株的方法。通过使用这些方法,针对编码所述(a)的蛋白质的cDNA的碱基序列,以使一个或数个碱基被取代、缺失、插入及/或附加的方式对其加以改变,由此可制作变异蛋白质。另外,变异蛋白质的制作也可以利用市售的套件。

[0126] 本发明的蛋白质的获得方法并不限于上述,例如也可以是使用市售的肽合成器等进行化学合成的方法。另外,作为其他例,也可以利用无细胞类的蛋白质合成液,由本发明的基因合成本发明的肽。

[0127] < 基因的获得方法 >

[0128] 获得本发明的基因的方法（或者基因的生产方法）也如上所述般并无特别限定，例如可以列举利用差异筛选 (differential screening) (消减克隆 (subtraction cloning)) 的方法。在该方法中，只要根据公知的技术，反复进行试验管内的直接杂交，然后对目标 cDNA (本发明的基因) 进行浓缩即可。

[0129] 关于所述差异筛选中的各步骤，只要在通常使用的条件下进行即可。由此所获得的克隆体可以通过制作限制酶图谱以及确定其碱基序列 (测序) 而进一步详细分析。通过这些分析，可以容易地确认是否获得了包含本发明的基因序列的 DNA 片段。

[0130] 另外，作为获得本发明的基因的方法，可以列举利用公知技术将包含本发明的基因的 DNA 片段分离，并进行克隆的方法。例如只要制备与所述 cDNA 序列的一部分序列特异性杂交的探针，然后筛选基因组 DNA 库或 cDNA 库即可。作为此种探针，只要是与所述各 cDNA 序列或其互补序列的至少一部分特异性杂交的探针，则可以使用任意的序列、任意的长度。

[0131] 另外，作为获得本发明的基因的方法，可以列举使用 PCR 等扩增方法的方法。例如从本发明的基因的 cDNA 序列中的 5' 侧以及 3' 侧的序列 (或者其互补序列) 中分别制备引物，使用这些引物将基因组 DNA (或者 cDNA) 等制成模板后进行 PCR 等，并将夹在两引物之间的 DNA 区域扩增，由此可以大量获得包含本发明的基因的 DNA 片段。

[0132] 另外，也可以依据基因序列信息，使用公知的化学合成来合成具有该序列的多核苷酸。

[0133] (2) 本发明的抗体

[0134] 本发明的抗体，是以本发明的蛋白质、例如所述 (a) 或 (b) 中所记载的蛋白质、或者其部分肽作为抗原，通过公知方法而以多克隆抗体或单克隆抗体的形式获得的抗体。作为公知方法，例如可以列举文献 (Harlow 等人所著的“Antibodies :A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988))、岩崎等人所著的“单克隆抗体杂交瘤与 ELISA, 讲谈社 (1991)”) 中所记载的方法。以所述方式获得的抗体可以用于本发明的蛋白质的检测、测定等。

[0135] 例如，所述 (1-1) 栏中所记载的本发明的抗原表位保有肽是用于通过此领域中众所周知的方法诱导抗体。例如参照 Chow, M. 等人所著的 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 910-914 ; 以及 Bittle, F. J. 等人所著的 J. Gen. Virol. 66 : 2347-2354 (1985)。通常，动物可以利用游离肽而免疫化，但是抗蛋白质抗体效价可以通过将肽耦合于高分子载体 (例如，匙孔笠贝血蓝蛋白 (KLH, keyhole limpet hemocyanin) 或破伤风类毒素) 上而追加免疫。例如，含有半胱氨酸的肽可以使用如间马来酰亚胺苯甲酰 -N- 羟基丁二酰亚胺酯 (MBS) 之类的连接子而耦合于载体上，另一方面，其他肽可以使用如戊二醛之类的更普通的连结剂而耦合于载体上。如兔子、大鼠、以及小鼠之类的动物，是利用游离肽或载体 - 耦合肽中的任意者，通过例如约 100 μ g 的包含肽或载体蛋白质以及福氏佐剂 (freund adjuvant) 的乳液的腹腔内及 / 或皮内注射而免疫化。为了提供例如使用吸附在固体表面的游离肽并通过 ELISA 法而可以检测出的有用的效价的抗蛋白质抗体，需要以例如约 2 周的间隔进行几次追加免疫注射。来自免疫化动物的血清中的抗蛋白质抗体的效价可以通过选择抗蛋白质抗体，例如通过利用该领域中众所周知的方法在固体支持体上吸附肽、以及使所选择的抗体溶析而增加。

[0136] 另外,在本说明书中,术语“抗体”是指免疫球蛋白(IgA、IgD、IgE、IgG、IgM以及它们的Fab片段、F(ab')₂片段、Fc片段),作为例子可以列举多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体、抗个体基因型抗体以及人源化抗体,但并不限于这些抗体。

[0137] 在本说明书中,术语“识别本发明的蛋白质的抗体”是指包含可以与所述本发明的蛋白质特异性结合的完整的分子以及抗体片段(例如Fab以及F(ab')₂片段)。Fab以及F(ab')₂片段欠缺完整抗体的Fc部分,其通过循环可更加迅速地被去除,而且可以几乎不具有完整抗体的非特异性组织结合(Wahl等人所著的J. Nucl. Med. 24:316-325(1983))。因此优选这些片段。

[0138] 或者,能够识别本发明的蛋白质的进一步的抗体可以通过使用抗个体基因型抗体而由两个步骤产生。此种方法是利用抗体本身是抗原这一事实,因此可以获得与二次抗体结合的抗体。根据该方法,本发明的蛋白质特异性抗体用于使动物(优选小鼠)免疫。继而,此种动物的脾细胞用于产生杂交瘤细胞,而杂交瘤细胞为了鉴定如下的克隆体而受到筛选,此克隆体可产生与本发明的蛋白质特异性抗体结合的能力可以被本发明的蛋白质抗原阻断的抗体。此种抗体包含针对本发明的蛋白质特异性抗体的抗个体基因型抗体,而且为了诱导本发明的蛋白质特异性抗体的进一步形成,其可用于使动物免疫。

[0139] 已明确Fab及F(ab')₂以及本发明的抗体的其他片段可以根据本说明书所揭示的方法来使用。此种片段具有代表性的是通过使用如木瓜蛋白酶(产生Fab片段)或胃蛋白酶(产生F(ab')₂片段)之类的酶的蛋白质分解进行切断而产生。或者,本发明的蛋白质结合片段可以通过重组DNA技术的应用或合成化学而产生。

[0140] 为了对人进行诊断,而使用体内(in vivo)的成像来检测上升水平的本发明的蛋白质时,可以优选使用“人源化”嵌合单克隆抗体。此种抗体可以使用源自生成所述单克隆抗体的杂交瘤细胞的遗传构建物而生成。用于生成嵌合抗体的方法在此领域中众所周知。总论参照Morrison, Science 229:1202(1985); Oi等, BioTechniques 4:214(1986); Cabilly等,美国专利第4,816,567号; Taniguchi等, EP 171496; Morrison等, EP 173494; Neuberger等, WO 8601533; Robinson等, WO 8702671; Boulianne等, Nature 312:643(1984); Neuberger等, Nature 314:268(1985)。

[0141] (3) 本发明的重组表达载体

[0142] 本发明的重组表达载体是包含编码所述(a)或(b)中所记载的蛋白质的本发明的基因的重组表达载体。例如可以列举插入有cDNA的重组表达载体。在重组表达载体的制作中,可以使用质粒(plasmid)、噬菌体(phage)、或者粘粒(cosmid)等,但并无特别限定。另外,制作方法只要使用公知方法来进行即可。

[0143] 载体的具体种类并无特别限定,只要适当选择可以在宿主(host)细胞中表达的载体即可。即,为了对应于宿主细胞的种类使基因确实地表达而选择适当的启动子序列,将其与本发明的基因组入各种质粒等中,并使用所获得者作为表达载体即可。所述表达载体例如可以利用:噬菌体载体、质粒载体、病毒载体、逆转录病毒载体、染色体载体、游离基因载体、以及源自病毒的载体(例如细菌质粒、细菌噬菌体、酵母游离基因、酵母染色体外因子)、病毒(例如杆状病毒(baculovirus)、乳头多瘤空泡病毒(papovavirus)、痘苗病毒(vaccinia virus)、腺病毒(adenovirus)、禽痘病毒(avipoxvirus)、伪狂犬病病毒(pseudorabies virus)、疱疹病毒、慢病毒(lentivirus)以及逆转录病毒)、以及源自这些

病毒的组合的载体（例如粘粒以及噬粒（phagemid））。

[0144] 通常将质粒载体导入如磷酸钙沉淀物之类的沉淀物中、或者与带电脂质的复合物中。当载体为病毒时，可以使用适当的包装细胞株在体内包装载体，继而将其性状导入宿主细胞中。另外，逆转录病毒载体为可以复制、或者可以复制缺陷。当为后者时，病毒的增殖通常只在互补宿主细胞中产生。

[0145] 另外，优选包含针对目标基因的顺式作用（cis-acting）控制区域的载体。适当的反式作用（trans-acting）因子可以由宿主供给、或者可以由互补载体供给、或者可以在导入宿主中时由载体本身供给。作为与这方面有关的优选实施方式，较合适的是载体是提供可为诱导性及 / 或细胞型特异性的特异性表达的载体。此种载体中特别优选的载体是通过如温度以及营养添加物之类的易于操作的环境因素而具有诱导性的载体。

[0146] 在细菌中使用时，优选的载体例如包括 pQE70、pQE60、以及 pQE-9（可以从 Qiagen 公司获得）；pBS 载体、Phagescript 载体、Bluescript 载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（可以从 Stratagene 公司获得）；以及 ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（可以从 Pharmacia 公司获得）。另外，优选的真核生物载体包括 pWLNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1、以及 pSG（可以从 Stratagene 公司获得）；以及 pSVK3、pBPV、pMSG 及 pSVL（可以从 Pharmacia 公司获得）。

[0147] 为了确认本发明的基因是否已导入宿主细胞中，进而确认其是否确实在宿主细胞中表达，可以使用各种标记。即，表达载体优选包含至少一个选择标记。作为此种选择标记，例如关于真核生物细胞培养，可以列举二氢叶酸还原酶或新霉素耐性基因；关于大肠杆菌以及其他细菌中的培养，可以列举四环素耐性基因或氨苄西林（ampicillin）耐性基因等耐药性基因。另外，除此以外也可以使用宿主细胞中所缺失的基因作为标记，将包含此标记与本发明的基因的质粒等作为表达载体导入宿主细胞中。由此，可以根据标记基因的表达确认本发明的基因的导入。或者也可以使本发明的蛋白质以融合蛋白质的形式获得表达，例如也可以使用源自碗水母（*aequorea coerulea*）的绿色荧光蛋白质 GFP（Green Fluorescent Protein）作为标记，使本发明的蛋白质以 GFP 融合蛋白质的形式获得表达。另外，本发明的基因也可以与包含用于在宿主细胞中的增殖的选择标记的载体结合。

[0148] 另外，DNA 插入优选可活动地连结于适当的启动子（例如噬菌体 λ PL 启动子、大肠杆菌 lac 启动子、trp 启动子及 tac 启动子、SV40 早期启动子及后期启动子、以及逆转录病毒 LTR 的启动子）上。作为其他适当的启动子，也可以利用从业人员周知的启动子。

[0149] 在本发明中，适合使用的周知的细菌启动子之中包括：大肠杆菌 lacI 及 lacZ 启动子、T3 启动子及 T7 启动子、gpt 启动子、 λ PR 启动子及 λ PL 启动子、以及 trp 启动子。作为适当的真核生物启动子，可以列举：CMV 前早期启动子、HISV 胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子、早期 SV40 启动子及后期 SV40 启动子、逆转录病毒 LTR 的启动子（例如劳氏肉瘤病毒（RSV, Rous Sarcoma Virus）的启动子）、以及金属硫蛋白启动子（例如小鼠金属硫蛋白 I 启动子）。

[0150] 重组表达载体更优选包含用于转录开始、转录结束的部位，以及在转录区域中用于翻译的核糖体结合部位。利用载体构建物而获得表达的成熟转录物的编码部分在应翻译的多肽的起始部位包含转录开始 AUG，而且在结束部位包含位于适当位置的终止密码子。

[0151] 另外，利用高等真核生物的 DNA 的转录，可以通过向载体中插入增强子

(enhancer) 序列而增大。增强子以增大特定的宿主细胞型的启动子的转录活性的方式发挥作用,通常为约 10 ~ 300bp 的 DNA 的顺式作用外因子。作为增强子的例子,可以列举:SV40 增强子(其位于复制起点的后期侧上的 100 ~ 270bp 处)、巨细胞病毒的早期启动增强子、复制起点的后期侧上的多瘤增强子、以及腺病毒增强子。

[0152] 另外,所述宿主细胞并无特别限定,可以优选使用先前公知的各种细胞。作为适当的宿主的代表例,可以列举:菌体(例如大肠杆菌细胞、链霉菌(streptomyces)细胞、以及鼠伤寒沙门氏杆菌(salmonella typhimurium)细胞);真菌细胞(例如酵母细胞);昆虫细胞(例如果蝇(drosophila)S2 细胞以及甜菜夜蛾(spodoptera)Sf9 细胞);动物细胞(例如 CHO 细胞、COS 细胞、以及 Bowes 黑色素瘤细胞);以及植物细胞。更具体而言,不仅可以列举人类或小鼠等哺乳类的细胞,而且例如以源自家蚕的细胞为首,可以列举果蝇等昆虫、大肠菌(Escherichia coli)等细菌、酵母(作为出芽酵母的酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或作为裂殖酵母的粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe))、作为线虫的秀丽隐杆线虫(Caenorhabditiselegans)、滑爪蟾(Xenopus laevis,非洲爪蟾)的卵母细胞等,但并无特别限定。用于所述宿主细胞的适当的培养基以及条件可以利用该领域中周知者。

[0153] 将所述表达载体导入宿主细胞中的方法,即转化方法也无特别限定,可以优选使用电穿孔法、磷酸钙法、脂质体法、DEAE 葡聚糖法、显微注射法、阳离子性脂质媒介转染、性状导入、感染等先前公知的方法。这些方法记载在如 Davis 等人所著的 Basic Methods In Molecular Biology(1986) 之类的许多标准研究室手册中。

[0154] 再者,本发明也可以提供用于重组性地生成本发明的蛋白质的部分片段的包含编码本发明的蛋白质的部分片段的多核苷酸的重组表达载体,在重组表达载体中经基因操作的转化体(宿主细胞)。

[0155] 此外,本发明也可包括关于通过上述重组技术产生本发明的蛋白质、或者其片段的发明。即,在本发明中,也可包括利用重组技术生产本发明的蛋白质或其片段的方法。通过所述技术而生产的重组蛋白质,可以通过包括硫酸铵沉淀或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水性相互作用色谱法、亲和色谱法、羟基磷灰石色谱法、以及凝集素色谱法在内的众所周知的方法从重组细胞培养物中回收,然后加以纯化。最优选将高效液相色谱法(“HPLC”)用于纯化。

[0156] (4) 本发明的转化体

[0157] 本发明的转化体是导入有本发明的基因的转化体,即导入有所述(3)项中所记载的重组表达载体的转化体。此处,所谓“导入有基因”是指通过公知的基因工程学方法(基因操作技术),可表达性地导入对象细胞(宿主细胞)内。另外,所述“转化体”不仅包括细胞、组织、器官,还包括生物个体。

[0158] 本发明的转化体的制作方法(生产方法)可以列举上述将重组表达载体转化的方法。另外,成为转化对象的生物也无特别限定,可以列举所述宿主细胞中所例示的各种微生物或动物(例如转基因小鼠)。另外,只要选择适当的启动子或载体,则植物也可以作为转化的对象。

[0159] (5) 本发明的基因检测工具

[0160] 本发明的基因检测工具是将本发明的基因中的至少一部分碱基序列或其互补序

列用作探针者。基因检测工具可以在各种条件下用于本发明的基因的表达谱的检测、测定等。

[0161] 作为本发明的基因检测工具,例如可以列举将与本发明的基因特异性杂交的所述探针固定在基板(载体)上的DNA芯片。此处的“DNA芯片”主要是指将所合成的寡核苷酸用于探针的合成型DNA芯片,但也包括将PCR产物等cDNA用于探针的粘附型DNA微阵列。

[0162] 用作探针的序列可以通过从cDNA序列中确定特征序列的先前公知方法来决定。具体而言,例如可以列举:SAGE:基因表达系列分析(Serial Analysis of Gene Expression)法(Science 276:1268,1997;Cell 88:243,1997;Science 270:484,1995;Nature 389:300,1997;美国专利第5,695,937号)等。

[0163] 此外,制造DNA芯片时采用公知的方法即可。例如当使用合成寡核苷酸作为寡核苷酸时,通过光刻(photolithography)技术与固相法DNA合成技术的组合,在基板上合成该寡核苷酸即可。另一方面,当使用cDNA作为寡核苷酸时,使用阵列机将其粘附在基板上即可。

[0164] 另外,与一般的DNA芯片相同,可以配置完全匹配探针(寡核苷酸)与在该完全匹配探针中一个碱基经取代而成的错配探针来进一步提升基因的检测精度。此外,为了使不同的基因同时进行检测,也可以将几种寡核苷酸固定在同一块基板上构成DNA芯片。

[0165] 以下,对本发明的基因检测工具进行更详细的说明。

[0166] <基板>

[0167] 作为本发明的基因检测工具中所使用的基板的材质,只要是可以稳定固定寡核苷酸的材质即可。例如可以列举聚碳酸酯或塑料等合成树脂、玻璃等,但并不限于这些。基板的形态也无特别限定,例如可以优选使用板状、膜状等的基板。

[0168] <固定在基板表面的寡核苷酸>

[0169] 固定在本发明的基因检测工具的基板表面的寡核苷酸,只要是以本发明的基因的至少一部分碱基序列为基础的寡核苷酸即可。通过在此寡核苷酸与来自样本的核酸之间形成杂交,可以检测样本中所包含的基因。再者,以下有时也将所述以本发明的基因的至少一部分碱基序列为基础的寡核苷酸称为“捕捉寡核苷酸(capture oligo)”。

[0170] 捕捉寡核苷酸只要以本发明的基因的碱基序列为基础进行设计即可。因此,可以是所述碱基序列本身,且只要与由检测对象的样本所制备的核酸形成特异性杂交,则可以包含变异。变异的位置并无特别限定。

[0171] 捕捉寡核苷酸的长度(碱基数)并无特别限定,但如果过短,则杂交的检测变得困难,如果过长,则会允许非特异性杂交。本发明者对捕捉寡核苷酸的最佳长度进行反复研究后,将标准长度设为12~50个碱基长度。优选12~40个碱基长度,更优选12~30个碱基长度,再更优选13~22个碱基长度,但并不限于这些。碱基长度主要依存于序列特性(特定碱基的含有率,相同碱基的重复),发明者确认结合性较佳者即使为短链也可以特异性杂交。

[0172] 当捕捉寡核苷酸具有妨碍与来自样本的核酸的杂交的发夹结构、环结构、或者其以外的立体结构时,通过将构成捕捉寡核苷酸的一种以上的核苷酸取代为肌苷或者与任何核苷酸均不配对的核酸,可解除其立体结构。

[0173] 捕捉寡核苷酸的合成法并无特别限定,通过公知方法(例如Maniatis, T. et

al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 中所记载的方法等) 进行合成即可。一般可使用市售的 DNA 合成机进行化学合成。

[0174] 在本发明的基因检测工具中, 优选不仅将所述基于本发明的基因的至少一部分碱基序列的寡核苷酸固定在基板表面, 而且将所谓的对照、捕捉寡核苷酸固定在基板表面。对照、捕捉寡核苷酸包括阳性对照、捕捉寡核苷酸以及阴性对照、捕捉寡核苷酸。阳性对照、捕捉寡核苷酸用于判定在下述探针制备步骤中扩增反应是否顺利进行。阴性对照、捕捉寡核苷酸用于确认未产生非特异性杂交, 即未产生疑似阳性的杂交信号。本发明也包括将这些阳性对照、捕捉寡核苷酸以及阴性对照、捕捉寡核苷酸固定在基板表面而成的基因检测工具。

[0175] 阳性对照、捕捉寡核苷酸以由检测对象的样本所制备的探针中所包含的碱基序列为基础进行设计即可。另外, 当使用同一个基因检测工具同时检测几个检测对象样本时, 可以针对各检测对象的样本来设计阳性对照、捕捉寡核苷酸, 也可以根据由几个检测对象的样本所制备的探针中共通的碱基序列来进行设计。当所有由检测对象的样本所制备的探针中不存在共通的碱基序列时, 也可以针对几组来设计阳性对照、捕捉寡核苷酸。或者, 也可以设计引物序列部分相同, 且与成为对象的细菌的序列不同的人工序列, 并将此序列的一部分作为阳性对照、捕捉寡核苷酸。将所述人工序列作为模板来制备探针 (在本说明书中, 将此种探针称为对照探针), 并将其添加至由样本所制备的探针中, 由此可以验证杂交的特异性。此外, 关于所述探针见下文。

[0176] 阴性对照、捕捉寡核苷酸优选设计为如下者: 在阳性对照、捕捉寡核苷酸的碱基序列中, 在 1 个碱基以上、且未满足此序列所具有的碱基数的 20% 的范围内包含人为的碱基取代的碱基序列。进行碱基取代的碱基数是由与杂交条件的关系所决定, 选择源自检测对象样本的探针不会产生杂交的碱基数即可。

[0177] 检测对象的样本并无特别限定。另外, 固定在 1 个基板上的捕捉寡核苷酸为至少一种以上即可, 并无特别上限。最优选将本发明的基因检测工具也制成如下的工具, 即将多个本发明的基因的部分片段 (分别具有不同的碱基序列者) 作为捕捉寡核苷酸固定在 1 个基板上的所谓微阵列型的工具。

[0178] < 寡核苷酸 (捕捉寡核苷酸) 的固定化 >

[0179] 将寡核苷酸固定在基板表面的固定化方法并无特别限定, 适当选择使用公知方法即可。例如可以利用物理性吸附、电性结合或者分子共价结合等一般杂交法中所使用的方法。在本发明的基因检测工具中, 优选使用表面具有碳二亚胺基或异氰酸酯基的基材 (美国专利: US5, 908, 746、日本专利特开平 8-23975 号) 来进行固定化。

[0180] 当对寡核苷酸进行点样 (spotting) 时, 如果寡核苷酸的点量过少, 则无法充分确保寡核苷酸与探针之间的反应性, 判定变得困难。另外, 高集成度的点样不仅在技术方面存在问题, 同时也耗费成本, 进而在使用探针的荧光标识或化学发色等的杂交信号的检测中也需要更精密且昂贵的检测装置 (例如扫描仪)。因此, 优选将寡核苷酸以直径为 10 ~ 1, 000 μm 的尺寸固定在基板的表面。将寡核苷酸点样在基板上的点样方法并无特别限定。例如可以使用点样机将寡核苷酸溶液在基板上点样, 由此来进行。由此, 寡核苷酸溶液通常点样为大致圆形。

[0181] (6) 使用本发明的蛋白质或其部分片段的检测工具

[0182] 本发明的检测工具是将本发明的蛋白质中的至少一部分氨基酸序列用作探针的检测工具。即,也可以称之为将本发明的蛋白质或其部分片段固定化的检测工具。所述检测工具可以在各种条件下用于与本发明的蛋白质相互作用的物质(多肽、核酸、抗体等)的检测、测定等。

[0183] 作为本发明的检测工具,例如可以列举将与识别本发明的蛋白质的抗体特异性结合的所述探针固定在基板(载体)上而成的检测工具等。用作探针的氨基酸序列优选使用本发明的蛋白质中的与本发明的抗体特异性相互作用的部分,即本发明的蛋白质的抗原表位保有肽。

[0184] 作为本发明的检测工具中所使用的基板的材质,只要是可以稳定固定寡肽的材质即可。例如可以列举聚碳酸酯或塑料等合成树脂、玻璃等,但并不限于这些。基板的形态也无特别限定,例如可以优选使用板状、膜状等的基板。

[0185] 另外,将寡肽固体在基板上的方法可以利用先前公知方法,并无特别限定。例如可以列举:利用共价结合法或吸附法使寡肽与不溶性载体结合的方法、利用高分子物质将寡肽的四周包围的包埋固定化方法(entrapping immobilization method)、使用交联剂等将寡肽固定在支持体上的方法等。再者,可以根据欲固定化的基板与寡肽的配合性、固定化物的利用目的而选择最佳固定化方法。

[0186] (7) 本发明的基因、蛋白质等的有用性

[0187] 如上所述,本发明的基因以及蛋白质是在疱疹病毒的潜伏感染时进行特异性表达者,可认为该蛋白质具有如下功能:通过在脑内星形胶质细胞等神经胶质细胞中进行表达,能够诱发宿主的精神障碍。

[0188] 此外,令人感兴趣的是:明确本发明的基因以及蛋白质具有与精神障碍患者的关联性。更详细而言,如下述实施例所示,在约5成的以情绪障碍为中心的各种精神障碍患者体内检测出抗SITH-1抗体,另一方面,在健康者体内几乎未检测出抗SITH-1抗体(在健康者中检测出抗SITH-1抗体的比率约小于2%)。

[0189] 如上所述,本发明者独自发现本发明的蛋白质的特异性抗体有意义地存在于以情绪障碍为中心的精神障碍患者体内,而在健康者体内几乎未检测出此种抗体这一现象。此外,由于精神障碍是指意识、智力、记忆、情感、思考、行动之类的精神功能的障碍,因此本发明中的“精神障碍”是指在日常生活或者社会生活中受到相当大的限制的状态。另外,“情绪障碍”是指持续的情绪或者情感的变化,异常地体验抑郁或者高涨的情感,并给日常生活功能或社会功能带来障碍的状态。

[0190] 关于此种“本发明的蛋白质的特异性抗体有意义地存在于精神障碍患者体内,而在健康者体内几乎未检测出”的现象的详细原因,目前正在努力研究中,但本发明的蛋白质具有在潜伏感染被诱导再活化的中间阶段会活跃地生成的性质。可认为疱疹病毒(例如HHV-6)是通过压力来诱导其再活化,从而制作本发明的蛋白质。可认为占精神障碍患者约5成的具有针对本发明的蛋白质的抗体的患者,由于压力或某种遗传性因素,而导致本发明的蛋白质在作为HHV-6的潜伏感染细胞的脑内星形胶质细胞等神经胶质细胞中大量地长时间地进行表达。其结果为:可认为星形胶质细胞等神经胶质细胞内的钙浓度长时间地持续上升,血清素的代谢等星形胶质细胞等神经胶质细胞的重要的功能受到阻碍,由此引发

精神障碍。另外,可认为在慢性疲劳症候群(CFS)患者的精神障碍中,针对本发明的蛋白质的抗体的保有率较高的原因是因为CFS患者与健康人相比,大量的HHV-6在体内潜伏感染的情况更多,且也容易产生本发明的蛋白质(SITH-1蛋白质)。此外,根据迄今为止所报告的潜伏感染特异性基因产物与CFS患者的抗体反应的结果,也反应了CFS患者与健康人相比有更多HHV-6在体内潜伏感染这一事实(参照非专利文献5)。

[0191] 如上所述,虽然只在精神障碍患者体内检测出针对本发明的蛋白质的抗体这一现象的详细的机理尚不明确,但通过利用所述现象,可以提供有助于客观判断精神障碍的判定方法或诊断方法。另外,同时本发明也涉及判定套件、诊断套件、模型动物的制作方法、药剂筛选方法。以下,对各方法进行详细说明。

[0192] (7-1) 本发明的判定方法

[0193] 本发明的判定方法只要是可判定在被实验对象生物体内是否存在识别本发明的蛋白质的抗体、即识别所述(a)或(b)中所记载的蛋白质的抗体的方法即可。再者,术语“被实验对象生物”是指人类以及人类以外的哺乳类动物。

[0194] 对于抗体的测定,例如可以通过与此抗体所识别的蛋白质或其部分片段的结合反应而检测。即,在本判定方法中,优选使用此抗体所识别的蛋白质或其部分片段,判定此抗体在免疫学(利用抗原抗体反应)上是否存在。此外,“部分片段”优选至少包含抗原表位保有肽。

[0195] 作为本判定方法的一例,可以列举如下方法:使固定有本发明的蛋白质或其部分片段的不溶性载体与从被实验对象生物体内所采集的生物学样本接触后,加以清洗,然后检测与此不溶性载体上的蛋白质或其部分片段特异性结合的抗体。而且,与该不溶性载体上的蛋白质或其部分片段特异性结合的抗体例如是来自被实验对象生物的抗体,因此可以使用针对被实验对象生物的抗体的特异性抗体、即所谓的2次抗体而容易地检测。此时,通过使2次抗体含有染料、酶或者放射性或荧光标识来增强检测,可使检测变得更加容易。

[0196] 即,作为本判定方法中所使用的抗体测定法,可以列举利用如荧光抗体法、斑点杂交测定法、西方墨点法、酶联免疫吸附测定法(包括ELISA、夹心ELISA法)、放射性免疫测定法(RIA)、以及免疫扩散测定法之类的传统免疫组织学方法的测定法。这些测定法为了分子的固定化及检测而利用如亲和素(avidin)以及生物素(biotin)之类的分子,制备这些试剂的技术以及使用其的方法可以利用从业人员所公知的技术。此外,作为本判定方法的结果,可以获得用于病理学试验的组织切片的免疫组织学染色。

[0197] 另外,本判定方法优选使用从被实验对象生物体内分离出的生物学样本来进行。术语“分离出的生物学样本”只要是包含从被实验对象生物体内采集的细胞、组织或者其残片等的样本即可,除末梢血液、唾液、尿、粪便以外,还包含细胞样本等,并无特别限定,就疱疹病毒在末梢血液中的巨噬细胞中也潜伏感染这一事实而言,特别优选使用从被实验对象生物体内采集的末梢血液。在此情况下,还具有被实验对象生物的侵袭度低这一优点。

[0198] 生物学样本中存在的抗体的量,例如可使用线性回归计算机运算法,通过与标准制备物(例如健康者的标准样本或者典型精神障碍患者的标准样本)中所存在的量的比较而简单地计算出。用于检测抗体的此种测定法,例如ELISA在Iacobelli等人所著的Breast Cancer Research and Treatment 11:19-30(1988)中有所记载。

[0199] 作为适合的酶标识,例如可以列举来自可通过与基质反应催化生成过氧化氢的氧

化酶群的酶标识。葡萄糖氧化酶由于具有良好的稳定性,而且其基质(葡萄糖)容易获得,因此特别优选。氧化酶标识的活性可以通过测定由酶-标识抗体/基质反应所形成的过氧化氢的浓度来测定。除酶以外,作为其他适合的标识,可以列举:放射性同位素(例如碘(^{125}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氡(^3H)、铟(^{112}In)、以及锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$)),以及荧光标识(例如荧光素及罗丹明)及生物素。

[0200] 从被实验对象生物体内获得的生物学样本中的抗体(针对本发明的蛋白质的抗体)水平,除可利用上述免疫测定法进行检测以外,例如也可以利用图像分析在体内进行检测。即,由于针对本发明的蛋白质的抗体也是蛋白质,因此通过使用可特异性识别此抗体的抗体,可以利用图像分析在体内检测从被实验对象生物体内获得的生物学样本中的抗体(针对本发明的蛋白质的抗体)水平。

[0201] 作为用于抗体的体内图像分析的抗体标识或者标记,可以列举能够通过X射线照相术、NMR(Nuclear Magnetic Resonance,核磁共振)、或者ESR(Electron Spin Resonance,电子自旋共振)进行检测者。关于X射线照相术,作为适合的标识,可以列举:可发射能够检测的放射线,但对被检测体并无明显伤害的钷或者铯之类的放射性同位素。作为适用于NMR以及ESR的标记,可以列举:能够利用相关联的杂交瘤的营养成分的标识而导入抗体中的如氘之类的具有可检测的特征性自旋的元素。

[0202] 利用如放射性同位素(例如 ^{131}I 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、射线不透性(radio-opaque)基质、或者通过核磁共振能够检测的物质之类的适当的可检测的图像分析部分,标识针对本发明的蛋白质的抗体的特异性抗体或抗体片段,再将其导入被用于障碍试验的哺乳动物体内(例如非经口的、皮下、或者静脉内)。本领域的技术人员可以理解:用于产生诊断用的图像所必需的图像分析部分的量是由被检测体的大小以及所使用的图像分析系统来决定。在放射性同位素部分的情况下,对于人类被检测体,所注射的放射活性的量通常约为5~20毫居里的范围的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。继而,标识抗体或者抗体片段优先储存在包含针对本发明的蛋白质的抗体的细胞的位置。此外,关于体内的肿瘤的图像分析,在S. W. Burchiel等人所著的“Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments”(Tumer Imaging 第13章:The Radiochemical Detection of Cancer, Burchiel, S. W. 以及 Rhodes, B. A. 编, Masson Publishing Inc. (1982))中有所记载。

[0203] 关于可以在本发明中利用的标识,以下揭示具体例。作为适合的酶标识的例子,可以列举:苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)、金黄色葡萄球菌核酸酶(staphylococcus nuclease)、酵母乙醇脱氢酶(yeast alcohol dehydrogenase)、 α -甘油磷酸脱氢酶(α -glycerophosphate dehydrogenase)、磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase)、过氧化物酶(peroxidase)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)、天冬酰胺酶(asparaginase)、葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)、 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)、核糖核酸酶(ribonuclease)、脲酶(urease)、过氧化氢酶(catalase)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase)、糖化酶(glucoamylase)、以及乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase)。

[0204] 作为适合的放射性同位素标识的例子,可以列举: ^3H 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{57}To 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{152}Eu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{217}Ci 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 等。 ^{111}In 是采用体内成像时优选的同位素。其原因在于:其可避免因利用 ^{125}I 或者 ^{131}I 所标识的单克隆抗体会被肝

脏脱卤化的问题。此外,此放射性核素具有更优选用于成像的 γ 射线放射能 (Perkins 等人所著的 Eur. J. Nucl. Med. 10 :296-301(1985) ;Carasquillo 等人所著的 J. Nucl. Med. 28 :281-287(1987))。例如,使用 1-(P- 异硫氰酸酯苄基)-DPTA 与单克隆抗体耦合的 ^{111}In 几乎未表现出进入非肿瘤性组织 (特别是肝脏) 的情况。因此,增强肿瘤局部化的特异性 (Esteban 等人所著的 J. Nucl. Med. 28 :861-870(1987))。

[0205] 作为适合的非放射性同位素标识的例子,可以列举: ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Tr 、以及 ^{56}Fe 。

[0206] 作为适合的荧光标识的例子,可以列举: ^{152}Eu 标识、荧光素标识、异硫氰酸酯标识、罗丹明标识、藻红蛋白标识、藻蓝蛋白标识、别藻蓝蛋白标识、邻苯二醛标识、以及荧光胺 (fluorescamine) 标识。

[0207] 作为适合的毒素标识的例子,可以列举:白喉毒素、赖氨酸、以及霍乱毒素。

[0208] 作为化学发光标识的例子,可以列举:鲁米诺 (luminal) 标识、异鲁米诺 (isoluminal) 标识、芳香族吡啶酯标识、咪唑标识、吡啶盐标识、草酸酯标识、虫荧光素 (luciferin) 标识、荧光素酶 (luciferase) 标识、以及水母发光蛋白 (aequorin) 标识。

[0209] 作为核磁共振造影剂的例子,可以列举:如 Gd、Mn、以及 Fe 之类的重金属原子核。

[0210] 用于使所述标识与抗体结合的代表性技术是由 Kennedy 等人所著的 (Clin. Chim. Acta 70 :1-31(1976)) 以及 Schurs 等人所著的 (Clin. Chim. Acta 81 :1-40(1977)) 所提供。后者中所提及的耦合技术是戊二醛方法、过碘酸方法、二马来酰亚胺方法、间马来酰亚胺苄基-N-羟基-丁二酰亚胺酯方法,这些方法均作为参考而引用至本说明书中。

[0211] (7-2) 诊断方法

[0212] 本发明的诊断方法只要使用所述判定方法即可,其他具体的构成、条件等并无特别限定。例如在被实验对象的患者或被实验动物体内,可以将存在本发明的抗体的情况作为指标,判定此被实验对象的患者或被实验动物患有精神障碍。另外,当将本发明的抗体的定量值作为指标进行诊断时,也能够以健康者的定量值 (正常值) 或典型精神障碍患者的定量值 (疾病值) 为参考设定适当的临界值,如果超过或者低于此临界值,则诊断为患有精神障碍的可能性高。在本发明中,精神障碍的发病会导致所述抗体的量增加,因此例如将健康者的定量值 (正常值) 设定为临界值时,如果被实验者的测定值超过此临界值,则可判定为患有精神障碍的可能性高。

[0213] 此外,在本说明书中,术语“被实验者”是指人类,“被实验动物”是指人类以外的动物,例如包括小鼠、大鼠、以及猴子等,只要是人类以外的动物,任何动物均可成为“被实验动物”。

[0214] 因此,根据本诊断方法,可以简便且正确地诊断被实验对象生物是否患有精神障碍、或者被实验对象生物是否有患上精神障碍的可能性。另外,针对被实验动物的诊断方法,在例如开发精神障碍的治疗药时的药剂筛选、或者用于试验药剂效果的动物实验等中非常有用。

[0215] (7-3) 判定套件、诊断套件

[0216] 本发明的判定套件或诊断套件只要是用于实施所述 (7-1) 项中所说明的判定方法、或者所述 (7-2) 项中所说明的诊断方法者即可,其所包含的具体的构成、材料、机器等并无特别限定。具体而言,为了从免疫学上检测本发明的抗体,优选包含以下的 (i) ~

(iii) 中的任意物质。(i) 本发明的蛋白质,(ii) (i) 的部分片段(优选包含抗原表位保有肽),(iii) 将 (i) 或 (ii) 固定化的检测工具。

[0217] 如果使用如上所述的构成的套件,则可简便且可靠地实施本发明的判定方法或诊断方法,因此此套件非常有用。

[0218] 另外,除所述构成以外,也可包含用于实施所述判定方法或诊断方法的各步骤的物质。例如为了从被实验对象生物体内采集样本,也可以包含例如注射器等作为用于采集末梢血液的器械,还可列举用于实施本判定方法或诊断方法的所需物,例如各种试剂(例如用于进行 ELISA 等免疫学反应的试剂类等)或实验工具。另外,还可包含为了更加简便且正确地进行所述判定而需要的各种运算装置(例如计算机等)或软件。

[0219] (7-4) 模型动物的制作方法、判定法、筛选方法、评价方法

[0220] 本发明的诊断方法可以在除人类以外的精神障碍模型动物的制作法、判定有用性的方法、以及使用此种模型动物的药物筛选中,应用于判定药物的有效性的方法。即,当制作精神障碍模型动物时,如实施例所述,可以利用载体等将 SITH-1 蛋白质导入动物的脑内来制作精神障碍模型。另外,当判定精神障碍模型动物的有用性时,与所述判定方法或诊断方法相同,可以根据有无本发明的抗体,判断被实验动物是否出现精神障碍的症状,如果此动物出现精神障碍的症状,则判定其可用作精神障碍模型动物。

[0221] 在所述各种方法中,更优选结合利用目前为止已知的动物的行为障碍或恐怖反应等的诊断方法来作为评价方法。具体而言,动物实验的诊断可以使用悬尾实验或强迫游泳实验等行为障碍相关试验或、者恐怖反应等已知的脑功能试验。

[0222] 另外,此处的“被实验动物”只要是人类以外的动物即可,优选特别适合用作实验动物的小鼠、大鼠、豚鼠、狗、兔子、猴子、黑猩猩等。由于对于人类以外的动物的精神障碍的判定(诊断)更加困难,所以此方法极为有用。此外,向此种模型动物给予精神治疗药物或者抗精神病药(治疗或改善精神障碍的药剂)的候选物质后,除行为障碍的检查以外,如上所述般检测本发明的抗体,如果精神障碍得到治愈或改善,则可判断所述候选物质具有抗精神障碍作用。即,只要利用本发明的诊断方法,便可容易且可靠地筛选精神治疗药物的候选物质。此处所谓“精神治疗药物的候选物质”可以是试验者所期望的任意物质。

[0223] 此外,本发明的判定方法或诊断方法等的主题在于,通过检测针对在疱疹病毒的潜伏感染时进行特异性表达的蛋白质的抗体,提供用于判定是否患有精神障碍的客观判定方法,而并不在于本说明书中所具体记载的各个操作。因此,使用所述各操作以外的操作的判定方法或诊断方法也属于本发明的范围。

[0224] 除此以外,由于疱疹病毒的感染与实施例中也提到的 CFS 等伴有免疫不全的疾病(例如克罗恩病(Crohn disease)等自身免疫性疾病等)、或者药物诱导超敏症候群(Drug-induced hypersensitivity syndrome)等被认为与 HHV-6 有关的皮肤疾病、或者由 HHV-6 所引起的脑炎、脑病的关联性,因此可认为本发明针对这些疾病也能够客观地诊断、评价。

[0225] 即,通过利用本发明的蛋白质以及基因等,可将其用作提示 HHV-6 有参与的各种疾病的疾病标记。

[0226] 另外,本发明也包括导入上述本发明的基因、此基因产物(例如由基因所编码的蛋白质)或者具有此基因的重组表达载体而成的模型动物。如上所述,本发明的基因与精

神障碍相关,因此导入本基因、本基因产物(例如被基因编码的蛋白质等)、或者具有该本基因的重组表达载体而成的模型动物表现出精神障碍的症状。作为所述精神障碍的症状,除躁郁症样症状、狂躁症样症状、抑郁症样症状以外,例如基于检查方法还可列举精神分裂症样症状。

[0227] 成为对象的动物只要可用作实验动物,则并无特别限定,特别优选哺乳动物,例如可以列举:小鼠、大鼠、猴子等。

[0228] 另外,所述基因、基因产物以及重组表达载体的导入方法可利用先前公知方法,并无特别限定。例如,此蛋白质在脑内的表达方法可以是利用腺病毒载体的方法,也可以是利用逆转录病毒载体的方法(参照下述实施例),当然也可以是利用除此以外的载体的方法。另外,可以是通过一般的转基因(制作转基因小鼠)来导入基因的方法。此外,也可以是直接将该蛋白质接种于脑内的方法。

[0229] 此种精神障碍模型动物可以较好地用于精神障碍的治疗法的研究,药剂效果的研究、判定,药剂以外的治疗方法(温热疗法等)的评价等,且非常有用。

[0230] 此外,也可以进行关于精神障碍的发病原因的研究。例如通过研究疲劳或压力在何种程度上对诱导精神障碍产生作用,而可用于精神障碍的发病预防的研究。

[0231] 以下揭示实施例来对本发明的实施方式进行更详细的说明。当然,本发明并不限定于以下的实施例,且详细部分可能有各种形态。此外,本发明并不限定于上述实施方式,可以在权利要求所示的范围内进行各种变更,适当组合所揭示的各种技术方法而获得的实施方式也包括在本发明的技术范围内。

[0232] [实施例]

[0233] <1. 编码潜伏感染蛋白质 SITH-1 的基因产物(mRNA)的鉴定>

[0234] 从非专利文献 1 中所示的 HHV-6 潜伏感染的巨噬细胞中分离出信使 RNA(mRNA),使用 IE4RB 作为随机引物以及正义转录物(sense transcripts)的逆转录用引物,并使用 IE2FB 作为反义转录物(anti-sense transcript)的逆转录用引物来进行逆转录反应。其后使用引物 IE4RB 与 IE2FB 并利用 PCR 法使逆转录产物(cDNA)扩增,然后使用内侧的引物 IE4RA 与 IE2FA 并通过双巢式(double-nested)PCR 法使此产物扩增。图 1 表示公知的增殖感染时的 mRNA 与正义转录物(H6LT)与新颖潜伏感染特异性基因的位置关系、以及潜伏感染特异性蛋白质 SITH-1 的开放阅读框。SITH-1 以及新颖潜伏感染特异性基因的序列信息参照序列表。

[0235] 其结果为:与由在 HHV-6 增殖感染的 MT-4 细胞中表达的 mRNA 扩增的 351bp 的产物、以及非专利文献 3 中所示的由 HHV-6 在巨噬细胞(MΦ)内的潜伏感染时所检测出的潜伏感染特异性基因产物(HHV-6latency-associated transcript:H6LT)扩增的 351bp 的产物均不同的 925bp 的产物获得扩增。

[0236] 由于与来自 HHV-6DNA 的扩增产物 1241bp 不同,仅由 HHV-6 潜伏感染细胞的反义转录产物的逆转录产物进行扩增,因此显示其为目前尚未发现的新颖潜伏感染特异性基因产物(参照图 2)。图 2 中,“R”表示随机引物,“S”表示正义转录产物,“anti-S”表示反义转录产物。

[0237] 为了确定此新颖潜伏感染特异性基因 mRNA 的结构,实施 5' -cDNA 末端快速扩增(5' -rapid amplification of cDNA ends)(RACE)法与 3' -RACE 法来确定 5' -末端与

3' - 末端,同时确定整个碱基序列(参照图3)。

[0238] IE4RB :5' GATGCTCCTTCTTCCACATTACTGG 3'

[0239] IE2FB :5' CATCCCATCAATTATTGGATTGCTGG 3'

[0240] IE2FA :5' GAAACCAC-CACCTGGAATCAATCTCC 3' .

[0241] IE4RA :5' GACACATTCTTGGAAGCGATGTCG 3'

[0242] N1 :5' GCTGGGTAGTCCCCACCTTTCTAGA 3' .

[0243] α F1 :5' CTGAAGCATGTAAGCACATCTCTTGC 3'

[0244] α R1 :5' GCTTCGAGATCAGTAGTGGTACG 3'

[0245] <2. 新颖潜伏感染特异性基因蛋白质 SITH-1 的功能分析 >

[0246] 为了研究蛋白质 SITH-1 的功能,进行蛋白质 SITH-1 在细胞内所结合的宿主蛋白质的鉴定。其方法为:将蛋白质 SITH-1 作为诱饵蛋白(bait),并通过酵母双杂交法进行人类胎儿脑 cDNA 库的筛选。将其结果示于图4。图4中,A是通过 SITH-1 与 CAML 的结合,而可见较强的 β-半乳糖苷酶表达的酵母的克隆体。B是通过西方墨点法与抗 CAML 抗体的染色,来确认可以通过体外的沉淀实验(pull-down assay)并利用在大肠菌中表达的 GST-SITH-1 融合蛋白质使在大肠菌中表达的 CAML 共沉淀的图。C是表示通过西方墨点法与抗 FLAG 抗体的染色确认利用表达载体将贴有 FLAG 标签的 SITH-1 与 CAML 导入到 293T 细胞中,通过抗 CAML 抗体可以使 SITH-1 共沉淀的结果的图。如图4所示,显示蛋白质 SITH-1 与 CAML(Calcium-signalmodulating cyclophilin ligand) 强力结合(图4)。

[0247] 有报告称,CAML 是在淋巴球或脑内表达较强的蛋白质,已知其具有使细胞内钙浓度上升的功能。因此,对蛋白质 SITH-1 是否经由 CAML 使细胞内钙浓度上升进行了研究。具体而言,利用抗 SITH-1 抗体与抗 CAML 抗体,通过荧光抗体法对 SITH-1 获得表达的星形胶质细胞样神经胶质细胞株(U373)与未处理的 U373 细胞进行染色。其结果为:如果使蛋白质 SITH-1 在星形胶质细胞株(U373)中获得表达,则可观察到 CAML 的量与未处理的 U373 细胞相比有所增加(图5)。此外,U373 细胞中的 CAML 表达水平在未处理时并不强,但通过使 SITH-1 表达,观察到 CAML 的量增加。

[0248] 另外,利用毒胡萝卜素(TG, thapsigargin)来刺激使用逆转录病毒载体将 SITH-1 导入星形胶质细胞样神经胶质细胞株(U373)中所得者、以及仅导入载体者,再使用 Fura2 测定细胞内钙浓度。其结果为:实际测定细胞内钙浓度时,与仅导入载体的细胞相比,SITH-1 获得表达的星形胶质细胞的细胞内钙浓度会因毒胡萝卜素(TG)刺激而显著上升(图6)。

[0249] 由此可知,蛋白质 SITH-1 具有通过在蛋白质 HHV-6 的潜伏感染时进行表达,并使细胞内 CAML 的量增加,而使星形胶质细胞样神经胶质细胞株的细胞内钙浓度上升的功能。

[0250] <3. SITH-1 与精神障碍的关系 >

[0251] 其次,对 SITH-1 与精神障碍的关系进行了调查。将其结果示于图7。针对 SITH-1 的抗体与非专利文献5等中所报告的潜伏感染基因蛋白质不同,与慢性疲劳症候群患者本身的关联性较低,但在具有精神障碍的患者中有高比率的抗体携带者。伴有精神症状的慢性疲劳症候群(CFS)患者主要表现出抑郁症状的情况居多,而儿童的 CFS 患者主要表现出异常的兴奋性的情况居多。双极 I 型表示症状较强的躁郁病患者。另外,健康成人几乎未携带针对 SITH-1 的抗体。此外,以 SITH-1 获得表达的 293T 细胞作为抗原,通过荧光抗体

法来测定抗体效价。

[0252] <4. 通过 SITH-1 的表达制作精神障碍模型小鼠 >

[0253] 利用腺病毒载体或者逆转录病毒载体,将在 SITH-1 的开放阅读框上游附加有于星形胶质细胞等神经胶质细胞中进行特异性表达的胶质纤维酸性蛋白 (GFAP, glial fibrillary acidic protein) 启动子所成者注射到新生小鼠的脑内。在约 4 ~ 5 周后观察小鼠的行动,确认通过导入 SITH-1 而建立了精神障碍模型小鼠。

[0254] 有关精神障碍的试验,是采用在抑郁症或躁郁症等的观察中经常使用的通过悬尾实验与强迫游泳实验进行研究。具体而言,首先进行利用腺病毒载体而导入有 SITH-1 的小鼠的悬尾实验。其结果为:导入有 SITH-1 的小鼠的不动时间显著减少,可知此小鼠为躁狂状态(图 8)。继而,进行利用逆转录病毒载体而导入有 SITH-1 的小鼠的强迫游泳实验。其结果为:以高效价 (high) 导入有 SITH-1 逆转录病毒载体的小鼠与作为对照的导入有增强型绿色荧光蛋白 (EGFP, enhanced green fluorescence protein) 基因的小鼠相比,不动时间延长,显示呈抑郁状态。相对于此,可知以低效价 (low) 导入有 SITH-1 逆转录病毒载体的小鼠的不动时间缩短,且呈躁狂状态(图 9)。即,在悬尾实验中观察到躁狂状态,而通过强迫游泳实验观察到躁狂状态与抑郁状态。另外,通过导入 SITH-1 时的逆转录病毒载体的效价观察到躁狂状态与抑郁状态两者的情况,不仅表示此模型可以成为抑郁症与躁郁症两者的模型,还提示 SITH-1 的表达量会影响精神障碍的症状。

[0255] 此外,通过测定前脉冲抑制 (Prepulse inhibition) 来研究在躁郁症或精神分裂症中可观察到异常的恐怖反应异常。具体而言,对利用腺病毒载体而导入有 SITH-1 的小鼠的恐怖反应(前脉冲抑制)进行了调查。其结果如图 10 所示:可知导入有 SITH-1 的小鼠的前脉冲抑制显著减少,且小鼠对于刺激非常过敏。因此,在恐怖反应中也观察到显著异常,显示 SITH-1 对与精神障碍相关的脑功能有较大影响。

[0256] <5. 通过 SITH-1 的表达制作精神障碍模型小鼠 2 >

[0257] 其次,将 SITH-1 的开放阅读框连结在 GFAP 启动子下,并利用腺病毒载体使其在小鼠的神经胶质细胞中进行表达,3 周后通过转轮活动 (Wheelrunning activity) (转轮旋转) 测定自主活动量。将结果示于图 11。

[0258] 如该图所示, SITH-1 获得表达的小鼠与作为对照的 EGFP (enhanced green fluorescence protein) 获得表达的小鼠相比,自主活动亢进,显示变成躁狂状态的倾向。

[0259] <6. 通过 SITH-1 的表达制作精神障碍模型小鼠 3 >

[0260] 接着,将 SITH-1 的开放阅读框连结在 GFAP 启动子下,并利用慢病毒载体使其在小鼠的神经胶质细胞中进行表达,8 周后通过转轮活动(转轮旋转)测定自主活动量。将其结果示于图 12。

[0261] 如该图所示, SITH-1 获得表达的小鼠与作为对照的 EGFP (enhanced green fluorescence protein) 获得表达的小鼠相比,自主活动量受到抑制,显示变成抑郁状态的倾向。

[0262] 如图 11 与图 12 所示,可知相同的 SITH-1 表现出躁狂状态与抑郁状态这一相反的现象。认为其原因是存在以下的不同:1) 腺病毒载体中的 SITH-1 的表达量多于慢病毒载体;2) 由于慢病毒载体可以使 SITH-1 更长时间地获得表达,因此观察到 SITH-1 长时间表达的影响。

[0263] 这些通过 SITH-1 的表达可以制作躁狂状态与抑郁状态的模型小鼠的事实,与从抑郁症患者与抑郁症患者两者体内检测出针对 SITH-1 的抗体这一临床结果相符。

[0264] <7. 以 SITH-1 作为指标的诊断 >

[0265] 针对利用 SITH-1 的诊断也可用于并发抑郁症的其他疾病的诊断行了调查。将其结果示于图 13。

[0266] 如图 13 所示:利用抗 SITH-1 抗体的诊断对于抑郁症、躁郁症、慢性疲劳症候群之类的情绪障碍具有非常高的特异性,在迄今为止的研究中,意外地发现所述诊断对于克罗恩病患者也显示较高的阳性率。但对于类似疾病的溃疡性大肠炎未显示出阳性。

[0267] 但是,已知克罗恩病是“抑郁症状”的并发非常多的疾病,图 13 中的抗 SITH-1 抗体阳性者是克罗恩病本身是重症,且产生抑郁症状的并发的例子。此例子表示,在作为被分类为自身免疫性疾病的慢性疾病的克罗恩病患者中,即使是表现出抑郁症状的重症例,也可以进行利用 SITH-1 的“抑郁症”的诊断,可以认为利用抗 SITH-1 抗体的检查“也可用于由非精神科疾病的其他疾病所引起的抑郁症的诊断”。

[0268] [产业上的利用可能性]

[0269] 如上所述,本发明的基因以及蛋白质是参与疱疹病毒的潜伏感染的因子,通过以其作为指标,可以客观判定否患有精神障碍。因此,本发明不仅在学术、基础研究上有价值,在临床医学上也非常有意义。因此,在各方面具有产业上的可利用性。

序列表

<110> 株式会社威鲁斯医科学研究所 (Virus Ikagaku Kenkyusho Inc.)
日本烟草产业株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.)

<120> 参与疱疹病毒的潜伏感染的新因子及其利用

<130>SK0843

<140>PCT/JP2008/067300

<141>2008-09-25

<150>JP2007-250461

<151>2007-09-27

<160>10

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>159

<212>PRT

<213> 人疱疹病毒 6 (Human herpesvirus 6)

<400>1

```

Met Gly Tyr Glu Glu Lys Val Ser Ala Thr Gly Lys Thr Arg Leu Lys
1           5           10           15
Ile Leu Ala Cys Leu Ile Val Leu Ile Leu Ala Ala Ala Ile Thr Met
           20           25           30
Leu Thr Leu Glu Ile Ile Ser Asn Gln Lys Arg Thr Thr Thr Asp Leu
           35           40           45
Glu Ala Val Thr Val Ala Leu Lys His Val Ser Thr Ser Leu Ala Ser
           50           55           60
Cys Thr Glu Ser Thr Thr Ser Val His Thr Asp Ser Val Thr Ser Gln
65           70           75           80
Pro Thr Lys Asn Lys Glu Ser Arg Lys Lys Ile Glu Gly Lys Ser Pro
           85           90           95
Ser Trp Val Gln Ala Leu Thr Thr Ala Ser Gly Ile Ile Leu Leu Phe

```

	100		105		110
Cys	Ile Met Met Ile Phe Ile Thr	Cys Ser Trp	Thr Thr	Glu Lys Asp	
	115		120		125
Thr	Glu Lys Ser Glu Val Gln Ser Tyr Ala Ser	Ser Val	Glu Thr	Leu	
	130		135		140
Asp	Ser Leu Asn Glu Ala Ile Ile Pro Lys Thr	Glu Met	Asn Val		
	145		150		155

<210>2

<211>480

<212>DNA

<213> 人疱疹病毒 6

<400>2

```

atgggatatg aagaaaaagt gtcagctact ggaaagactc gtttaaagat actggcatgt      60
ctgatcgttt taatactagc tgcggcaata actatgttaa cgctggaaat tatatcgaac      120
caaaaacgta cactactga tctcgaagct gtgactgtgg cgctgaagca tgtaagcaca      180
tctcttgcca gctgcaactga atccactact tctgtacata ccgattctgt gacgagccaa      240
cccacgaaaa acaaagaatc gaggaaaaaa attgaaggga aatctccaag ttgggttcag      300
gctttaacta cagcatctgg aattatecta ctgttttgta taatgatgat attcattaca      360
tgttcctgga ccacagaaaa agatacagag aagagtgaag tgcaatctta tgcttctca      420
gtagagactt tagactcttt aaatgaggct attataccga aaactgaaat gaatgtgtaa      480

```

<210>3

<211>1795

<212>DNA

<213> 人疱疹病毒 6

<400>3

```

aggctctgct ggaggctctg ctggaggcct tgctgaaggc tctgctggag gccctgctgg      60
aggctctgct ggaggctctg ctggaggctc tgctggaggc tctgctggag gctctgctgg      120
aggctctgct ggaggctctg ctggaggctc tgcagagac ctcggtgaaa gtttactca      180
gaggtttate agagttttcg ccattagttt ggttagaagt ttcagattta tttcgggtgg      240
aactgcagtt aggtttcatg tcagtacatt catcaccgtt agaagtgcta ttcattggtgc      300
tgttgccact gttggatttg ttaaaagcag taaatgagct aggattggaa tgactccgaa      360
tagctaataa atttgagcat tttcttcgaa tggatcataa tcagagggat agccatctaa      420
tttaaagact tccattttat cactgttgca atcacttcta atggagtate tggatacatt      480
ttttctacat ctttttccate ccctccaaca tggatctgtg cagcgtaaat aagccagegg      540
agttaattaa atcgtcttcc atgtagaca gttcctgttt catggcagcc ttcactgatg      600
caccaatact ttggatgcaa gtgccaacgg actgagctag gatgtaaaaag aagatattct      660

```

aatdddgaat	tetccagatg	ctcettette	cacattactg	gaataggaca	cattcttga	720
agcgatgtcg	ttggaagact	ctgggatgaa	aagatcacag	gcttccagtt	ctggaaaaag	780
caggctttca	aaggacacat	cacacttgag	actctettcc	aatatttctt	tgatggattc	840
ttccaccact	ggatcgggat	ggtagctata	tatactatat	aaggagatta	ccaccaccac	900
ctctttcttt	gcagagatta	ttctctgctt	gaaaatctgt	aacactgac	atgatgggat	960
atgaagaaaa	agtgtcagct	actggaaaga	ctcgtttaa	gatactggca	tgtctgatcg	1020
ttttaatact	agctgcggca	ataactatgt	taacgctgga	aattatatcg	aacccaaaac	1080
gtaccactac	tgatctcgaa	gctgtgactg	tggcctgaa	gcatgtaagc	acatctcttg	1140
ccagctgcac	tgaatccact	acttctgtac	ataccgattc	tgtgacgagc	caaccacga	1200
aaaacaaaga	atcgaggaaa	aaaattgaag	ggaaatctcc	aagttgggtt	caggctttaa	1260
ctacagcatc	tggaattatc	ctactgtttt	gtataatgat	gatattcatt	acatgtccct	1320
ggaccacaga	aaaagataca	gagaagagtg	aagtgcaatc	ttatgctcct	tcagtagaga	1380
ctttagacc	tttaaatgag	gctattatac	cgaaaactga	aatgaatgtg	taatgtctgt	1440
attdttcttt	acagagatgt	acggagagtt	tatatttggg	gaaaatacct	gactgttctg	1500
cctatatgcg	aatgttaaag	tatgtataat	ataaattctt	accttttaag	agtgattcaa	1560
ggtggaggtt	tctttggaga	ttgattccag	gtggtggttt	cgggtgcaat	caatctttct	1620
tctgggcggg	aagaaaatcc	agcaatccaa	taattgatgg	gatgtaatca	atgtcacaaa	1680
tctgtaagat	taaattgtgaa	cagtataaat	tctttcgtgc	ttatcaaatt	acaattatgc	1740
gcatgaaaat	atcattaat	tgtdtttaac	attcttaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaa	1795

<210>4

<211>25

<212>DNA

<213> 引物

<400>4

gatgctcctt cttccacatt actgg

25

<210>5

<211>26

<212>DNA

<213> 引物

<400>5

catcccatca attattggat tgctgg

26

<210>6

<211>26

<212>DNA

<213> 引物

<400>6

gaaaccacca cctggaatca atctcc

26

<210>7

<211>24

<212>DNA

<213> 引物

<400>7

gacacattct tggaagcgat gtcg

24

<210>8

<211>25

<212>DNA

<213> 引物

<400>8

gctgggtagt ccccaccttt ctaga

25

<210>9

<211>26

<212>DNA

<213> 引物

<400>9

ctgaagcatg taagcacatc tcttgc

26

<210>10

<211>23

<212>DNA

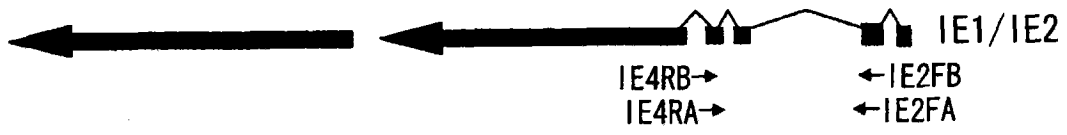
<213> 引物

<400>10

gcttcgagatcagtagtggt acg

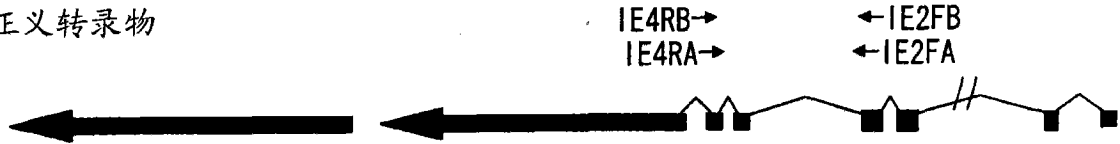
23

增殖感染时的 mRNA



潜伏感染时的 mRNA

正义转录物



反义转录物

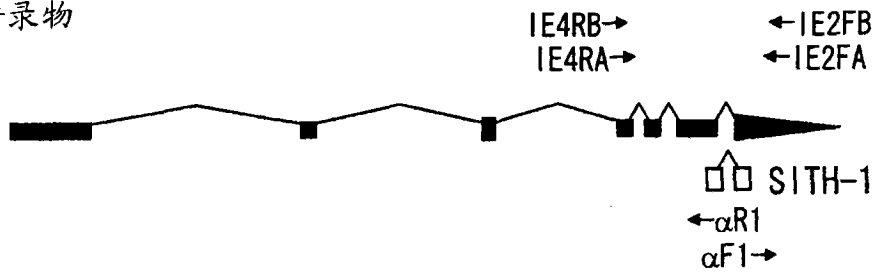


图 1

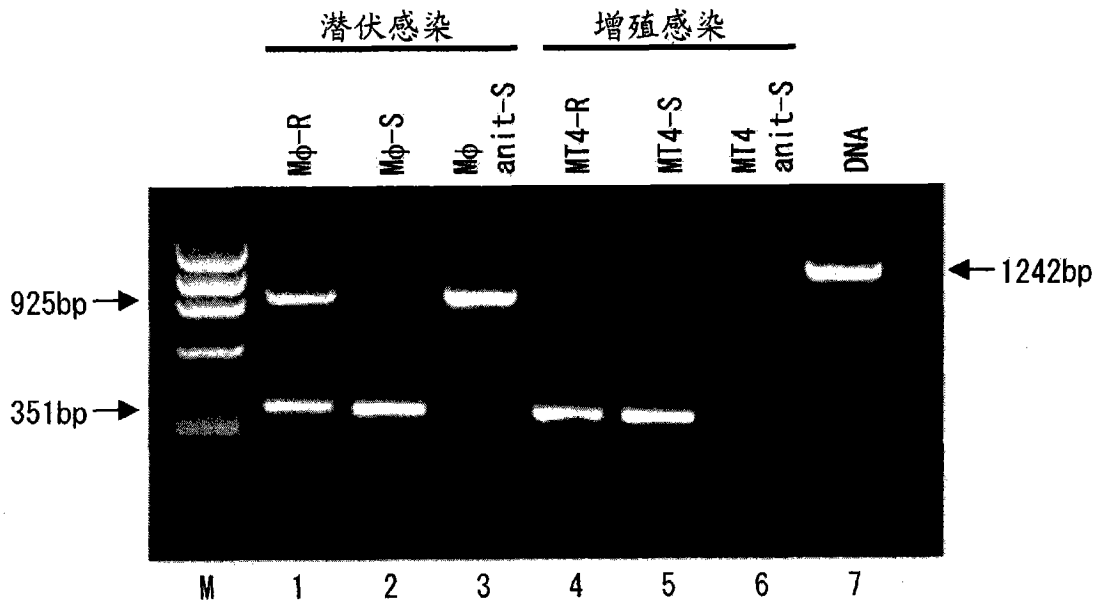


图 2

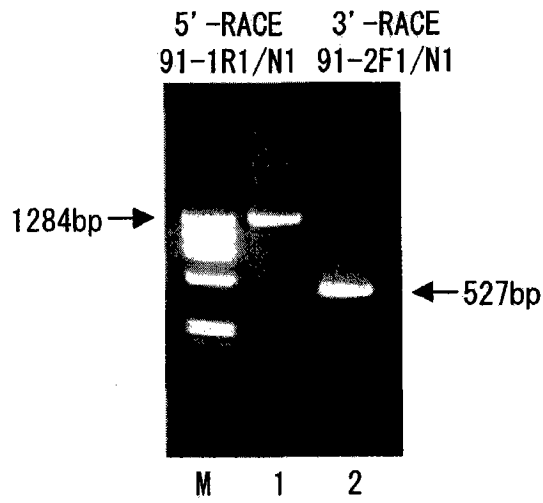


图 3

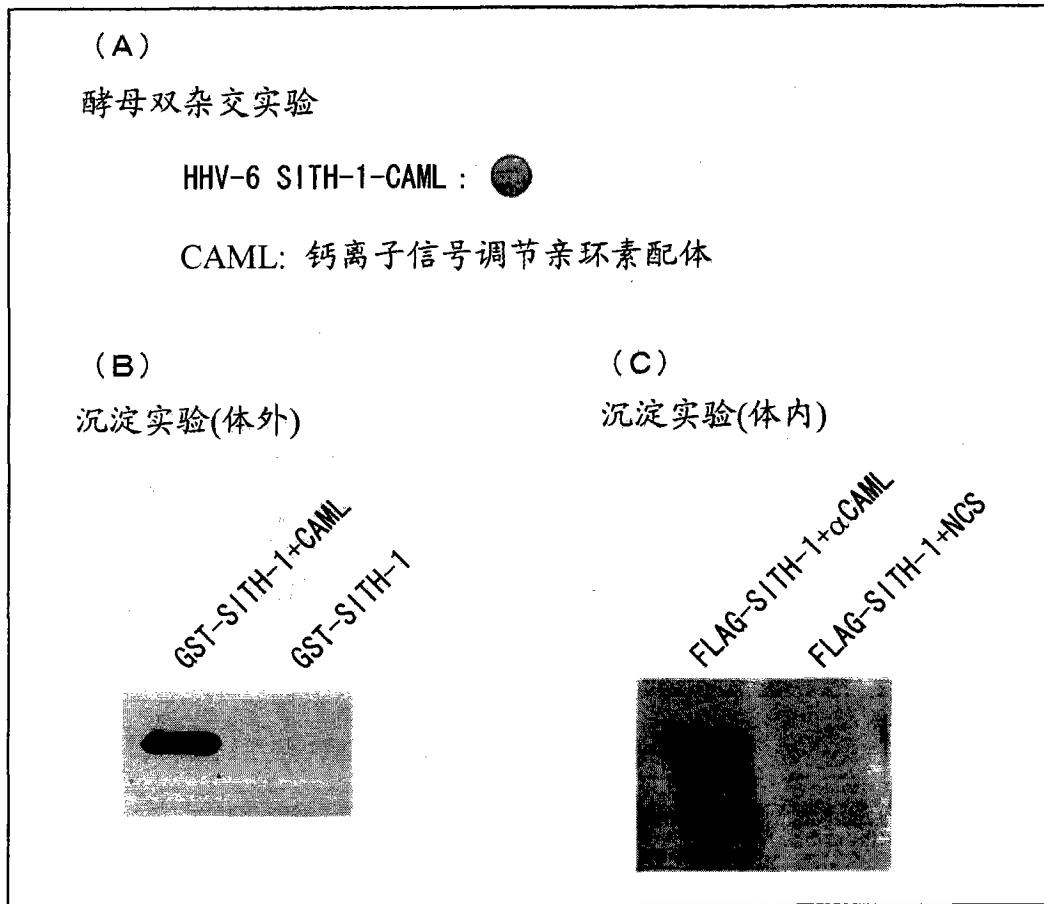


图 4

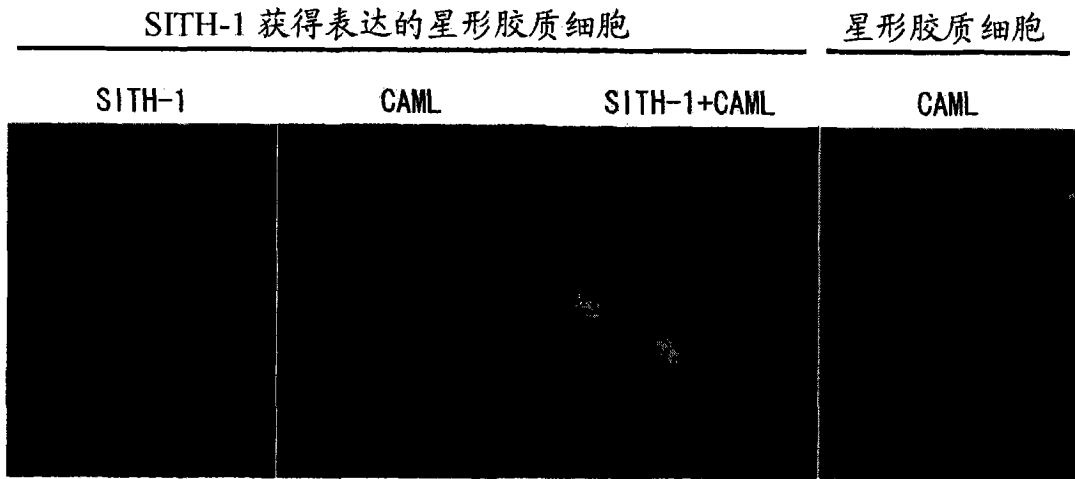


图 5

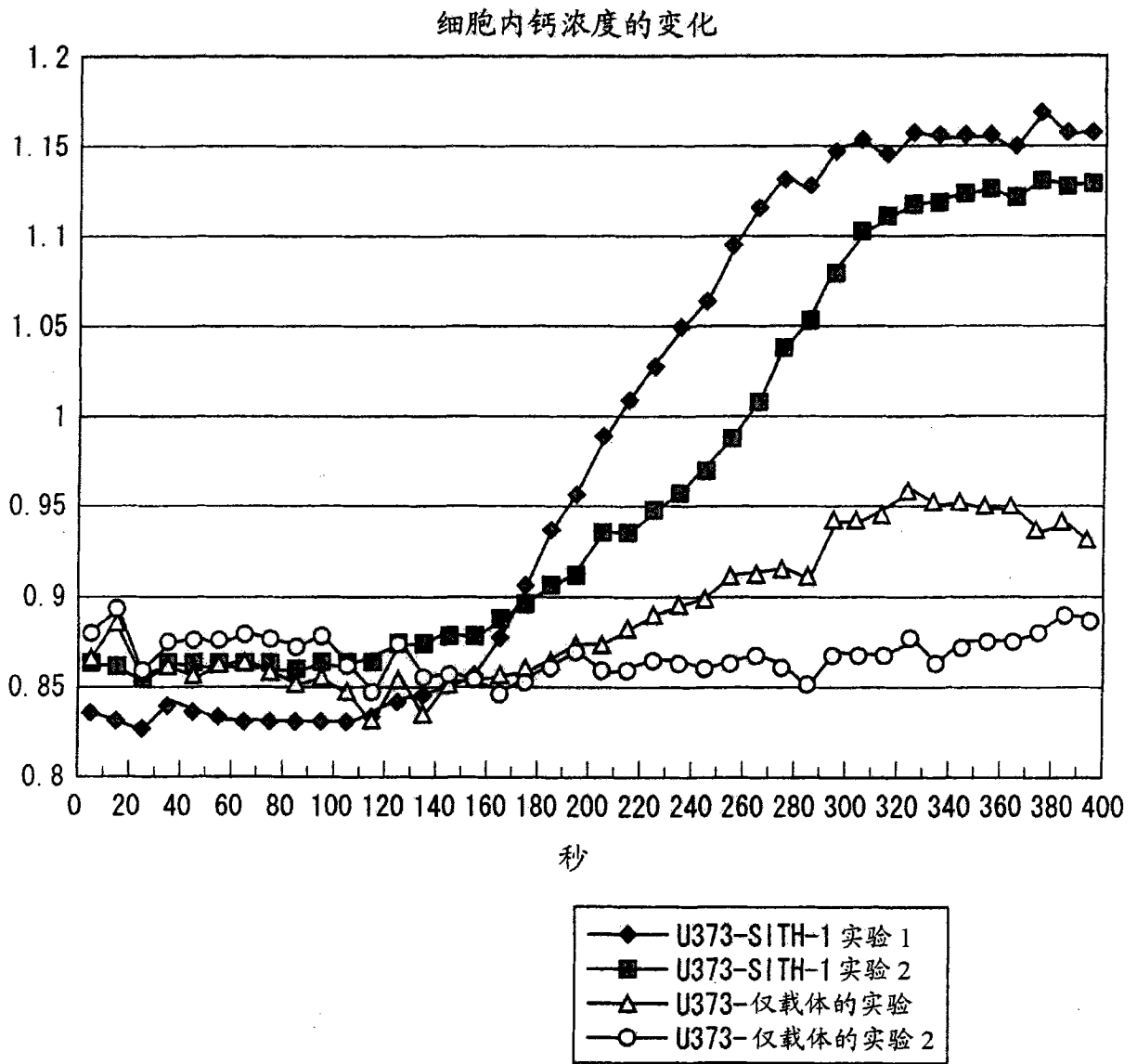


图 6

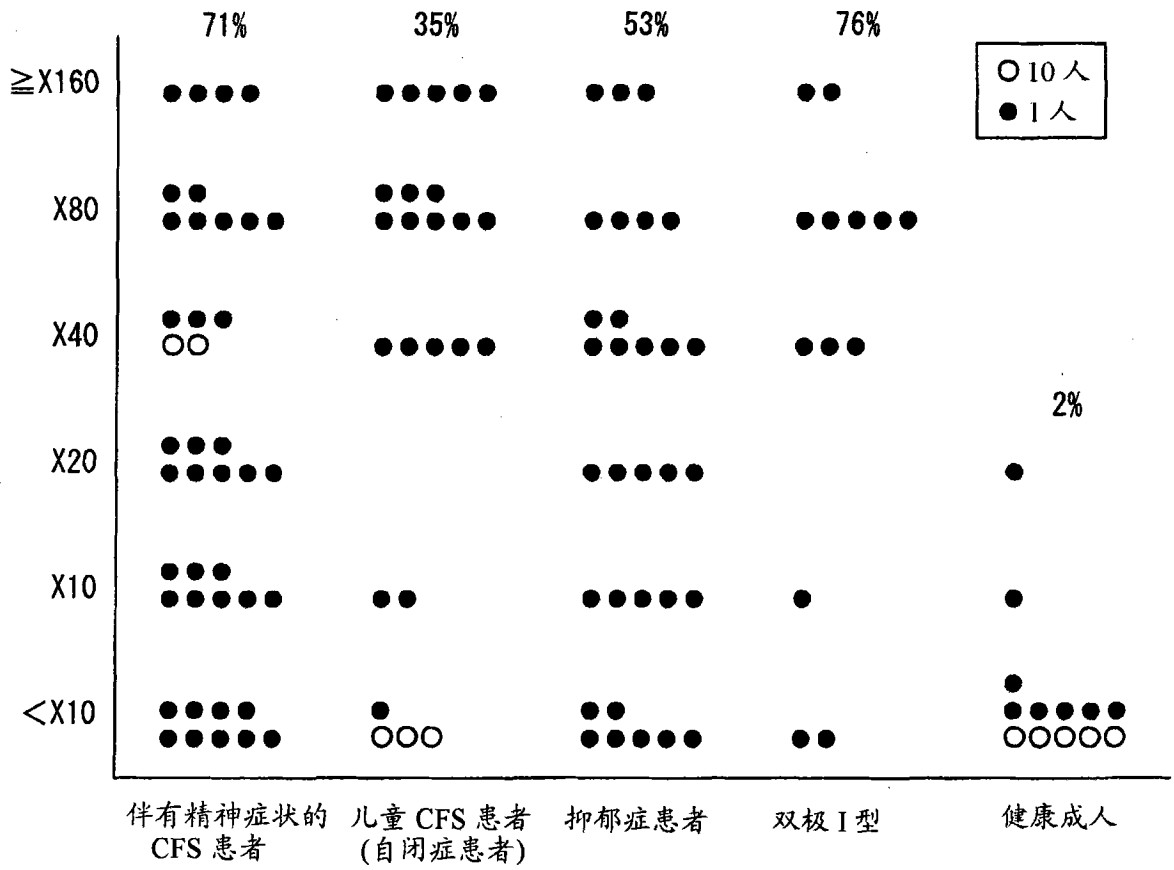


图 7

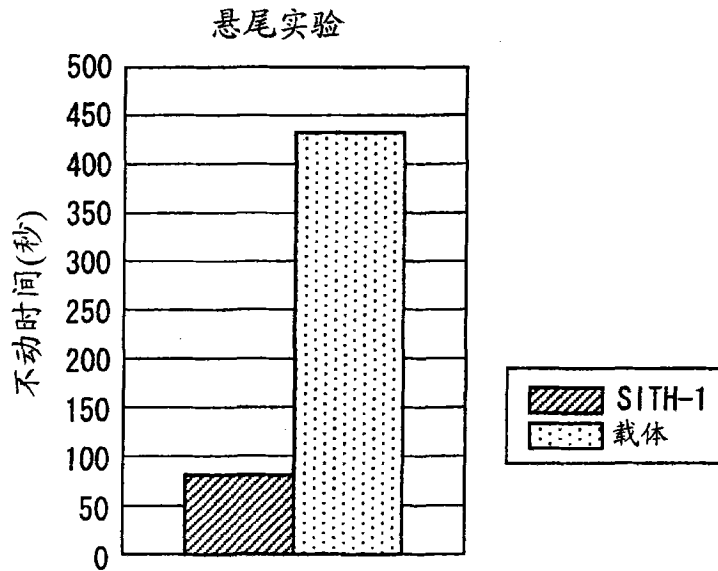


图 8

强迫游泳实验 不动时间

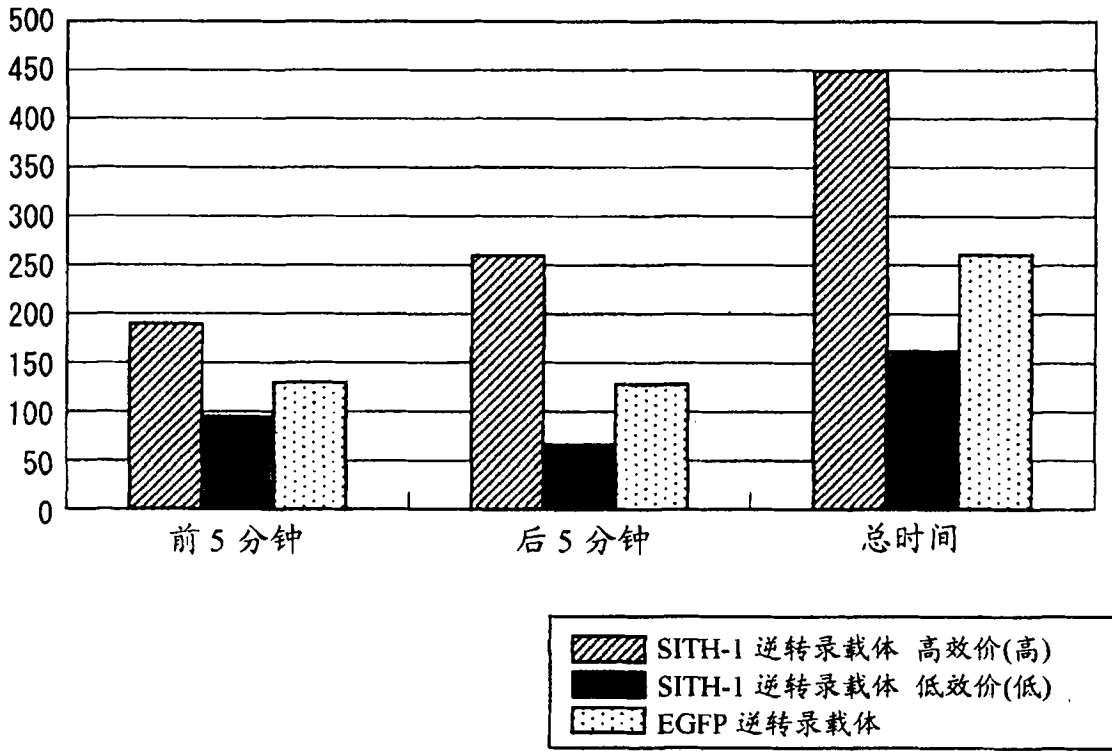


图 9

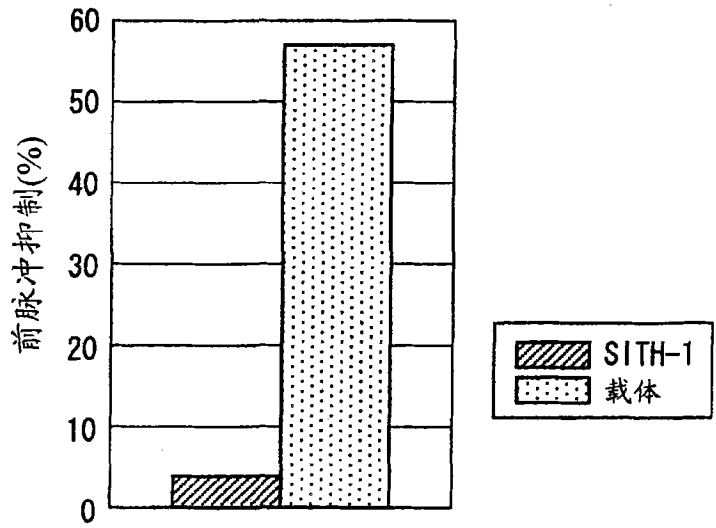


图 10

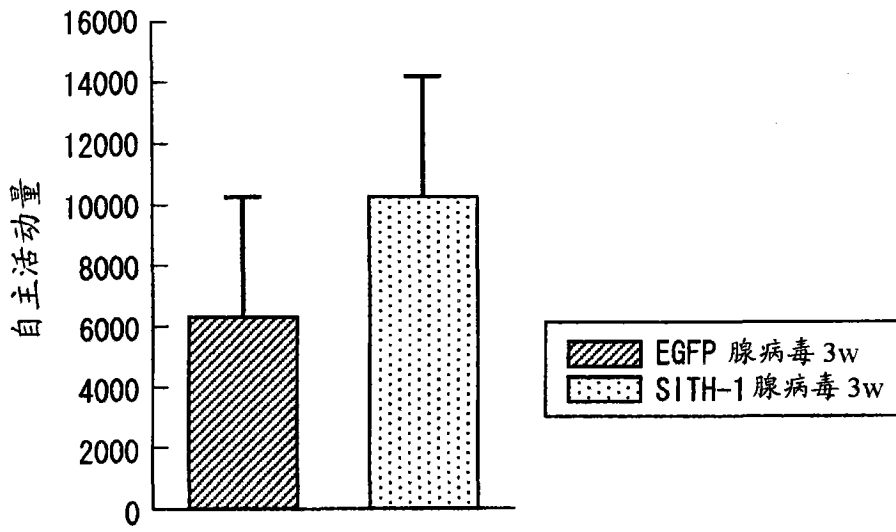


图 11

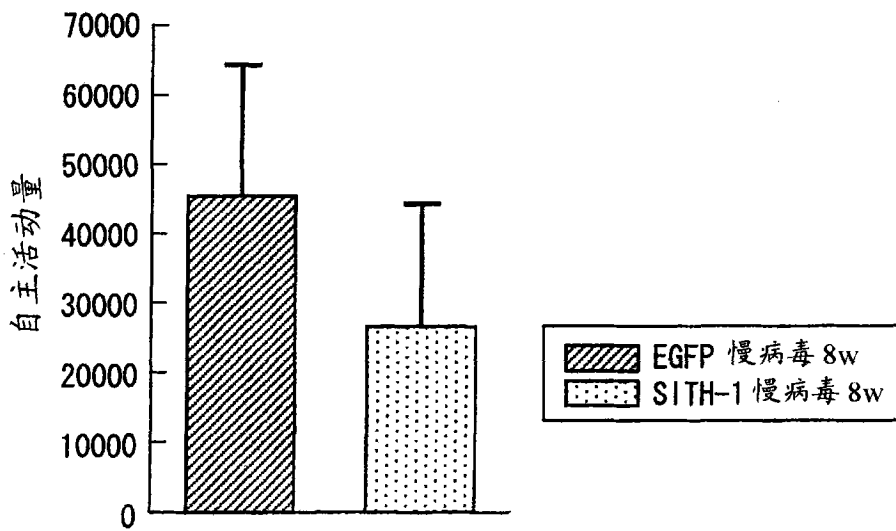


图 12

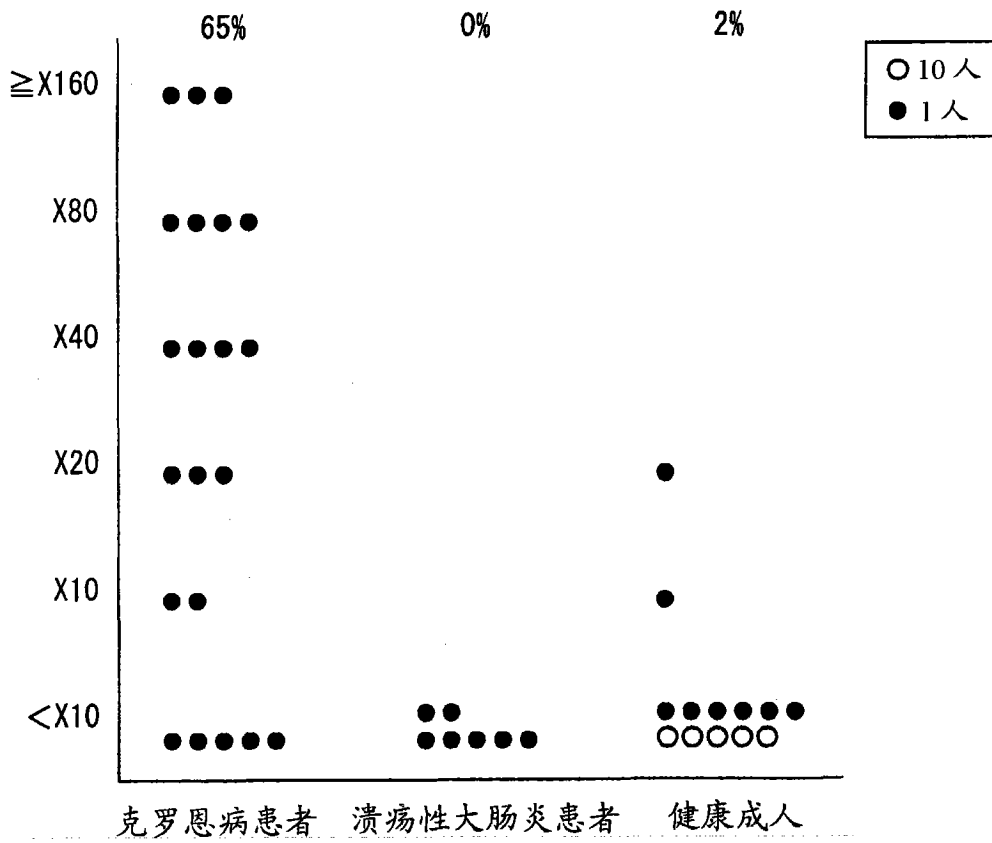


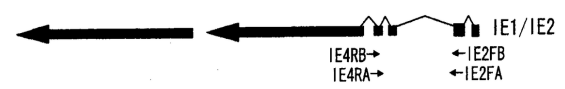
图 13

专利名称(译)	参与疱疹病毒的潜伏感染的因子及其利用		
公开(公告)号	CN101809153B	公开(公告)日	2014-01-01
申请号	CN200880108759.4	申请日	2008-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	日本烟草产业株式会社		
申请(专利权)人(译)	日本烟草产业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日本烟草产业株式会社		
[标]发明人	近藤一博 小林伸行		
发明人	近藤一博 小林伸行		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 C07K14/03 C07K16/08 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 C12Q1/68		
CPC分类号	A01K2267/0356 C12N2740/10043 C12N2710/16522 G01N33/6854 G01N2333/035 C12N2710/10343 G01N33/6893 C07K14/005 C12N7/00 G01N2800/304 C12N2710/16571 G01N33/6896 C07K14/03 C12N5/10 C12N15/11 C12N15/63 C12N15/79		
优先权	2007250461 2007-09-27 JP		
其他公开文献	CN101809153A		
外部链接	Espacenet SIPO		

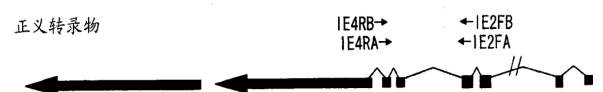
摘要(译)

本发明的蛋白质以及基因是参与疱疹病毒的潜伏感染的因子。在约50%的精神障碍患者体内检测出针对此因子的抗体，而在健康者体内几乎未检测出此种抗体。另外，导入有SITH-1的小鼠表现出躁郁症或抑郁症样的精神障碍。因此，基于所述事实，可以提供一种能够客观地判定精神障碍的方法以及精神障碍模型动物。

增殖感染时的 mRNA



潜伏感染时的 mRNA



反义转录物

