

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 233383

(P2002 - 233383A)

(43)公開日 平成14年8月20日(2002.8.20)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00		45/00	4 B 0 5 0
45/00		A 6 1 M 1/34	500 4 B 0 6 3
A 6 1 M 1/34	500	1/36	545 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 50 O L (全 22数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 34217(P2001 - 34217)

(22)出願日 平成13年2月9日(2001.2.9)

(71)出願人 301050902

株式会社ロコモジェン

東京都渋谷区渋谷三丁目29番22号

(72)発明者 中 島 利 博

神奈川県横浜市都筑区中川1丁目2 - 5 港北

ガーデンヒルズA棟503号

(74)代理人 100081994

弁理士 鈴木 俊一郎 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ニューロトニンおよびその利用

(57)【要約】

【課題】 Isaacs症候群の過興奮性の病因となる物質を特定し、有効な診断治療法を確立すること。

【解決手段】 Isaacs症候群患者からの血清を利用するイムノスクリーニング手法により、神経細胞由来の c D N Aライブラリーから特定の c D N Aを分離した。そのヌクレオチド配列を解明するとともに、これに基づくクローニングにより新規タンパク質、ニューロトニンを得てそのアミノ酸配列構造を決定した。新規な本タンパク質は、Isaacs症候群のキー物質と目され、末梢神経障害の研究、臨床応用に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の性状を有する末梢神経細胞タンパク質（以下「ニューロトニン」という）。

- a) Isaacs患者、またはそれ以外の末梢神経障害患者の末梢神経細胞に見出され、
- b) 前記患者の血液に見出される抗体と反応し、
- c) ウサギに免疫するとIsaacs症候群様の症状を引き起こし、かつ
- d) SDS-PAGEにより求めた分子量約66kDaを持つ

【請求項2】ニューロトニンをコードするcDNA。

【請求項3】ニューロトニンをコードするか、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列の全てのヌクレオチド配列を含むDNA。

【請求項4】ニューロトニンをコードするか、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列の全てまたは一部に実質的に対応する1つ以上のヌクレオチド配列を含むか、あるいは前記配列のいずれかと実質的に相同性であるかもしくは前記配列のいずれかとハイブリダイズする配列を含む核酸分子。

【請求項5】マウスニューロトニンをコードするマウスcDNA。

【請求項6】マウスニューロトニンをコードするか、あるいは図3または4に示すヌクレオチド配列の全てのヌクレオチド配列を含むDNA。

【請求項7】マウスニューロトニンをコードするか、あるいは図3または4に示すヌクレオチド配列の全てまたは一部に実質的に対応する1つ以上のヌクレオチド配列を含むか、または前記配列のいずれかと実質的に相同性であるかもしくは前記配列のいずれかとハイブリダイズするマウスニューロトニンをコードする配列を含む核酸分子。

【請求項8】請求項2または5に記載のcDNA、あるいは請求項3、4、6または7のいずれかに記載の核酸分子に対するアンチセンスRNAまたはアンチセンスDNA。

【請求項9】請求項2または5に記載のcDNA、または請求項3、4、6もしくは7のいずれかに記載の核酸分子、あるいはそれらの一部から転写されたRNAを認識し切断するリボザイム。

【請求項10】請求項2～8の何れかに記載の核酸分子を含む発現ベクター、クローニングベクターまたはコスミド。

【請求項11】請求項10のベクターまたはコスミドを保持する形質転換体。

【請求項12】請求項2～8の何れかに記載の核酸分子を含有する原核細胞、真核細胞または突然変異生物細胞。

【請求項13】図5または6に示すアミノ酸配列を有するニューロトニン。

【請求項14】上記患者の血液に見出される抗体と結合する活性を有する下記a)またはb)に記載のタンパク質。

a) 図5または6に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、図5または6に示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、あるいは機能的に等価なこれらの変異体、あるいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチド

b) 請求項2～4の何れかに記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質

【請求項15】末梢神経細胞にある「14-3-3」タンパク質と結合でき、下記a)またはb)に記載のタンパク質。

a) 図5または6に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、図5または6に示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、あるいは機能的に等価なこれらの変異体、あるいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチド

b) 請求項2～4の何れかに記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質

【請求項16】請求項13から15の何れかに記載のタンパク質の免疫学的に活性なドメインまたはそのドメインを有する断片。

【請求項17】図7または8に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、図7または8に示されるアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、または機能的に等価なこれらの変異体、あるいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチド。

【請求項18】請求項13～17の何れかに記載のタンパク質を含む、請求項13～17の何れかに記載のタンパク質を認識する抗体を分析するための免疫学的分析用試薬。

【請求項19】Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の診断または治療効果の判定を目的とするものである請求項18に記載の免疫学的分析用試薬。

【請求項20】請求項13～17の何れかに記載のタンパク質と反応する抗体を含む、請求項13～17の何れかに記載のタンパク質を分析するための免疫学的分析用試薬。

【請求項21】Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の診断または治療効果の判定を目的とするものである請求項20に記載の免疫学的分析用試薬。

【請求項22】分析すべき請求項13～17の何れかに記載のタンパク質が、末梢神経細胞に存在するものである請求項21の免疫学的分析用試薬。

【請求項23】被験者の体液中に存在する抗体であって、

請求項13～17の何れかに記載のタンパク質と反応する抗体を分析することによるニューロトニンの検出方法。

【請求項24】次の工程を含む、請求項13～17の何れかに記載のタンパク質と結合するリガンドのスクリーニング方法。

- a) リガンドの候補化合物を請求項13～17の何れかに記載のタンパク質と接触させる工程、および
- b) 前記タンパク質に対する結合活性を示す候補化合物を選択する工程

【請求項25】請求項13～17の何れかに記載のタンパク質をアンチリガンドとして用い、請求項24の方法によって得ることができるリガンドを両者の親和性に基づいて該タンパク質を測定する方法。

【請求項26】次の工程を含む、請求項13～17の何れかに記載のタンパク質と上記リガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法。

- a) 候補化合物の存在下で、請求項13～17の何れかに記載のタンパク質と上記リガンドとを接触させる工程、および
- b) 前記タンパク質と上記リガンドとの結合を阻害する活性を示す候補化合物を選択する工程

【請求項27】請求項26のスクリーニング方法によって得ることができる化合物。

【請求項28】請求項26のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を含む、ニューロトニン阻害剤。

【請求項29】請求項26のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を含む、末梢神経障害の治療用薬剤。

【請求項30】請求項13～17の何れかに記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項31】前記抗体がモノクローナル抗体である請求項30に記載の抗体。

【請求項32】末梢神経障害の原因となる抗体に対するモノクローナル抗体。

【請求項33】請求項13～17の何れかに記載のタンパク質または該タンパク質をコードする遺伝子の発現を指標に、該タンパク質を発現する細胞を検出または分離する方法。

【請求項34】細胞が末梢神経細胞である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】請求項30～32の何れかに記載の抗体を含む、請求項13～17の何れかに記載のタンパク質を発現する細胞の検出または分離用試薬。

【請求項36】請求項2～7のDNAもしくはその一部、またはそれらから転写されたRNAとハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する核酸分子を含み、これらのDNAまたはRNAを検出するための試薬。

【請求項37】請求項3または6に記載のDNAの発現が改変されているかまたは該改変を誘導することができるトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項38】末梢神経障害モデル動物である、請求項37に記載の動物。

【請求項39】請求項37に記載の非ヒト脊椎動物であって、内因性に有する請求項3または6に記載のDNAの発現が抑制されているノックアウト非ヒト脊椎動物。

【請求項40】他の遺伝子がノックアウトされている請求項37に記載の非ヒト脊椎動物。

【請求項41】請求項37～40の何れかに記載の非ヒト脊椎動物から由来する細胞。

【請求項42】請求項3または6に記載のDNAの内因性プロモーターの活性を上昇または低下させる化合物のスクリーニング方法であって、

- a) 被検化合物の存在下、請求項3または6に記載のDNAの内因性プロモーターの下流に結合されている遺伝子の発現を検出する工程、および
- b) 該発現を上昇または低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項43】請求項3または6に記載のDNAの内因性プロモーターの活性を上昇または低下させる化合物のスクリーニング方法であって、

- a) 請求項37～40に記載の非ヒト脊椎動物または該動物に由来する細胞に被検化合物を適用する工程、および
- b) ノックインされた遺伝子の発現を上昇または低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項44】Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の研究のために、およびIsaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の改善作用を有する物質のスクリーニングのために使用する、ニューロトニンで免疫された動物。

【請求項45】VGKC機能の抑制、神経終末におけるシグナル伝達不全、または有痛性筋痙攣を改善するタンパク質または非タンパク性物質をスクリーニングするための、ニューロトニンで免疫されたウサギ。

【請求項46】ニューロトニンもしくはその関連タンパク質またはそれ以外の末梢神経障害の原因となる抗体をマーカーとして、上記モノクローナル抗体との特異的結合を検出することで、被検者からの試料検体中のニューロトニンもしくはその関連タンパク質または末梢神経障害の原因となる抗体のレベルを測定することによりIsaacs症候群、またはそれ以外の末梢神経障害を診断するための診断マーカー。

【請求項47】Isaacs症候群あるいはそれ以外の末梢神経障害を診断するためのデータを供する検査方法であり、被検者からの試料検体中のニューロトニンまたは末梢神経障害の原因となる抗体レベルを測定することを特徴とする検査方法。

【請求項48】血液の透析濾過により血中のニューロトニン抗体または末梢神経障害の原因となる抗体を、濾過材に固定化した上記モノクローナル抗体に結合させることにより体内のニューロトニン抗体または末梢神経障害の

原因となる抗体を低減せしめることを可能とする、ニューロトニンまたは末梢神経障害の原因となる抗体の存在に起因するしびれを解除して治療するための血液濾過材。

【請求項49】製剤上許容される担体と一緒に、請求項13～17の何れかに記載の少なくとも1つのポリペプチドを含み該ポリペプチドの免疫応答を、あるいは細胞中に挿入された請求項2～8の何れかに記載の核酸分子を有するウィルス細胞または宿主細胞を含み、挿入された核酸分子によりコードされるポリペプチドの免疫応答を刺激するための、ヒトまたはヒト以外の動物におけるIsaacs症候群あるいはそれ以外の末梢神経障害にたいする免疫応答を刺激するワクチン組成物。

【請求項50】末梢神経障害患者から分離された末梢神経・筋系の細胞とインキュベートすることにより、特異的に請求項31または32に記載のモノクローナル抗体と結合させて、末梢神経障害の原因となる抗体を排除し、末梢神経となる細胞をインビトロで再生するための該抗体を含む細胞培養用媒体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】本発明は、ニューロトニンおよびその利用に関する。詳しくは、ニューロトニン、ニューロトニンをコードするcDNA、核酸分子、ニューロトニンに対するモノクローナル抗体など、およびそれらの利用に関する。

【0002】

【発明の技術的背景】末梢神経障害は、運動神経筋接合部終末において神経の興奮伝達の欠陥に由来し筋疾患を伴うことが多いために、感覚異常、運動障害、自律神経障害など様々の病態が知られている。その病因も多様であり、詳しくは不明な場合も多い。それらのうち、末梢神経のVGKC (Voltage gated potassium channel) 異常、神経末端からの持続的なアセチルコリンの放出を伴う神経・筋疾患として、Isaacs症候群が知られ、これは持続性筋線維活動症候群ともいわれている。その臨床的特徴として、四肢の筋硬直、有痛性筋痙攣、手指の開排制限などの筋収縮後の弛緩困難、歩行障害、発汗過多などの症状が観察されている。発症の機作は不明であるが、胸腺腫との合併の存在、血中に免疫複合体を有する症例が見られることから、自己免疫疾患機序の存在も想定されている。

【0003】このようなIsaacs症候群を始めとする末梢神経障害の治療方法として、今のところ選択的かつ有効な方法がないのが実情であり、血漿交換による方法、ビタミンB₁₂投与などの対症的な治療法に留まる。本格的な高齢化社会の到来を間近に控えて、上記末梢神経障害に加えて、糖尿病の合併症である末梢性多発性神経炎、筋の全般的な有痛性痺れなどにも有効に治療できる方法が待たれている。

【0004】本発明者は、Isaacs症候群患者から単離されたcDNAが、ある特定のタンパク質をコードして、そのタンパク質が患者の血中に増加している事実を捉えた。そこで、鋭意研究を進めた結果、上記cDNAおよびそのタンパク質を同定して、本病態に関わる因子であることを突き止めるとともに、それらの配列構造を決定し、これらの核酸分子とタンパク質を利用した診断治療に係る本発明を完成した。本発明に係るDNA分子およびタンパク質は、末梢神経障害に関する基礎研究ならびに臨床応用に資するさまざまな物質および方法を提供する。

【0005】

【発明の目的】本発明は、ニューロトニン、ニューロトニンをコードするcDNAの構造と機能に基づき、核酸分子、ニューロトニンに対するモノクローナル抗体、これらを利用して、関連する臨床検査薬、治療薬、新規なベクター、抗ニューロトニン抗体を結合する血液濾過材、培養媒体、トランスジェニック動物、スクリーニング用動物などを提供することを目的とする。

20 【0006】

【発明の概要】本発明に係るタンパク質は、下記の性状を有する末梢神経細胞タンパク質（以下「ニューロトニン」という）である。

- a) Isaacs患者、またはそれ以外の末梢神経障害患者の末梢神経細胞に見出され、
- b) 前記患者の血液中に見出される抗体と反応し、
- c) ウサギに免疫するとIsaacs症候群様の症状を引き起こし、かつ
- d) SDS-PAGEにより求めた分子量約66kDaを持つ

30 本発明に係るcDNAは、ニューロトニンをコードするcDNAである。

【0007】さらに本発明に係るDNAは、ニューロトニンをコードするか、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列の全てのヌクレオチド配列を含むDNAである。ニューロトニンをコードするか、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列の全てまたは一部に実質的に対応する1つ以上のヌクレオチド配列を含むか、あるいは前記配列のいずれかと実質的に相同性であるかもしくは前記配列のいずれかとハイブリダイズする配列を含む核酸分子も本発明に含まれる。

40 【0008】本発明に係るDNAには、マウスニューロトニンをコードするか、あるいは図3または4に示すヌクレオチド配列の全てのヌクレオチド配列を含むDNAも包含される。また、マウスニューロトニンをコードするマウスcDNAも本発明に属する。さらに、マウスニューロトニンをコードするか、あるいは図3または4に示すヌクレオチド配列の全てまたは一部に実質的に対応する1つ以上のヌクレオチド配列を含むか、または前記配列のいずれかと実質的に相同性であるかもしくは前記配列のいずれかとハイブリダイズするマウスニューロト

ニンをコードする配列を含む核酸分子も本発明に含まれる。

【0009】さらに上記cDNAまたは上記核酸分子の何れかに対するアンチセンスRNAもしくはアンチセンスDNA、上記のcDNAまたは上記核酸分子、またはそれらの一部から転写されたRNAを認識し切断するリボザイムも本発明に含まれる。本発明に係る発現ベクター、クローニングベクターまたはコスミドは、上記cDNA、または上記核酸分子の何れかを含む。

【0010】本発明に係る形質転換体は、上記ベクターまたはコスミドを保持する形質転換体である。本発明に係る原核細胞、真核細胞または突然変異生物細胞は、上記核酸分子の何れかを含有する。本発明に係るニューロトニンは、図5または6に示すアミノ酸配列を有する。

【0011】本発明に係るタンパク質は、上記患者の血液に見出される抗体と結合する活性を有し、下記a)またはb)の特徴を有するタンパク質である。

a) 図5または6に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、図5または6に示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、あるいは機能的に等価なこれらの変異体、あるいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチド

b) 図1～4の何れかに記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質 また本発明に係るタンパク質は、末梢神経細胞にある「14-3-3」タンパク質と結合でき、下記a)またはb)の特徴を有するタンパク質である。

a) 図5または6に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、図5または6に示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、あるいは機能的に等価なこれらの変異体、あるいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチド

b) 図1～4の何れかに記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質 さらに本発明は、上記タンパク質の免疫学的に活性なドメインまたはそのドメインを有する断片を含むものである。

【0012】本発明に係るポリペプチドは、図7または8に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、図7または8に示されるアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、または機能的に等価なこれらの変異体、あ

るいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチドも包含する。

【0013】本発明に係る免疫学的分析用試薬は、上記のタンパク質の何れかを含む、当該タンパク質を認識する抗体を分析するための分析用試薬でもある。また、上記免疫学的分析用試薬は、Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の診断または治療効果の判定を目的とするものである。本発明に係る免疫学的分析用試薬は、上記のタンパク質の何れかと反応する抗体を含む、当該タンパク質を分析するための免疫学的分析用試薬である。

【0014】また、上記免疫学的分析用試薬は、Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の診断または治療効果の判定を目的とするものでもある。さらに、上記免疫学的分析用試薬は、その分析すべき上記タンパク質の何れかが末梢神経細胞に存在するものである。本発明のニューロトニンの検出方法は、被験者の体液中に存在する抗体であって、上記タンパク質の何れかと反応する抗体を分析することによる。

【0015】本発明による上記タンパク質と結合するリガンドのスクリーニング方法は、次の工程を含む。

a) リガンドの候補化合物を上記のタンパク質と接触させる工程、および

b) 前記タンパク質に対する結合活性を示す候補化合物を選択する工程

本発明による測定方法は、上記スクリーニング方法によって得ることができるリガンドを、上記タンパク質の何れかをアンチリガンドとして用い、両者の親和性に基づいて該タンパク質を測定する方法である。

【0016】本発明によるスクリーニング方法には、上記タンパク質の何れかと上記リガンドとの結合を阻害する化合物をスクリーニングする方法も含まれ、これは次の工程を有する。

a) 候補化合物の存在下で、上記のタンパク質と上記リガンドとを接触させる工程、および

b) 前記タンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を示す候補化合物を選択する工程

本発明に係る化合物は、上記スクリーニング方法によって得ることができる化合物も含む。

【0017】本発明に係るニューロトニン阻害剤は、上記スクリーニング方法によって得ることができる化合物を含む。本発明に係る末梢神経障害の治療用薬剤は、上記スクリーニング方法によって得ることができる化合物を含む。本発明に係る抗体は、上記タンパク質の何れかに結合する抗体である。

【0018】前記抗体には、モノクローナル抗体が含まれる。当該モノクローナル抗体には末梢神経障害の原因となる抗体に対するモノクローナル抗体が含まれる。本発明による方法には上記タンパク質の何れかまたは該タンパク質をコードする遺伝子の発現を指標に、該タンパク質を発現する細胞を検出または分離する方法が含まれ

る。この方法は細胞が末梢神経細胞である場合を含む。

【0019】本発明に係る上記タンパク質の何れかを発現する細胞の検出または分離用試薬は、上記抗体を含む。本発明に係る試薬には、上記DNAまたはその一部、あるいはそれらから転写されたRNAとハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する核酸分子を含み、これらのDNAまたはRNAを検出するための試薬が含まれる。

【0020】本発明に係るトランスジェニック非ヒト脊椎動物は、上記DNAの発現が改変されているかまたは該改変を誘導することができるトランスジェニック非ヒト脊椎動物である。上記動物は、末梢神経障害モデル動物でもある。本発明に係るノックアウト非ヒト脊椎動物は、上記非ヒト脊椎動物であって、内因性に有する上記DNAの発現が抑制されているノックアウト非ヒト脊椎動物である。

【0021】上記ノックアウト非ヒト脊椎動物には、他の遺伝子がノックアウトされている非ヒト脊椎動物も含まれる。本発明に係る細胞には、上記非ヒト脊椎動物の何れから由来する細胞が含まれる。本発明に係るスクリーニング方法には、図1～4に記載のDNAの内因性プロモーターの活性を上昇または低下させる化合物のスクリーニング方法も含まれ、これは、

a)被検化合物の存在下、図1～4に記載のDNAの内因性プロモーターの下流に結合されている遺伝子の発現を検出する工程、および

b)該発現を上昇または低下させる化合物を選択する工程、

を含む方法である。

【0022】また、上記スクリーニング方法は、図1～4に記載のDNAの内因性プロモーターの活性を上昇または低下させる化合物のスクリーニング方法であって、

a)上記の非ヒト脊椎動物または該動物に由来する細胞に、被検化合物を適用する工程、および

b)ノックインされた遺伝子の発現を上昇または低下させる化合物を選択する工程、

を含む方法でもある。

【0023】本発明に係るニューロトニンで免疫された動物とは、Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の研究のために、およびIsaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害の改善作用を有する物質のスクリーニングのために使用する、ニューロトニンで免疫された動物である。本発明に係るウサギとは、VGKC機能の抑制、神経終末におけるシグナル伝達不全、または有痛性筋痙攣を改善するタンパク質または非タンパク性物質をスクリーニングするためのニューロトニンで免疫されたウサギである。

【0024】本発明に係る診断マーカーは、ニューロトニンもしくはその関連タンパク質またはそれ以外の末梢神経障害の原因となる抗体をマーカーとして、上記モノ

クローナル抗体との特異的結合を検出することで、被検者からの試料検体中のニューロトニンもしくはその関連タンパク質抗体または末梢神経障害の原因となる抗体のレベルを測定することによりIsaacs症候群、またはそれ以外の末梢神経障害を診断するための診断マーカーである。

【0025】本発明による検査方法とは、Isaacs症候群あるいはそれ以外の末梢神経障害を診断するためのデータを供する検査方法であり、被検者からの試料検体中のニューロトニンまたは末梢神経障害の原因となる抗体レベルを測定することを特徴とする検査方法である。本発明に係る血液濾過剤とは、血液の透析濾過により血中のニューロトニン抗体または末梢神経障害の原因となる抗体を、濾過材に固定化した上記モノクローナル抗体に結合させることにより体内のニューロトニン抗体または末梢神経障害の原因となる抗体を低減せしめることを可能とする、ニューロトニンまたは末梢神経障害の原因となる抗体の存在に起因するしびれを解除して治療するための血液濾過材である。

【0026】本発明に係るワクチン組成物とは、製剤上許容される担体と一緒に、上記の少なくとも1つのポリペプチドを含み該ポリペプチドの免疫応答を、あるいは細胞中に挿入された上記の核酸分子の何れかを有するウイルス細胞または宿主細胞を含み、挿入された核酸分子によりコードされるポリペプチドの免疫応答を刺激するための、ヒトまたはヒト以外の動物におけるIsaacs症候群あるいはそれ以外の末梢神経障害にたいする免疫応答を刺激するワクチン組成物である。

【0027】本発明に係る細胞培養用媒体とは、末梢神経障害患者から分離された末梢神経・筋系の細胞とインキュベートすることにより、特異的に上記のモノクローナル抗体と結合させて、末梢神経障害の原因となる抗体を排除し、末梢神経となる細胞をインビトロで再生するための該抗体を含む細胞培養用媒体である。

【0028】

【発明の具体的説明】本発明に係るタンパク質は、下記の性状を有する末梢神経細胞タンパク質（以下「ニューロトニン」という）である。

a) Isaacs症候群患者、またはそれ以外の末梢神経障害患者の末梢神経細胞に見出され、

b) 前記患者の血液中に見出される抗体と反応し、

c) ウサギに免疫するとIsaacs症候群様の症状を引き起こし、かつ

d) SDS-PAGEにより求めた分子量約66kDaを持つ

以下、本発明を、ニューロトニンをコードするcDNA、関連核酸分子、ニューロトニン、ニューロトニンの生理機能、関連タンパク質、医用材料および動物への応用の順に詳細に説明する。

【0029】本明細書において、「末梢神経障害」とは、Isaacs症候群を除く末梢神経の障害をいうが、文中

では必要に応じてIsaacs症候群を含めた広義の意味に使うこともある。「VGKC」とは、Voltage gated potassium channelの略であり、電位依存性カリウムチャンネルをいう。「ニューロトニンおよびその関連タンパク質」および「ニューロトニンもしくはその関連タンパク質」において、「その関連タンパク質」には、ニューロトニン抗体も含まれる。

ニューロトニンをコードするcDNA

ニューロトニンをコードするcDNAは、ヒトゲノムに対応するcDNAライブラリーに対してIsaacs症候群患者の血清などを用いるイムノスクリーニング手法を適用して調製できる。すなわち、NB-1細胞などの神経由来のcDNAライブラリーは、常法によりmRNAを分離し、公知の技術によりベクターなどに組み込んで、mRNA混合物に逆転写酵素が作用することによって作成される。これにニューロトニン抗体を含む血清を使用して、ニューロトニンを発現しているcDNAを含むクローンが同定される。

【0030】本発明者が、上記のようにIsaacs症候群患者の血清を用いてイムノスクリーニングを行うことにより、新規タンパク質をコードしているcDNAを得た過程において、鎖長が異なる2つのcDNAが見出された。このタンパク質をコードする長いcDNAを「long cDNA」と称し、最初に得られた386アミノ酸のタンパク質をコードしている短いcDNAを「short cDNA」と称する。

【0031】図1、2にニューロトニンをコードするcDNAについて、「short cDNA」、「long cDNA」のヌクレオチド配列をそれぞれ示す。本発明に係るDNAは、ニューロトニンをコードするか、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列の全てを含むDNAである。これにはニューロトニンのアミノ酸情報、開始および終結コドンを含むDNAの他に、スプライシングを受ける前の情報を担うゲノム構造遺伝子のDNAも包含される。

【0032】さらにニューロトニンをコードするか、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列の全てまたは一部に実質的に対応する1つ以上のヌクレオチド配列を含むか、あるいは前記配列のいずれかと実質的に相同性であるかもしくは前記配列のいずれかとハイブリダイズする配列を含む核酸分子もまた本発明に属する。本発明に係る核酸分子は、一本鎖または二本鎖のDNA、cDNAまたはRNAであってもよい。

【0033】ここで「実質的に相同性」である配列には、約50%以上、例えば60%以上の配列同一性を有する配列、および機能的に等価な対立遺伝子変異体の配列、および単一または複数の塩基の置換、付加、および/または削除により修飾された関連配列が包含される。同様に「機能的に等価」とは、ニューロトニンと同様の作用を示すポリペプチドに対応することを意味する。

【0034】図1、2に示す配列または上記の定義のように実質的に相同な配列あるいは機能的に等価な配列とハイブリダイズする核酸分子もまた、本発明の範囲内に含まれる。ここで、用いられる「ハイブリダイズ」とは、非緊縮(ノストリンジェントな)条件(6×SSC, 1% SDS, 10% Dextran, 100g/ml salmon sperm DNA, 室温)において結合し、低い緊縮条件(2×SSC, 室温、より好ましくは2×SSC, 30)にて、またはより高い緊縮条件、例えば2×SSC, 65)にて洗浄された配列と定義される。ここでSSCとは、Standard Saline Citrateの略で、0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウムpH 7.2を意味する。

【0035】ニューロトニンに対する抗体のポリペプチドをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含み、この配列が図1または2に示されるニューロトニンをコードする配列からの1つ以上の抗原決定基をコードする領域を組み込んだ核酸分子もまた遺伝子工学の公知の方法を利用して作成することができる。このような核酸分子も本発明に含まれる。

【0036】ニューロトニンをコードする構造遺伝子およびそれからのDNA、それから産生されるcDNA、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列の全てまたは一部に実質的に対応する1つ以上のヌクレオチド配列を含むか、または前記配列のいずれかと実質的に相同性であるか、もしくは機能的に等価な配列、あるいは前記配列のいずれかとハイブリダイズする配列を含むDNA、それらのDNAから転写されるRNAを検出するには、これらのDNA鎖またはRNA鎖とのハイブリダイゼーションを利用する原理に基づき、これらの核酸分子を含む試薬が好ましく用いられる。さらにこれらの核酸分子は、PCRプライマーまたは相同部分を探索するためのハイブリダイゼーション・プローブとして利用することができる。

【0037】通常は、そのプローブは放射性アイソトープか、より好ましくは蛍光色素、化学発光など非アイソトープを利用して、5'末端ラベル、ニックトランスレーション法、ランダムプライマー法などにより標識することができる。かかるDNA、それから転写されたRNAを検出する試薬は、in situハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションなどにおいて、ハイブリダイゼーション用プローブとして好ましく利用される。

【0038】このようなプローブは、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、核酸レベルでのハイブリダイゼーションにより目的クローンの検索にも好ましく使用される。

ニューロトニン

本発明に係るニューロトニンは、図5または6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であるか、あるいは上記

cDNA、このcDNAに対応する遺伝子、または上記のヌクレオチド塩基配列のいずれかにハイブリダイズするDNAによりコードされるタンパク質である。ニューロトニン、上記患者の血液に見出される抗体と結合する活性を有し、さらに末梢神経細胞にある「14-3-3タンパク質」と結合することができる。

【0039】ニューロトニンは、Isaacs症候群またはこれ以外の末梢神経障害患者の血清などを利用するイムノスクリーニングにより取得することができる。あるいは、そのcDNAが得られれば、公知の組換えDNA技術を利用してcDNAの転写・翻訳により調製することもできる。さらに、本発明に係るタンパク質は、図5または6に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、図5または6に示されるアミノ酸配列において1個もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、あるいは機能的に等価なこれらの変異体ポリペプチド、あるいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチドにまで拡張され、これらのポリペプチドもまた本発明に含まれる。また、本発明に係るタンパク質は、生物起源のタンパク質の他に、人工的に一部もしくは全部合成されたもの、または生物起源のタンパク質を改変して得られたものであってもよい。本発明に係る生物起源のタンパク質には、遺伝子組換え技術に基づき製造されたものも包含される。

【0040】ここで用いられる「ポリペプチド」とは、完全長のタンパク質、およびこれより配列の短いポリペプチド両方を含む。これにより上記ニューロトニンの免疫学的に活性なドメインまたはそのドメインを有する断片も本発明に包含される。「免疫学的に活性」とは、該タンパク質に対する抗体に対するエピトープを含み抗原性を有することをいう。したがって、そのようなドメインを含む断片は、抗原性を保持する。同様にニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチドもまた本発明に係るタンパク質に含まれる。

【0041】ポリペプチドのアミノ酸配列に関して上記で用いられた「機能的に等価」なる用語は、アミノ酸配列において単一または複数のアミノ酸の欠失、置換、付加および/または挿入により修飾されたアミノ酸配列であるか、あるいは、アミノ酸配列において、例えばリン酸化もしくは脱リン酸化、グルコシル化もしくは脱グルコシル化などにより化学的にアミノ酸残基の側鎖が修飾された配列であるが、それにも関わらず、ニューロトニンと実質的に同等の作用あるいは活性が維持されていることに対応している。このような機能的に等価な変異体は、天然の生物学的変異として発生することがあり、あるいは公知技術を利用して製造することもできる。例えば、機能的に等価な組換えポリペプチドは、特定部位の

突然変異誘発、不特定部位の突然変異誘発、またはアミノ酸の酵素的開裂および/または連結反応などの公知技術をj用いて製造することができる。

【0042】上記のタンパク質、すなわちニューロトニンおよびその関連タンパク質は、それらのタンパク質を認識して結合する抗体を分析するために使用することができる。その目的のための免疫学的分析用試薬は、上記タンパク質のいずれかを含み、これとの抗原抗体反応および該反応とリンクした検知手段の測定を通じて検体中の抗体を検出することができる。そのための検知手段には、蛍光もしくは化学的発光を含む分光学的諸法の他に、免疫抗体法、放射能を利用する方法など公知の検出手段を適宜適用できる。

【0043】このような免疫学的分析用試薬は、疾病マーカーとしての上記抗体とニューロトニンもしくはその関連タンパク質との特異的結合を検出し分析するものでもあることから診断にも利用することができる。すなわち、被検者からの試料検体中のニューロトニンの特異的抗体または末梢神経障害の原因となる抗体のレベルを測定することによりIsaacs症候群、またはそれ以外の末梢神経障害を診断、または治療効果を判定する目的として利用することもできる。

【0044】他の適用例として、後述するモノクローナル抗体の製造において、抗体を産生する融合細胞の検出のため、すなわち多くの融合細胞の中から目的の特異抗体を産生している融合細胞を効率的に検出する目的に使用できる。例えば、抗原であるニューロトニンなどのタンパク質を固相支持体に固定化し、それに結合する融合細胞上清中の抗体を検出することによる。

【0045】上記ニューロトニンもしくはその関連タンパク質と結合できる物質、あるいは結合できるリガンドを有する化合物は、上記抗体を含めニューロトニンの機能を調節する物質として、またはその分析に利用できる物質として有用である。さらに抗ニューロトニンの抗体産生に抑制作用を示す化合物、抗ニューロトニン抗体の作用に影響を及ぼし得る化合物、あるいは抗体がニューロトニンに結合するのをブロックできる化合物などであってもよい。これらの化合物は、Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害において何らかの薬理学的作用を発揮することができる。

【0046】そのような物質を選別するスクリーニング方法とは、好ましくは次の工程を含む。

- a) リガンドの候補化合物を上記ニューロトニンもしくはその関連タンパク質と接触させる工程、および
- b) 前記タンパク質に対する結合活性を示す候補化合物を選択する工程

上記のタンパク質を分析するには、このタンパク質をアンチリガンドとして、上記スクリーニング方法によって得ることができるリガンドとの特異的結合を通じて測定することによる。

【0047】さらに、上記タンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法とは、好ましくは次の工程を含む。

a) 候補化合物の存在下で、上記ニューロトニンもしくはその関連タンパク質とリガンドとを接触させる工程、および

b) 前記タンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を示す候補化合物を選択する工程

かかるスクリーニング方法によって得ることができるリガンドまたは化合物は、ニューロトニンもしくはその関連タンパク質の阻害剤となり得るものである。従って、上記のスクリーニングで得られる化合物は、ニューロトニンもしくはその関連タンパク質との結合を利用することにより、Isaacs症候群を始めとする末梢神経障害の治療用薬剤として使用することができる。

マウスニューロトニンをコードするcDNA

マウスのcDNAライブラリーから、マウスニューロトニンをコードするcDNAを、ハイブリダイゼーション・クロニングにより単離することができる。そのためのプローブとして、上記ニューロトニンcDNAの完全長配列を使用し、ポジティブクローンを含むブラークのスクリーニングを行ってもよい。

【0048】このようにして単離され、ヌクレオチド配列分析がなされたマウスのニューロトニンをコードするcDNAのヌクレオチド配列を図3および4に示す。本発明に係るDNAとは、マウスニューロトニンをコードするか、あるいは図3または4に示すヌクレオチド配列の全てのヌクレオチド配列を含むDNAである。さらにマウスニューロトニンをコードするか、あるいは図3または4に示すヌクレオチド配列の全てまたは一部に實質的に対応する1つ以上のヌクレオチド配列を含むか、あるいは前記配列のいずれかと實質的に相同性であるか、もしくは前記配列のいずれかとハイブリダイズする配列を含む核酸分子もまた本発明に包含される。本発明に係る核酸は、一本鎖または二本鎖のDNA、cDNAまたはRNAであってもよい。

【0049】ここで「實質的に相同性」である配列には、約50%以上、例えば60%以上の配列同一性を有する配列、および機能的に等価な対立遺伝子変異体、さらに単一または複数の塩基の置換、付加、および/または削除により修飾された関連配列が包含される。「機能的に等価」とは、ニューロトニンと同様の作用を示すポリペプチドをコードする配列を有することを意味する。

【0050】図1、2に示す配列または上記定義のように實質的に相似た配列あるいは機能的に等価な配列とハイブリダイズする核酸分子もまた、本発明の範囲内に含まれる。ここで、用いられる「ハイブリダイズ」とは、上記に定義したとおりである。ニューロトニンに対する抗体のポリペプチドをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含み、この配列が図3または4に示されるニュー

ロトニンをコードする配列からの1つ以上の抗原決定基をコードする領域を組み込んだ核酸分子もまた公知の遺伝子工学技術を利用して作成することができる。

【0051】ヒトニューロトニンをコードするDNAまたは核酸分子について記載した事柄、利用などについては、そのままマウスニューロトニンおよびその関連タンパク質をコードする核酸についてもあてはまる。

マウスニューロトニン

本発明に係るマウスニューロトニンは、図7または8に示されるアミノ酸配列のポリペプチドである。さらに本発明は、図7または8に示されるアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいはニューロトニンの抗原性部分を構成するアミノ酸配列を含む合成ポリペプチド、または機能的に等価なこれらの変異体、あるいはこれらのアミノ酸配列をさらに含む融合ポリペプチドの形態のポリペプチドまで拡張される。ここで用いられた「ポリペプチド」および「機能的に等価」とは、上記で定義したとおりである。

【0052】ヒトニューロトニンについて記載した事柄、利用などについては、そのままマウスニューロトニンおよびその関連タンパク質についてもあてはまる。

ニューロトニンおよびニューロトニン遺伝子の生理機能
発明者らがIsaacs症候群患者の血清中に存在する対応抗体を利用したイムノスクリーニング法によって新規に発見したタンパク質であるニューロトニンのアミノ酸配列情報を担う構造遺伝子が、ヒトゲノム中に存在する。その位置、発現生理およびその調節機能などの詳細は今のところ不明である。さらにIsaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害がニューロトニンの過剰発現に由来するのか、異所性発現による影響なのか、あるいはニューロトニンおよびその抗体と末梢神経障害との関係についても今後の解明に待たねばならない。

【0053】ヒトからのニューロトニンは、ヒト以外の動物に免疫するとするIsaacs症候群様の症状を引き起こすタンパク質である。動物は、霊長類からヒツジ、ウサギ、ラット、マウスなど免疫応答を示すものなら種を問わない。例えば、ウサギの場合、全長511個のアミノ酸からなるニューロトニンをを用いてGSTとの融合タンパク質を作成し、これを抗原としてウサギに免疫する。接種して6週間ほど後には、後肢の痺れなど、Isaacs症候群に類似した症状の末梢神経障害が誘発されることが認められる。このニューロトニンを免疫したウサギの筋肉では、正常の筋肉組織と比べると、筋細胞の大きさが不均一になり、神経の変性も観察される。

【0054】Isaacs症候群の患者では、ニューロトニン遺伝子の発現が亢進し、これによりコードされるニューロトニンに結合する抗体の血中レベルが上昇している。その遺伝子の発現の原因、ニューロトニンの生理機能、Isaacs症候群の病態との関係などは不明である。ニュー

ロトニンに対する抗体産生も増大していることから、自己免疫疾患的な機序を基盤とする末梢神経障害の様相もある。これらの観察または実験結果を総合すると、新規に発見され同定されたニューロトニンは、Isaacs症候群あるいはその他の末梢神経障害に関係するタンパク質であることが示されている。

【0055】マウスニューロトニンのcDNAは、対応するヒトcDNAの塩基配列と85%以上の相同性があるが、マウスニューロトニンcDNAから導き出されるアミノ酸配列レベルにおいては、相同性を示す他の因子は存在せず、機能もわかっていない。マウスニューロトニン遺伝子も、ヒトニューロトニン遺伝子と同様に機能しており、ヒトのニューロトニンをマウスに免疫すると、後肢がしびれるなどIsaacs症候群に類似した末梢神経障害を誘発することが考えられる。

【0056】上記遺伝子の発現に関連して、そのDNAの内因性プロモーターの活性を上昇または低下させる化合物は、

a)被検化合物の存在下、当該DNAの内因性プロモーターの下流に結合されている遺伝子の発現を検出する工程、

b)該発現を上昇または低下させる化合物を選択する工程、

を含む方法によりスクリーニングすることができる。

【0057】ヒトニューロトニンcDNAの塩基配列をアミノ酸配列に変換し、モチーフ検索を行うと、主なモチーフは存在しないが、そのC末端側に脂質による修飾がなされる部位の存在が判明している。ニューロトニンのC末端側部分による免疫でウサギが後肢の痺れを示したこと、痺れを訴える患者の血清に見られるニューロトニンに対する抗体は、ニューロトニンのC末端側に対するものが多く見出される事実などから、ニューロトニンは、膜タンパク質であり、少なくともそのC末端側は膜内に存在して機能している。

【0058】これまで本発明者の研究により、ニューロトニンのC末端部分は、「14-3-3タンパク質」に結合することが明らかにされている。この「14-3-3タンパク質」は、細胞内に存在し、セリン残基がリン酸化されたタンパク質を認識し、種々のシグナル伝達のモジュレーターとしての役割が想定されている。したがって、ニューロトニンに代わり、あるいは競争的に「14-3-3タンパク質」に結合または相互作用をすることができるタンパク質または非タンパク性物質は、ニューロトニンに類似した影響を「14-3-3タンパク質」に及ぼすことができる。このようなタンパク質または非タンパク性物質は、明らかにIsaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害において何らかの薬理学的作用を發揮することが可能である。

【0059】Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害のうち、一部の患者の血清には、VGKC抗体が検出

されたことがこれまで報告されており、これらの病態においてVGKCの機能異常の関与が示唆されている。さらにこれらの患者の血清にはニューロトニンに対する種々の抗体も存在すること、とくにそのC末端側に対する抗体が多くの患者に見られたことが本発明者らの研究により明らかになり、これらの抗体も同様にニューロトニンの生理機能と関連して症状に関与している。このため、これらの抗体に結合できる抗体、抗体産生に抑制作用を示す化合物、または抗体の作用に影響を及ぼし得る化合物、抗体がニューロトニンに結合するのをブロックできる化合物などは、Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害において何らかの薬理学的作用を發揮することができる。

関連核酸分子

本発明に係る上記ニューロトニン遺伝子、そのmRNA、cDNAあるいはこれらに関連する核酸分子を組換えDNA技術により組み込んだアンチセンスRNAおよびアンチセンスDNA、リボザイム、コスミドなども本発明の範囲に包含される。これらの組換えDNA、核酸分子もまた、遺伝子診断および遺伝子治療の方法の確立、医薬品開発において適用される各種の遺伝子クローニング操作において、必要に応じて利用することが可能である。

・アンチセンスRNA、アンチセンスDNA

ニューロトニンの翻訳情報を担うmRNA鎖と、これと相補的になっているアンチセンス鎖とからハイブリダイゼーションにより作成された二本鎖RNAもしくはDNA、あるいは上記cDNAあるいは上記核酸分子に対するアンチセンスRNA、アンチセンスDNAは、相補的なmRNAとハイブリダイゼーションして翻訳を阻害し相当する遺伝子の発現の抑制機能を有するため、アンチセンス医療、ロックアウトマウスの作成に応用できる。

【0060】アンチセンス医療では、遺伝子レベルでの発症の機作の解明、治療方法の開発などに、アンチセンスRNA、アンチセンスDNAが利用される。またニューロトニン遺伝子の発現を調節する目的にもこれらのRNA、DNAを利用することができる。標的となる遺伝子の発現を抑制するためには、細胞内にアンチセンスRNAを注入するか、これを作るDNAを導入してもよい。

・リボザイム

酵素活性部位が解明されたりボザイムの中で、ニューロトニンのRNA、上記cDNAまたは上記核酸分子から転写された関連RNA、またはそれらの一部から転写された関連RNAの任意の塩基配列を特異的に切断するように設計され、化学的な合成により作成されたりボザイムあるいは、その酵素活性部位の塩基配列を有しRNA切断活性があるオリゴDNAも本発明に包含される。

・コスミド

プラスミド由来の複製起点およびバクテリオファージ

のcos部位などの必要な要素の他に、ニューロトニン遺伝子またはそのDNA断片、関連核酸を組み込んだ環状DNAは、プラスミドと同様に複製されるため、ベクターとして利用できる。このような人工核酸粒子は、比較的大きなDNA断片であっても挿入できるため、クローニング目的のために大腸菌などの細菌に効率よく導入することができる。また、遺伝子ライブラリーを作るのにも好適である。

・発現ベクターおよびクローニングベクター

形質転換された上記核酸を含有する原核細胞微生物、真核細胞微生物は、問題とするタンパク質の大量発現に使用することができる。

【0061】本発明に係るニューロトニンをコードするヌクレオチド配列は、一群の公知技術および発現システム、例えば大腸菌、枯草菌などの原核細胞における発現系、酵母、形質転換哺乳類細胞などの真核細胞における発現系、ならびにトランスジェニック哺乳類における発現系などを適宜利用することによりクローン化し、発現を達成することができる。

【0062】上記の核酸分子を含む真核細胞または原核細胞を上記ポリペプチドが発現する条件下で培養し、このようにして産生されたポリペプチドを回収することからなるニューロトニン関連の合成ポリペプチドの製造方法も好ましく用いることができる。以上より、本発明の範囲は、本発明に係る核酸分子またはヌクレオチド配列を含むクローニングベクターおよび発現ベクターも包含している。かかる発現ベクターは、本発明の核酸分子とリーディングフレームを適合させて結合された適切な制御配列、例えば開始および停止コドンなどの翻訳調節要素およびプロモーター-オペレーター領域、リボソーム結合部位、終了停止配列などの転写調節要素を含んでいる。

【0063】本発明に係るベクターには、遺伝子工学分野での公知の、または文献に記載された技術に用いられるプラスミド、バクテリオファージおよびウイルス(真核ウイルスも含む)などが挙げられ、これらのベクターは、公知のさまざまな発現システムにおいて使用することができる。好ましいウィルス性ベクターとしてバキュロウイルス、アデノウイルスおよびワクシニアウイルスなどを例示することができる。

【0064】様々な公知技術を使用することによって本発明に係る核酸分子またはヌクレオチド配列の発現の目的で、上記のベクターまたはコスミドを原核細胞または真核細胞内に挿入することができる。あるいは、トランスジェニック動物を作成するため生殖系列細胞または体細胞にこれらベクターまたはコスミドを保持している形質転換体を作成することができる。

【0065】さらに本発明は、本発明に係る核酸分子またはヌクレオチド分子を有する、形質転換もしくはトランスフェクションされた、真核もしくは原核宿主細胞ま

たはトランスジェニック微生物も含む。これらの形質転換体などを製造するため、公知の形質転換技術またはトランスフェクション技術を使用することができる。哺乳類細胞発現システムは、ニューロトニンがジスルフィド結合、グリコシレーション、脂質付加などの翻訳後修飾を多かれ少なかれ必要とするならば、哺乳類宿主細胞が抗原のネイティブな形態およびエピトープの良好な再生を可能とすることから、より好ましい。すなわち、真核発現システムは、抗原のネイティブな形態の再生に乏しく不溶性タンパク質を産生するおそれがある大腸菌(E. coli)に対して、翻訳後修飾を遂行しうるからである。この目的により好ましく用いることができる動物細胞として、ヒトまたは動物の繊維芽細胞またはミエロマセルライン、例えばHela-ヒトセルライン、BHK 幼児ハムスター腎臓細胞、VERO-サル腎臓セルライン、FR3T3-Fisherラット繊維芽細胞、NIH3T3-マウス繊維芽細胞セルライン、C1271-マウス乳癌セルライン、CV-1-アフリカグリーンモンキー腎臓繊維芽細胞、3T6-マウス胚繊維芽細胞、L細胞 マウスセルライン、CHO-チャイニーズハムスター卵巣セルライン、NSONSI SP2および他のマウスミエロマセルライン、YB2/0およびY3などの他のマウスミエロマセルラインおよびラットミエロマセルラインなどを挙げるることができる。

【0066】異なったクラスの哺乳類セルラインに適切なベクターは、種々知られているが、一般的にこれらは、ニューロトニンまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列に作動的に結合されたプロモーターおよび/またはエンハンサーを含む。好適なプロモーターとして、SV40初期または後記プロモーター、例えばPS VLベクター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、マウスメタロチオネインIプロモーターおよびマウス乳癌ウイルスLTR(long terminal repeat)などが挙げられる。ベクターは、好適なマーカー、例えばジヒドロ葉酸還元酵素またはグルタミン合成酵素などの遺伝子などを含んでいる。

【0067】宿主細胞のトランスフェクションは、標準的な公知技術を使用して行うことができる。そのために例えば、リン酸カルシウム法、リン酸カルシウムの代わりにDEAE-デキストランまたはポリブレンを用いる方法、プロトプラスト融合法、赤血球ゴースト融合法、リボソーム融合法もしくはリポフェクション法、直接マイクロインジェクション法、ジーンキャノンまたはエレクトロポレーションを用いた哺乳類セルラインのトランスフェクション方法が確立されている。一般的に線状DNAは環状DNAよりも容易に導入される。

関連タンパク質

ニューロトニンに関連した合成ポリペプチドは、ニューロトニンと同様に以下に述べる抗体産生、ワクチン製造などにおいて利用することができる。かかる合成ポリペプチドは、発現制御配列に作動的に結合した、上記のヌ

クレオチド配列を含む組換えDNAを含む宿主細胞、またはこのような組換えDNA分子を含むビヒクルまたはベクターを含む宿主細胞中での発現により製造することができる。あるいは、ポリペプチドは本発明に係る裸のDNA分子を宿主細胞に直接注入することによっても発現させることができる。

【0068】このようにして発現された合成ポリペプチドは、ニューロトニンのすべてまたは一部の免疫原性を示す部分を含む融合ポリペプチドおよびそれに融合した組換え分子のDNAによってコードされた付加的ポリペプチドであってもよい。例えばグルタチオン S 10
トランスフェラーゼ、ホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、HBコア (hepatitis B core) 抗原などのタンパク質にカップリングされた本発明に係る合成ニューロトニンまたは他のポリペプチドを含む融合タンパク質を製造することが望ましい。大抵の融合タンパク質は、2つのコード配列が、同調したリーディングフレームとともに結合された組換え遺伝子の発現により形成される。あるいはポリペプチドは、インビトロで化学的手段により結合することができる。このような融合また 20
はハイブリッド誘導體もまた本発明に包含され、合成ポリペプチドは、例えば公知のMerrifield固相合成法などの化学的手段を使用することにより製造することができる。

・抗体タンパク質

ニューロトニンおよびその関連タンパク質に対する抗体は、Isaacs症候群およびそれ以外の末梢神経患者において産生されている。したがって、患者の血清にはニューロトニンに対する種々の抗体も存在するが、本発明者らの研究により特にそのC末端側部分に対する抗体が多く 30
の患者に見出されている。これらの抗体もニューロトニンの生理機能と密接に関連して症状に関与している。このため、これらの抗ニューロトニン抗体に結合できる抗体もまた、Isaacs症候群または末梢神経障害において何らかの薬理学的作用を発揮することができる。

【0069】上記抗体は、抗原となるタンパク質を動物に接種して免疫することにより調製することができる。そのための動物として、広く利用されている、ウサギ、ヒツジ、マウス、ラットなどが挙げられる。しかしながら、産生される抗体はいずれもポリクローナルであり、 40
しかも動物由来の抗体であるためヒトにとっては異物である。

【0070】抗体の中で、モノクローナル抗体は、単一のエピトープに特異的に結合する均一な抗体で特に有用で好ましい抗体である。すなわち、ニューロトニンに対するモノクローナル抗体、VGKC抗体に対するモノクローナル抗体、末梢神経障害の原因となる抗体またはそれ以外の上記の関連タンパク質などに対するモノクローナル抗体などは、本発明の範囲に含まれる。

【0071】これらのモノクローナル抗体の製造は、抗 50

原となるニューロトニンなどで免疫した動物脾臓からのリンパ球細胞とHAT感受性の骨髄腫細胞とのハイブリドーマ細胞を調製しクローン化する従来の確立された細胞融合技術を利用してもよく、また公知の遺伝子組換え技術を利用しても大量に生産することができる。ヒト化モノクローナル抗体を得るには、マウス、ラットなどからの動物細胞の抗体cDNAとヒト抗体cDNAとの融合を含む遺伝子組換え技術によるキメラまたはヒト化抗体の産生がある。ヒト由来細胞・腫瘍細胞クローンの利用、マウス腫瘍細胞とヒト細胞との融合、トランスジェニックマウス利用によるヒト抗体の産生方法も挙げられる。

【0072】上記抗体の一般的な用途として、ニューロトニン、その関連タンパク質、「14-3-3タンパク質」に関連する検査薬、診断薬、治療薬、研究用試薬、分析用試薬、免疫スクリーニング用抗体などが挙げられる。これらの抗体の利用態様について一例を挙げると、ニューロトニンもしくはその関連タンパク質と反応する抗体を含み、該抗体がニューロトニンなどと検知可能に結合することに基づく、ニューロトニンもしくはその関連タンパク質を測定するための免疫学的分析用試薬が示される。ここで検知可能とは、分光学的諸方法の他に免疫抗体法、放射能を利用する方法など公知の検出手段を適宜適用できる状態にすることをいう。具体的な利用態様として、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素標識抗体測定法 (ELISA) などが挙げられる。RIAでは、¹²⁵Iまたは¹³¹Iなどで標識した上記抗体を固相支持体に固定化し、その放射活性を測定することによる。またELISAでは、同様に抗体を支持体に固定し、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなどを結合させた二次抗体を添加して酵素反応を行い比色、蛍光を測定することによる。

【0073】また、上記抗体を利用する態様の別の例として、Isaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害を診断したり、その治療の効果を判定するためのデータを供する検査方法が示される。これは、被検者からの試料検体中のニューロトニンもしくはその関連タンパク質、ニューロトニン抗体または末梢神経障害の原因となる抗体レベルを測定することを特徴とする検査方法である。

【0074】また、ニューロトニンもしくはその関連タンパク質、あるいは末梢神経障害の原因となる抗体をマーカーとして、上記抗体との特異的結合を検出することで、被検者からの試料検体中のニューロトニンもしくはその関連タンパク質のレベルあるいは末梢神経障害の原因となる抗体のレベルを測定する。その結果はIsaacs症候群またはそれ以外の末梢神経障害を診断するために、または治療効果の判定のために供される。これらの分析用試薬は、分析対象とするニューロトニンもしくはその関連タンパク質などが本来、神経細胞に存在するものである。しかしながら、被験者の体液中に存在する上記抗

体を分析することにより、ニューロトニンもしくはその関連タンパク質を検出することができる。

【0075】ニューロトニンもしくはその関連タンパク質をコードする遺伝子の発現を手がかりに、該タンパク質が産生されている細胞を検出または分離することができる。例えば、ニューロトニンおよび関連タンパク質に対する抗体、好ましくはそのモノクローナル抗体を検出手段として使用することにより、フローサイトメトリー (Flow cytometry) の技術を利用することにより、これらのタンパク質を発現している細胞を分離または検出

【0076】この方法を使用することにより、細胞集団の中から、ニューロトニンを発現している末梢神経細胞を特異的に検出または分離することができる。例えば、

【0077】本発明に係る核酸分子またはヌクレオチド分子を含み、形質転換されたまたはトランスフェクションされた真核または原核宿主細胞またはトランスジェニック微生物もまた本発明に含まれる。さらに上記モノクローナル抗体を産生するB細胞と腫瘍細胞との融合細胞

医用材料としての応用

本発明に係るニューロトニンおよびその関連タンパク質は、上記の分析、検査、診断、治療用として利用されることの他に、血液濾過材、細胞培養媒体、薬物送達システムの担体、ワクチンなど、種々の医用材料にも応用することができる。以下、その利用態様の例を挙げるが、これらのみに限定されるものではない。

【0078】血液の透析濾過により血中のニューロトニン抗体または末梢神経障害の原因となる抗体を、濾過材に固定化した上記モノクローナル抗体に結合させ、次いで濾過した血液を再び患者に戻せば、体内のニューロトニン抗体または末梢神経障害の原因となる抗体を低減せしめることができる。このような全血透析に代わる血液の濾過は、ニューロトニンもしくはその抗体、または末梢神経障害の原因となる抗体に起因するしびれを解除する治療法を提供する。本発明は、その目的のための抗体を結合させた血液濾過材としての利用もある。

【0079】他の利用態様として、末梢神経障害患者から分離された末梢神経・筋系の細胞とインキュベートすることにより、特異的にニューロトニンに反応するモノクローナル抗体と結合させて、末梢神経障害の原因に関する抗体を排除し、末梢神経となる細胞をインビトロで再生するための該抗体を含む細胞培養用媒体の利用も挙げられる。

【0080】ヒト型抗体は、ヒトに対する抗原性がないため、Isaacs症候群を始めとする末梢神経障害の原因に関するニューロトニンあるいは他のタンパク質、生体成分などに直接反応し、その機能を失わせる治療目的、あるいは有効な生理活性物質、薬効を有する化合物を目的部位まで有効に送達するためのDDS (Drug Delivery System) 担体としての利用が挙げられる。反応の均一性から、ヒト型モノクローナル抗体は特に好適に使用することができる。

【0081】本発明に係るワクチン組成物とは、製剤上許容される担体と一緒に、本発明に含まれる上記のタンパク質の中で、1つのポリペプチドを含み該ポリペプチドの免疫応答を、あるいは細胞中に挿入された上記の何れかの核酸分子を有するウィルス細胞または宿主細胞を含み、挿入された核酸分子によりコードされるポリペプチドの免疫応答を刺激するための、ヒトまたはヒト以外の動物におけるIsaacs症候群あるいはそれ以外の末梢神経障害にたいする免疫応答を刺激するワクチン組成物である。

【0082】かかるワクチン組成物は、ワクチン製造分野において公知の方法により製造することができる。従来からのワクチン処方は、1つ以上の薬剂的に許容される担体または希釈剤の存在のもとに、適切であれば、1つ以上の好適なアジュバント、例えば水酸化アルミニウム、サポニン、Quil Aまたはその精製された形態、ムラミルジペプチド、鉱油、またはノバソームなどと一緒に、1つ以上の本発明に係るポリペプチドを含むことができる。好ましい担体としては、患者にペプチドまたはポリペプチドを導入するのに使用されるビヒクルとして好適な生理食塩水溶液などの液体媒体を挙げることができる。防腐剤などの添加成分が含まれていてもよい。

【0083】他のワクチン処方として、本発明に係る核酸分子を挿入されたウィルス、または宿主細胞、例えばワクシニアウィルス、アデノウィルス、サルモネラ族などの微生物を含んでもよい。これは、挿入された核酸分子によってコードされるポリペプチドに対する免疫応答を刺激するためである。したがって、ヒトまたはヒト以外の動物におけるIsaacs症候群あるいはそれ以外の末梢神経障害にたいする免疫応答を刺激するワクチン組成物の製造に本発明に係る核酸分子またはポリペプチドを使用する方法も本発明に含まれる。

【0084】このようなワクチンの投与は、従来の経路、例えば、経口または非経口 (例えば、任意に間隔を

おいた筋肉内注射、例えば7～28日間隔での2回の注射)など任意に利用できる。

動物

ニューロトニン遺伝子およびニューロトニンの機能およびその発現調節を探り、これに基づきIsaacs症候群を始めとする末梢神経障害の診断治療の方法を確立し、治療薬を開発するためには、疾患モデル動物が有用である。すなわち、本発明に係る末梢神経障害モデル動物は、ニューロトニンをコードするDNAが、あるいは図1または2に示すヌクレオチド配列、図3または4に示すヌクレオチド配列と相同性を有するかまたはハイブリダイズするDNAの発現が改変されているか、あるいはそのような改変を誘導できるトランスジェニック非ヒト脊椎動物である。

【0085】さらに有用なトランスジェニック非ヒト動物として、非ヒト脊椎動物であって、内因性のニューロトニン遺伝子DNAまたは関連DNAの発現が抑制されているノックアウト非ヒト脊椎動物、他の遺伝子がノックアウトされている非ヒト脊椎動物が挙げられる。他の遺伝子とは、ニューロトニンをコードする遺伝子以外のものをいい、末梢神経細胞の他のタンパク質、例えば「14-3-3」タンパク質などをコードする遺伝子などであってもよい。非ヒト脊椎動物の種類は特に限定されない。これらの動物も末梢神経障害のモデル動物として上記の目的に利用することができる。

【0086】その中で特に好ましく使用される非ヒト脊椎動物として、上記遺伝子をノックアウトしたトランスジェニック・マウスは容易に作成することができる。かかるマウスは、ノックアウトされた遺伝子の機能の他に、末梢神経障害の機作の解明、その診断治療の方法の確立、薬剤開発の研究、ワクチンの検定などに広く利用することができる。このようなトランスジェニックマウスは、ノックアウトする遺伝子と転写の向きを逆にしたDNAをマウス受精卵に入れて作る公知の方法、あるいはアンチセンスRNAを加える周知のアンチセンス法により作成できる。これらの場合、マウスゲノムからのニューロトニン遺伝子をもとにターゲティングベクターを介して行うことができる。さらに胚性幹細胞、すなわちES細胞(embryonic stem cells)を利用する方法なども挙げられる。

【0087】ニューロトニンで免疫された動物は、Isaacs症候群あるいはそれ以外の末梢神経障害の改善作用を有する化合物のスクリーニングに使用することができる。このような動物は、特に限定されないが、免疫応答を示すものであればその種類を問わない。そのための動物として、広く利用されている、ウサギ、ヒツジ、マウス、ラットなどが挙げられる。

【0088】例えば、上記のようにヒトニューロトニンで免疫したウサギは、ヒトニューロトニンに対する抗体が6週間前後には産生されており、Isaacs症候群に似た

症状を呈する。このIsaacs類似の症状を示すウサギは、上記モノクローナル抗体などの抗体類の機能、ワクチン・薬剤類の効能を調べたり、ニューロトニンに結合する因子をブロックする化合物、タンパク質に結合してその機能を調整する化合物、VGKC機能の抑制、神経終末におけるシグナル伝達不全、または有痛性筋痙攣を改善するタンパク質または非タンパク性物質などのスクリーニングに使用することができる。

【0089】上記ニューロトニン遺伝子の発現に関連して、そのDNAの内因性プロモーターの活性を上昇または低下させる化合物は、上記「関連タンパク質」の項に記載した方法とは別の方法として、

- 非ヒト脊椎動物または該動物に由来する細胞に、被検化合物を適用する工程、
- ノックインされた遺伝子の発現を上昇または低下させる化合物を選択する工程、

を含む方法によりスクリーニングすることができる。

【0090】

【発明の効果】本発明によれば、Isaacs症候群のキー物質ともいべきニューロトニンが同定されその構造が明らかにされたため、これに対するモノクローナル抗体、これらの物質の機能をモジュレートできる化合物、その化合物をスクリーニングできる動物などを作成または調製することができる。ニューロトニン、その関連物質および動物を利用してIsaacs症候群を含む末梢神経障害の検査方法、診断・治療方法を確立することができる。

【0091】本発明によれば、ニューロトニン遺伝子の存在が、そのcDNAの単離と同定により明らかとなり、ニューロトニンあるいは末梢神経障害の原因となる抗体に対する抗体、モノクローナル抗体、トランスジェニックマウスの利用などにより、ニューロトニン遺伝子の機能およびその発現の機構、調節機作などの研究に有力な手段を与え、さらに末梢神経における機能不全の機作と実体の解明などに資するものである。

【0092】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいてさらに説明するが、本発明の範囲は、これらの記載に限定されるものではない。

【0093】

- 【実施例1】・Isaacs症候群患者の血清が認識する抗原(ニューロトニン)の遺伝子クローニング
ニューロトニンをコードするcDNAは、ヒトゲノムの対応する遺伝子が発現しているIsaacs症候群患者の血清抗体を用いてイムノスクリーニングから得た。ヒト神経芽腫由来細胞(NB-1)株からAcid guanidine/phenol chloroform法により全RNAを抽出し、さらにオリゴ(dT)ビーズを用いてアフィニティークロマトグラフィーによりmRNAを分離した(Anal. Biochem., 162:159, 1987)。ZAPベクター(STRATAGENE社)を用いて、cDNAライブラリーを常法に従い作成した。pico

Blue immunoscreening Kit (STRATAGENE社)により上記患者の血清によるイムノスクリーニングを行った。得られた陽性クローン(ファージ)をヘルパーファージによりプラスミドpBluescript II SK(+)へと変換した。pBluescript II SK(+)に挿入されたDNAの塩基配列はM13PrimerM4およびM13PrimerRV(Takara)を用いてダイターミネーター法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74:5463, 1977)に基づきABI PRISM377 DNA Sequencing System (Perkin Elmer社)により決定した。Isaacs症候群患者の血清が認識する抗原(ニューロトニン)をコードするcDNAの3'末端から塩基配列を決定し、Poly(A)⁺鎖を含む塩基配列を明らかにした(図1)。この塩基配列をGenBankによりホモロジー・サーチした結果、類似の配列は報告されておらず新規な遺伝子であることが判明した。このcDNA(「short cDNA」と名づけた)は、全部で1347個のヌクレオチドから構成されており、386アミノ酸からなる新規タンパク質をコードしている。

【0094】このcDNAによりコードされるタンパク質を得ようとしたが、開始メチオンが得られていなかったため、この塩基配列を用いて上記cDNAライブラリーから5'-RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85:8998-9002, 1988)により、PCRを行ったところ、全長511個のアミノ酸からなるタンパク質、すなわちニューロトニンに対応するcDNA(「long cDNA」と名づけた)が得られた。

【0095】図1、2に「short cDNA」、「long cDNA」ヌクレオチド配列をそれぞれ示す。

【0096】

【実施例2】・大腸菌での組み替えタンパク質の発現
実施例1のイムノスクリーニングで得られたcDNAクローンからニューロトニンの一部分をコードするshort cDNAを抽出した。EcoRI/XhoIの認識配列を末端に持つshort cDNAを、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現ベクターpGEX-5X-3に挿入してサブクローニングした。このshort cDNAを組み込んだpGEX-5X-3をBL21大腸菌株に42、45秒のヒートショックにより導入し、BL21/short cDNA-GST gene/pGEX-5X-3を得た。このBL21を0.1mg/mLアンピシリンを含むLB培地で培養し、0.1mM isopropylthio⁻-D-galactoside(IPTG)を添加して37でさらに2時間培養し、前記融合タンパク質の発現を誘導した。遠心分離法により回収したBL21をPBS(Phosphate buffered saline)で洗浄後、1mg/mLリゾチーム消化し、0.1% Triton X-100により可溶化した。可溶化されたGST融合タンパク質を含むBL21由来タンパク質懸濁液をグルタチオンセファロース4B(GS4B)に適用後、PBSで洗浄し50mM還元型グルタチオン/PBSにより目的とするGST-shortニューロトニン融合タンパク質を精製した。さらにSDS-電気泳動

法(SDS-PAGE)により、分子量、均一性、サブユニット構造などを調べた。

・ニューロトニンをコードする完全長cDNA組み替えタンパク質の大腸菌での発現

実施例1で得られたEcoRI/XhoIの認識配列を末端に持つ完全長cDNAの3'末端に、2分子のインフルエンザ赤血球凝集素(hemagglutinin;HA)-tagを付加したニューロトニンcDNAを、発現ベクターとしてグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現ベクターpGEX-5X-1に挿入してサブクローニングした。このcDNAを組み込んだpGEX-5X-1をBL21大腸菌株に42、45秒のヒートショックにより導入し、BL21/long cDNA-GST gene/pGEX-5X-1を得た。このBL21を0.1mg/mLアンピシリンを含むLB培地で培養し、0.1mM isopropylthio⁻-D-galactoside(IPTG)を添加して30でさらに3時間培養し、N末端にGST、C末端にHAを融合した融合タンパク質(GST-ニューロトニン-HAHA)の発現を誘導した。遠心分離法により回収したBL21をPBSで洗浄後、1mg/mLリゾチーム消化し、0.1% Triton X-100により可溶化した。可溶化された上記GST融合タンパク質を含むBL21由来タンパク質懸濁液を、グルタチオンセファロース4B(GS4B)に適用後PBSで洗浄し、50mM還元型グルタチオン/Tris-HCl(pH8.0)により目的とするGST-ニューロトニン-HAHA融合タンパク質を精製した。

【0097】発現の確認は、50mM還元型グルタチオン溶出画分をPBSで200倍、2,000倍に希釈して25mM Tris-HCl(pH6.8)、0.25%SDS、0.05%メルカプトエタノール、0.1%グリセロールで処理した後、8%SDS-PAGEに適用した。SDS-PAGE後、上記融合タンパク質(GST-ニューロトニン-HAHA)は、エレクトロブロッティング法によりナイロン膜に転写した。このナイロン膜は5%スキムミルクを含むPBSで室温、60分間ブロッキングを行い、0.5%スキムミルクを含むPBSで400倍に希釈した抗HAMノクローナル抗体(Boehringer mannheim社)で室温、60分間免疫反応を行わせた。反応後、0.1%Tween20/PBSで洗浄してから、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horse radish peroxidase)結合-抗マウス・免疫グロブリンG(anti mouse IgG-HRP)を2次抗体として室温で60分免疫反応させ、0.1%Tween20/PBSで洗浄して、HRP活性を検出することにより目的抗原を検出した。HRP活性の検出にはECL(Amersham社)を用いた(Clin. Chem., 25:1531, 1979)。結果を図9に示した。上記GST-ニューロトニン-HAHA融合タンパク質の分子量サイズからニューロトニンの分子量は約66kDAと推測された。

・In vitroにおける完全長cDNA組み替えタンパク質の発現

ニューロトニンcDNA(図2)の末端を制限酵素EcoRIで修飾し、pBluescriptIIKSベクターに挿入した。その後、このpBluescript(1μg)とTNT-coupled Translat

ion System (Promega社)を用いて、in vitro translation法により、ニューロトニンを試験管内で〔³⁵S〕ラベル体として発現させた。〔³⁵S〕ラベルしたタンパク質は10%SDS-PAGEに適用し、イメージアナライザー (BAS 2000, Fujix) により放射活性を検出した。ニューロトニンcDNAからインビトロで翻訳されるニューロトニンのSDS-PAGEによる分子量は約66kDaであることが認められた。

【0098】

【実施例3】・ノーザンブロッティング法によるニューロトニン遺伝子の発現確認

NB-1細胞、A549細胞株、Jurkat細胞株およびHeLa細胞株よりそれぞれ常法によりmRNAを採取した。このmRNA 1μgを1%アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜にコンタクトブロッティング法で転写した。このナイロン膜を80℃、2時間処理し、デンハルト液中で、42℃、2時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次いで³²P放射ラベルしたニューロトニンcDNAをプローブとして42℃、12時間ハイブリダイズさせた。反応後のナイロン膜を300mM NaCl、30mM sodium citrateで洗浄後、15mM NaCl、1.5mM sodium citrateを使って50℃で再度洗浄を行った。目的のmRNAは、X線フィルムを感光させることにより検出した。得られたオートラジオグラフから、ニューロトニン遺伝子が、神経細胞のNB-1細胞に強く発現していることを認めた。

・ニューロトニンのウサギへの免疫 (図10、11)

全長511個のアミノ酸からなるニューロトニンをういてGSTとの融合タンパク質を作成し、これを抗原としてアジュバントとともに常法に従い、3羽のウサギに免疫した。6週間後には、3羽のウサギ全部に後肢の痺れ、筋硬直、これらに基づく歩行障害など、Isaacs症候群に類似した症状の末梢神経障害を誘発することが認められた (図10)。このニューロトニンを免疫したウサギから採取した筋肉をHE染色して顕微鏡で観察すると、正常の筋肉組織と比べると、筋細胞の大きさが不均一になり、神経細胞の変性も観察された (図11)。

【0099】次に、5羽のウサギを用いて、ヒトニューロトニンをC末端側部分、N末端側部分およびそれらの中間部の3区分に分割し、これらを別々にウサギに免疫したところ、ニューロトニンのC末端側部分を免疫したウサギに、上記症状が誘発され、他の部分を免疫した場合にはそうした結果は得られなかった。ニューロトニンを免疫したウサギから得た血清を、抗ニューロトニン抗血清として以下の実験に使用した。

・ウェスタンブロッティング法による各種細胞におけるニューロトニン遺伝子の発現の確認

実施例1で調製したGST-shortニューロトニン融合タンパク質 (陽性コントロール) およびNB-1神経細胞、HEK (human embryonic kidney) -293Tを用いて、ニューロトニン遺伝子の発現状態をウェスタンブロッティング

法で確認した。

【0100】まず試料とする各種細胞から、1%NP-40で可溶化した細胞溶解液を調製した。各細胞溶解液は、25mM Tris-HCl (pH6.8)、0.25% SDS、0.05%メルカプトエタノール、0.1%グリセロールで処理し、8% SDS-PAGEにより分離した。SDS-PAGE後、各種細胞由来タンパク質は、エレクトロブロッティング法によりニトロセルロース (NC) 膜に転写した。このNC膜に対して、抗ニューロトニン抗血清を、2.0mg/mLのGST-shortニューロトニン融合タンパク質と5%スキムミルクを加えたTBS (Tris Buffered Saline) により1,000倍に希釈して室温で60分免疫反応させた。また陰性コントロールとして同じ抗体溶液をNC膜と反応させる実験、あるいは抗体溶液のGST-shortニューロトニン融合タンパク質をGSTのみに代えた実験を同時に行った。反応後のNC膜を0.1%Tween20/TBSで洗浄し、HRP標識抗ウサギIgG抗体を2次抗体として室温で60分間免疫反応させ、0.1%Tween20/TBSで洗浄し、HRP活性を検出することにより目的抗原を検出した。HRP活性の検出にはECL (Amersham社) を用いた (Clin. Chem., 25:1531, 1979)。その結果、ニューロトニンが、NB-1細胞に産生されていることを認めた。

【0101】

【実施例4】・患者血清中の抗ヒトニューロトニン抗体の検出 (図12)

上記のとおり調製したGST-shortニューロトニン-融合タンパク質を抗原として用い、ウェスタンブロッティング法によってヒト血清中の抗ニューロトニン抗体の検出を行った。

【0102】まずGST-shortニューロトニン-融合タンパク質 (100ng / lane) をSDS-PAGEにより泳動によりNC膜に転写した。1次抗体として、Isaacs症候群患者 (5名)、糖尿病などの合併症として手足の疼痛性痺れを訴えるIsaacs症候群以外の末梢神経障害患者 (30名) および健常者 (8名) からの血清を用いた。その血清中の抗ニューロトニン抗体の有無を調べるため、TBSで1,000倍に希釈した血清試料を上記NC膜に対して室温で60分間免疫反応させた。0.1% Tween20/TBSでNC膜を洗浄した後、HRP標識抗ヒトIgG抗体を2次抗体として室温で60分間免疫反応させた。0.1% Tween20/TBSでNC膜を洗浄してから、HRP活性を検出することを通じて、目的抗原と反応したヒトIgGを検出した。HRP活性の検出は上記の方法によった。

【0103】その結果、抗ニューロトニン抗体は、Isaacs症候群患者から5名中4名、非Isaacs症候群の末梢神経障害患者30名から7名が検出されたが、健常者 (8名) からは、抗体は検出されなかった。図11にその一部の結果を示す。抗体が検出された患者血清について、Isaacs症候群患者では、陽性の4名は、いずれもニューロトニンのC末端側に対する抗体であり、非Isaacs症候群の末梢神経障害患者でも、陽性の上記7名は同様であつ

たが、他に2名においてニューロトニンのN末端側部分に対する抗体がさらに検出された。

【0104】

【実施例5】マウスゲノムのハイブリダイゼーションクローニングによるニューロトニンコードcDNAの検出ライブラリーとして、マウス肝臓由来のMouse Genomic Library (Clontech社)を使用し、プローブには、上記ヒトニューロトニンcDNAの完全長配列を使用した。プローブは、放射性同位元素³²PによりBca BEST Labeling Kit(Takara社)を用いて標識した。ファージDNAは、Gene Screen Plus (Du Pont社)に1プレートにつき2枚ずつ写し取り、標識したプローブと反応液(1M NaCl, 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 10% Dextran, 100g/ml salmon sperm DNA)中にて、一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの終了後、フィルターは、2X SSC (Standard Saline Citrateの略、0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウムpH 7.2を意味する)で室温で2回、2X SSC / 1%SDSで65

で2回、0.1X SSCで室温で2回洗浄した後、オートラジオグラフィにより、ポジティブブランクを検出した。同様の条件下でセカンドおよびサードスクリーニングを行い、ポジティブブランクをイメージアナライザー(Fujix社)を使用して検出し、単離した。

【0105】解析に用いたファージDNAは、Wizard™ Lambda Preps DNA Purification System (Promega社)を用いて精製した。その結果、9個のポジティブクローンが得られた。

・サザンブロット解析

ハイブリダイゼーションクローニングにより得られた9個のポジティブクローンが、開始メチオニンに相当するATGを含む領域を含有しているかを調べるため以下の分析を行った。

【0106】精製したゲノムファージDNA 1ngを制限酵素SacIで消化し、0.5%アガロース電気泳動法により分離した。ゲルはエチジウムブロマイド染色し、ゲノムDNAが消化されたことを確認した後、プロットティングストーン法により、アルカリ性緩衝液(0.4M NaOH, 0.6M NaCl)にて一晩かけてゲル中のDNAをフィルター上にトランスファーさせた。50mM NaOH, 1M Tris-HCl(pH 8.0)で中和したフィルターは風乾後、プレハイブリダイゼーション溶液(1% SDS, 1M NaCl, 10% Dextran)に浸したフィルターは、65にて30分間、プレハイブリダイゼーションを行った。

【0107】次に、ニューロトニンのcDNAの開始メチオニンに相当するATGを含む領域およびその近傍配列を特異的に認識するプローブを、放射性同位元素³²PによりBca BEST Labeling Kit(Takara社)を用いて標識した。このプローブと100g/ml salmon sperm DNAを先ほどのプレハイブリダイゼーション溶液に加えて、65にて一晩ハイブリダイゼーションを行った。*50

*このハイブリダイゼーションの終了後、フィルターは、2X SSCで室温で2回、2XSSC / 1%SDSで65で2回、0.1X SSCで室温で2回洗浄した。その後、フィルターをイメージングプレートに感光し、ポジティブブランクをイメージアナライザー(Fujix社)を使用して検出し、単離した。

【0108】その結果、上記9クローンのうち、3クローンに開始メチオニンに相当するコドンATGを含む5'領域が存在することが判明した。すなわち、一つのクローンに約2kb、二つのクローンに約7kbのバンドが検出された。これら3つのクローンは、5'の上流領域を含んでいるゲノムDNAであることが判明した。

【0109】

【実施例6】マウスcDNAの単離

マウスゲノムのハイブリダイゼーションクローニングによりマウスニューロトニンをコードするcDNAを以下のようにして得ることができる。ライブラリーとして、マウス胎児由来のMouse Embryo Lambda cDNA Library (STRATAGENE社)を使用し、プローブには、上記ヒトニューロトニンcDNAの完全長配列を使用した。プローブは、放射性同位元素³²PによりBca BEST Labeling Kit(Takara社)を用いて標識した。ファージDNAは、Gene Screen Plus (Du Pont社)に1プレートにつき2枚ずつ写し取り、標識したプローブと反応液(1M NaCl, 1% SDS, 10% Dextran, 100g/ml salmon sperm DNA)中にて、65で8時間反応させた。フィルターは、2X SSCで室温で2回、2X SSC / 1%SDSで65で2回、0.1X SSCで室温で2回洗浄した後、オートラジオグラフィにより、ポジティブブランクを検出した。同様の条件下でセカンドおよびサードスクリーニングを行い、ポジティブブランクをイメージアナライザー(Fujix社)を使用して検出し、単離した。

【0110】解析に用いたファージDNAは、Wizard™ Lambda Preps DNA Purification System (Promega社)を用いて精製した。その結果、1個のポジティブクローンを得た。精製したゲノムファージDNA 1を制限酵素EcoRI, XhoIによって切断した後、インサートを切り出した。インサートは、さらにクローニングベクター、pBluescriptIIのEcoRI, XhoI部位にサブクローニングした。これによりマウスニューロトニンをコードするcDNAを得ることができた。cDNAの塩基配列の解析は、ABI PRISM377 DNA Sequencing System (Perkin Elmer社)により配列を決定した。

【0111】解析された塩基配列をアミノ酸配列に変換したところ、開始メチオニンを含んでおり、ヒトニューロトニンの核酸塩基配列と85%以上の配列相同性があることが判明した。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ヒトニューロトニン・コーディングcDNA (short) のヌクレオチド配列を示す。

【図2】図2は、ヒトニューロトニン・コーディング cDNA (long) のヌクレオチド配列を示す。

【図3】図3は、マウスニューロトニン・コーディング cDNA (short) のヌクレオチド配列を示す。

【図4】図4は、マウスニューロトニン・コーディング cDNA (long) のヌクレオチド配列を示す。

【図5】図5は、ヒトニューロトニン (short) のアミノ酸配列を示す。

【図6】図6は、ヒトニューロトニン (long) のアミノ酸配列を示す。

【図7】図7は、マウスニューロトニン (short) のアミノ酸配列を示す。

【図8】図8は、マウスニューロトニン (long) のアミノ酸配列を示す。

【図9】図9は、ウェスタンブロッティングによるニュー

*ーロトニンの検出および分子量の推定を示す写真である。NB-1神経細胞とともにラット(PC-12)の結果も示す。

【図10】図10は、ウサギにヒトニューロトニンを免疫することによる末梢神経障害の誘発を示す写真である。ニューロトニンによる免疫前後のウサギの後肢の変化を示す。免疫後の後肢は、痺れて歩行障害を呈している。

【図11】図11は、ニューロトニンによる免疫によるウサギの筋肉組織異常を示す写真である。

【図12】図12は、ヒトニューロトニンを用いて、ヒト血清中のニューロトニン抗体を検出した結果を示す写真である。anti human IgM-HRPは、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合-抗ヒト・免疫グロブリンMを意味する。

【図1】

【図2】

ヒトニューロトニン cDNA (Short)

ヒトニューロトニン cDNA (Long)

TGACAGAAGGAGAAAGAAATGAAGCGAGTTTTTCAGTATCCAAAGCATAAGAGCCAGCAAGATACATTCCCTC
AAGTGTCCAGAAATTTCCAAATTCAGACGACAAAGTAGCACTGATTGGAATTCAGAAATGTCAAATGAAGAAATTAAG
CGAATGCTTAATGAACCTTTAGAGGAGGTAGAA
(firstmet.) ATGTTAAAACCTCAACTTCAGCGCATCTCAAAGACAACCTCAGAGGTAAAGAGGAAGCATTGAAAAT
TCTTCAAAGCATGGCAATACTGGCCAAAGCCACAGTTCATACCGCAGGAGTCTTCAAAAACCTATGGAACAAAAC
AGATCCTTCGAGAAGGAAATAAATGCCTTCGATGGGAAATAGAATTTGATCATAATAGATTTAAAAATATAGAGG
AATCTGGATCCAAAATATGACAGGCTAAACTGTGAAAATGCACTCTCAAAGAGAATTTGAAAGTAAAACAGAGA
AGAAAATAAAATGCTGAAGTCTGCAATCGAGTTTGAATCAACGGATTTGGAGGCCCTGCCATGCTTGATATC
AAACAGCAGAAGATGGCTCAGAAAACATGTGCTGTGATAAAAGTGGCTTTGCAGAGGCTTCAGGCTTGAGCTTG
CGGTCCTCGGAGCCTGCTTTGTGATGCGCCCGGAGGGAACCCCTGTTCTTGTGCCAGAATGGCAGCATCCACTCG
GAACTGCTTTCCAGCTCAAACAAGAGTTGGAATTTTGCAGAACAGTAAAGAAAGCTTACGTGATGGCAGAT
GCTTTCAGAATTCGATTTGAGCAACAATTAATGACAAAATAAGCAGGCACTACAATTTGACACAAATGATAAAA
TGCAATAAAAAGCAACAAATGATGAATTTGAAAGCAGCTTAAAGAGGATGGATTTCCATCACCAGGAGTAAAGAA
GACCTTCGGGAGAGACTGTTGGTATGCTCCCTTCAGAAAACAGTCTAAGAGGATGGAAGCAGCAGGACAGTCT
CAAGAGGCTCTTAAGATGCTCATAGATTTGCTTAATGATAAAGAAAGAGCTTTGGCTCATCAAAGAAAGTTAGCT
ACAATGCTTGTCTCGGCAATGGAAGCAAGACACTGCTTCAAAGCAGAAATAAAGAAAATAATCCTATAAAAAGCAAA
TTTCCCTTCAACAACCCCTGGCGTAAGACTTCAGAAATCTCTGTTTTGGGTGATCCTATAGATTCAAGTGTCTG&
ATTTAAATCTGTGGGTCGATTTGTTCAATCCAGCACTCTCAAATAGATCCAAACTATAGAATCTTAAAAGAT
CCCATTCTTGCATCAAGTATCATATTTAA

GAGCTGGAGTCCGGCTCCGGTCCCTCCACGGACCTTGAGAGGTTACCCGGGTGAGACCTGGCAGACAGCCCAT
TTTTCTTATGATAAAGACGGCATTGGCTC
(firstmet.) ATGAGCAAGGTGGCAAGATCATCAAGTGACTCAGACATGCAGCTCTGGGAAACAGAAGAGGATGA
CATCAGCAAGGTCATTTAGGCTATGGCTCGGAAGGAAACCTGGTGGGATTTATGAAATAGAAATTTCCACATAGG
TCTAGAAAAGATCAGATGGAAGAAGCTTTAGCCCTCCTCCATTTCCGAAAGGGGAAAGAAAGAAATGAAGGGA
GTTTTTCAGTATTCAGCATAGAGCCAGCAAGATACATTCCTCAAGTGCACAAATTTCCAATACAGAGCAGCA
AAGTAGCACTGTAGATTCGAATTCAGAAATGTCAAATGAAGAATTAAGGCAATGCTTAAATGAAACTTTAGAGGAG
GTAGAAATGTTAAAACCTGAACTTGAGGATCTCAAAGACAACCTCAGAGGTAAGAGGAAGCAATGAAAATTCCTC
AAAGCATGGCAATACTGGCCAAAGCCACAGTTCATACCGCAGGAGTCTTCAAAAAACCTATGGAACAAAACAGATC
CTTGGAGGAAGAAATAAATGCTTCAGTGGGAAATAGAATTTGATCATAATAGATTTAAAAATATAGAGGAACTC
TGGATCCAAAATATGACAGGCTAAACTGTGAAAATGCAAGCTCTCAAAGAGAATTTGAAAGTAAAACAGAGAAA
TTAAAATGCTGAAGTCTGACAATGCAAGTTTGAATCAACGGATTTGGAGGCCCTGCCATGCTTGATATCAAACA
GCAGAGATGGCTCAGGAAAACATGTGCTGTGATAAAGTGGCTTTGCAGAGGCTTCAGGCTTCGAGCTTGGGTC
CTCGAGGCTGGCTTTGTCATGGGCGGAGGGAACCCCTGTTCTTGTGCCAGAAATGGCAGCATCCACTGGGAAAC
TGCTTCTTCAGCTCAAACAAGAGTTGAAATTTTGCAGAGAGATAAAGAAAGAAAGCTTACGTGATGGCAGATGCTT
CAGAATTCATTTGAGCAACAATTAATGAGAAAATAAGCAGGCACTACAATTTGACACAAATGATAAAAATGCAAT
AAAAAGCAACAAATGATGAATTTGAAAGCAGCTTAAAGAGGATGGATTTCCATCACCAGGAGTAAAGAAAGCCT
TCGGGAGAGACTGTTGGTATGCTCCCTTCAGAAAACAGTCTAAGAGGATGGAAGCAGCAGGACAGTCTCAAGA
GCTTCTTAAGATGCTCATAGATTTGCTTAATGATAAAGAAAGAAAGCTTTGGCTCATCAAAGAAAGTTAGCTACAT
CTTCTCGGGCATTGGAAGCAAGAGACTGCTTCAAAGCAGAAATAAGAAAATAATCCTATAAAGAGAAATTTCC
CTTCAAACAGCCCTGGCGTAAGACTTCAGAAATCTCTGTTTTGGGTGATCCTATAGATTCAAGTGTCTG&ATTT
AAATCTGTGGGTCGATTTGTTCAATCCAGCACTCTCAAATAGATCCAAACTATAGAATCTTAAAAGATCCCAT
TCTTTCCATCAAGTATCATATTTAAAGCAAGCCAGTGAATGGAAGTGGAGTGTGTTATATCGAGATACT
TTGAAAATCATTTGTAATTTTGGTGCATCTTGAGAAAGTGTGATGTTCTAGTATTTGTAATTTTAGGAGG
TCACATTAATCAAAATTTCTACATTTCTTTCTTTCTTTCTTTGATGGAAGTGTGCTGTGTCACCCAGGTTGGA
GTGAGTGGTGTGATCTGGTTCAGTGCACCTCCGCTCCCGGTTCCAGGCAATTTCTCTGCTCAGCCTCCGAG
TGACTCGGATTACAGGCATGTCATCTACTAAAATAAACAATAATGGCTGGGCTAGTGGGCTAGCTGTA
ATCCAGCTGCTTGGCAGGCTGAGGTAGGAGAGTCCCTTAGCCTGGGAGGCGGGGTTGTTGGTACGCGCAGACTG
TGTCATTGCACTCCAGCCTGGGCAAGAGCGAAACTGTGCTCAAAAATAAATAAACAACATACAGTGTGTT
GCCAATCCTAAAACATAAATAATGATTTTGGGAAAACAAAATAATTTAACTATTTGATTTGATGATAG
GGATCTTAGCTTGGCAATCACAATAAGCAATGATCTTAATGCTCTAAAAGTAACAATACCTAGGACTGAC
TGAATGTTAAATTTCTGGAATTCATTTATCTGTTTTATTTGCTTGTTCAGTATTTTCTATTACCATATGAAGTT
TAGAATAAACAATTTCTTAAGTTAACTCAAATAAGACAGTTTGTGTTGGGACCTTGGCAGAGTATATGAGT
CAGTCCCGCTGCTTTCATGGCTCTTGTGACGGGTAGTACGATTTTGCACCAAAATCTGCACAGATTTGATGCCAA
GTCTCAAACTGCTTAACAGCTCTTTTCATGTCATCTGTGAGATGTTGTTGATGATCAGGAAATGGGCTCTCAG
GAATCTGAAGAGCTCCCTCAGCCAGGTCATTTCTAGGAGTTTTTGTGTTGGTGTGATGTAATGGGCTGTG&
GGCTGGGCTGTGCTGTAGCAGGCTCCCACTGTGTTGCTCAGGCTGCTCCCAACT

【図5】

ヒトニューロトニン (Short) アミノ酸配列

MLKTELEASQRQLRKKEEALKILQSMALIKGKATSHTQAVLQKTMENRSLXELIHALQWEIFDHNRFRKNI EESWI
QKYDRNLNENAVLKENLKVKTEEIKMLKSDNAVLRQLYLEALMLDIKQKQMAQENMCCDSGFAEASGLELAVLG
ACLCHGPGNPCSARMAASTRKLILLQLKQLEILIQKSEEAAYWADAFRI AFEQQLMRKNDQALQLTQMDKMKK
ATKWNMKHLKEDGFPSPRKKTFQRLLGMLPSENSKRMEDQSPQEVKMLIDLNDKEEALAHQKVSYMLA
RALEDKDTASMENKEKNPIKENFPFNPRKRTSEFVSLGDP IHSYVCLINSVGCICS IHSQSDPHYRTLKRSHSL
PSSIIIF*

【図3】

マウスニューロトニン cDNA (Short)

```

TGACCGAAGGGAGAAGAAGCAAGCCAAACAGTTCCAGTATTCAGGAGGAAGGGCTTCAAGATACAAGCGCTG
AGGGATACCGAGCATCCAGACTGAGCAGCACAGATTTAACTCAGAATTTGTCGGATCAGCAGTTAAGGGCAGCTCT
TCATGAAGCCTTAGAGGACGTAGAGATTTAAAAACGGAACTTCAAGCGCTTCAAAAGACAACCTTGAAGTAAAG
GAAGCATTGAAAATCCTCCAAAGC
(firsmet.) ATGGCAATGCTTGGCAAGCCACAAGCCACACACAGACAATGCTTCAAAAACTATAGAACAAA
CAGATCTCTGGAGAAGGAAATAAATGCCTTGCAGTGGGAAATGGAATTTGATCAGGATAGATTTAAAAATATAGAA
GAACTCTGGATCCAGAAATGACAGCCTAACTGTGACAAATGCACTCAGAGAGAATCTGAAGTTGAGAACAG
AGGAAATAAGATGCTAAAGCTAAGAATGCTGTTTTGAATCAGCGTACTTGGAGGCCCTGGCATGCTTGATAT
CAAGGAGCAGAAGATGGGTGAGGAGAGAGTGGCTTACAGATGATCAGGCTCGAGCTTGGAGTCTTGGAGCC
TGCTGTGTCATGGCTGGAGGGAGCCCTGTCTTGTGCCAAAATGGCAGCATCCACTGGGAACTGGTCTTCT
AGCTCAGACATGAGTTGCAAACTCTCCAGAAGAGTAGGAAGAGGGCCACATAACGGCAGATGCATTCAGGATTC
TTTTGAGCAACAGTTAATGAGGAAAATGAGCAGGCACTGAGACTGGCTGGAGGGGACCTGTGTAAAAAAGCGGCA
ACCGTGGATCAACAGACAACACCCAGBAGCAGCATGGATATCCGGCACAAGAGGAAAGAGAACCTTTNTGGNTNA
GATTAAGTGGGATACTCCCTCGGAAAACAGCTCAAGGGCCCTGAAGCCAGCAAGCAATATGCAAGAGGCTTTAA
GATGCTGTAGATTTGTTGAATGACAAAGAAGAGCCCTTGACATCAGAGAAAGGTTAGTTACATGCTCGCTGG
GGCTGGAAGACAAGACAGCCGCTCAGAAGGAATAAAGAAAAATCCCCATGAGCCAGACCTTCCCATCAAAA
CGGCTGGCAGGAGCTTACAGACTCTGTGCTTGGCTGATCCAGTACAGTGAACCATGTTTCTGAAGCCATGGC
TTGCATCTGTTCAATACAGCATCTCCAAAAGTTTACAGACTGGCCAAAGACTTTAAAAGATCTGTTCTTTGCCA
TCAACTTTATTTACAAGTAA

```

【図4】

マウスニューロトニン cDNA (Long)

```

TGAGGGAGGAGGCTGAGTGTCCAGCAGCTCCCTGGGACCGACATTTGGCTA
(firsmet.) ATGAGCAAAGTGGCAGGTTCATCGAGGAGGGCAGAGACATCTGGAAAACAGAGGATGACATGAC
CGAAGGTGACCTAGGCTATGGCTCGGAAGAAAACCCGGTGGTATTTATGAAGTTCCGTGTTCCATACATCTAAG
AAAAGTTCAGTGGAAAAGCACTCAAGCCCTCCCTCCGTTTCAAGAAAAGGGAGAAGAAGCAAGCCAGTTTCC
AGTATTCAGGAGGAGGGCTTTCAAGATACAAGCGCTGAGGATACCGAGCATCCAGACTGAGCAGCACAGATTC
TAAGTCAAGATTTGCGGATGAGCAGTTAAGGGCAGCTTCTGATGAAGCCTTAGAGGACGTAGAGATTTAAAAACG
GAACTTGAAGCGCTTCAAAAGACAACCTTGAAGTTAAGAGGAAGCATTGAAAATCCTCCAAAGCATGGCAATGCTG
GCAAGCCACAAGCCACACAGACAATGCTTCAAAAACTATAGAACAAAAGAGATCTCTGGAAAGCAAAATAAA
TGCCCTTGCAGTGGAAAATGGAATTTGATCAGGATAGATTTAAAAATATAGAAGAACTTGGATCCAGAAATGTGAC
AGGCTAACTGTGACAATGCAGTCTCAGAGACAATCGAAGTTGAGAACAGAGGAAATAAGATGCTAAAGTCTA
AGAACTGCTGTTTTGAATCAGCGTACTTGGAGCCCTGGCCATGCTGATATCAAGGACGAGAAGATGGCTCAGGA
GGAGAGTGGCTTTACAGATGATCAGCTCAGCTTGGAGTCCCTGGAGCCTGGCTGTGTGATGGTCTGGAGGG
AGCCCTGTTCTTGTCCAAAATGGCAGCATCCACTCGGAACTGGTCTTTCAGCTCAGCATGAGTGGAAAATC
TGCAGAAAGTAGAAGAGAGGGCCACATAACGGCAGATGCAATCAGGATGCTTTGAGCAACAGTTAATGAGGAA
AAATGAGCAGGCACTGAGACTGGCTGGAGGGGACCTGTGTAAAAAGGGCAACCGTGGATCAACAGACAACACCC
AGGACAGCATGGATATCCGGCTACAAGGAGAAAGAGACCTTAGGGCAAGATTAAGTGGGGTACTCCCTCGG
AAAAAGCTCCAAGGGGCTGAAGCAAGACAATATGAAGAGGCTTTAAGATGCTGGTAGATTTGTTGAATGA
CAAGAAAGAGCCCTTGACATCAGAGAAAGGTTAGTTACATGCTGGCTGGGCGCTGGAAGACAAGAGACGGCC
TCAGAAAAGAAATAAGAAAAAATCCCCATGAGCCAGACCTTCCCATTCAAAACGGCCCTGGCAGGAGCTTCAAGC
TCTGTGCTGCTGATCAGTACAGTCAACCATGTTTCTGAAGCCATGGCTTGCATGTTCAATACAGCATCC
TCCAAAAGTTTCAAGTCCCAAGAACTCTAAAAGATCTGTTCTTGGCATCAACTTATTTACAAGTAAAC

```

【図6】

ヒトニューロトニン (Long) アミノ酸配列

```

MSKVARSSSEDMQLWETEDDMTEGDLGYLGRKPGGIYEIEFHSRKRKSDGKNSPPFPFRKGEERNEASFQY
SKHKSQDTPQVSRISNYRRQSSVDSNSELNSELRLQQLNETLEEVMLKTELEASRQLRQKEALKILQSMAL
ILGKATSHTQAVLQKTMENRSLKEIEINALQWEIEFDHRRFKNIEESWIKYDRNLNENAVLKENLKVKTEEIKML
KSDNAVLNQRYLEALAMLDIKQKMAQENMCCDSKGFASGLELAVLGAQLCHGPGGNPCSCAKMAASTRKLQLLQ
LKQLEILQKSKEEAYVMAAFRIAFEQQLMRKNDQALQLTQMDKMKKATKMNWIKHLKEDGFSPRSKKTFGQR
LLGMLPSENSSKRMEDQSPQEVKMLIDLLNDKEEALAHQRKYSYMLARALEDKDTASERNKEKIKENFPFNH
PWRKTSEFSVLDGPIHSSVCLINSVGCISIQHSQIDPNYRTLKRSHSLPSSIIF*

```

【図7】

マウスニューロトニン (Short) アミノ酸配列

```

MAMLGKATSHTQMLQKTEIQRSLKEIEINALQWEMEFQDRFKNIEESWIKQCDRLNCDNAVLENLKLRTTEEIK
MLKSKNAVLNQRYLEALAMLDIKQKMQQEEESGFTDVSGLLEAVLGAQLCHGPGGSPCSAKMAASTRKLVLQLRH
ELETLQKSKEEAIHITADAFRIAFEQQLMRKNEQALRLAGDLCKKAATVQQTTFRQTMDIRHKGERRPXXRLLG
ILPSENSSKGAEDQDNMQEVFKMLVDLLNDKEEALAHQRKYSYMLARALEDKDTASERNKEKIPMSQTFPFKTAWH
DASELGLRDPVQSNHVSEPMACICSIQHPPKYSDCPRTLKRKCSLPSLTFYK*

```

【図8】

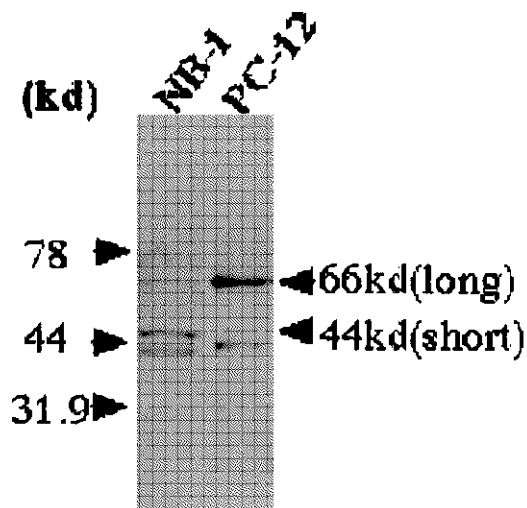
マウスニューロトニン (Long) アミノ酸配列

```

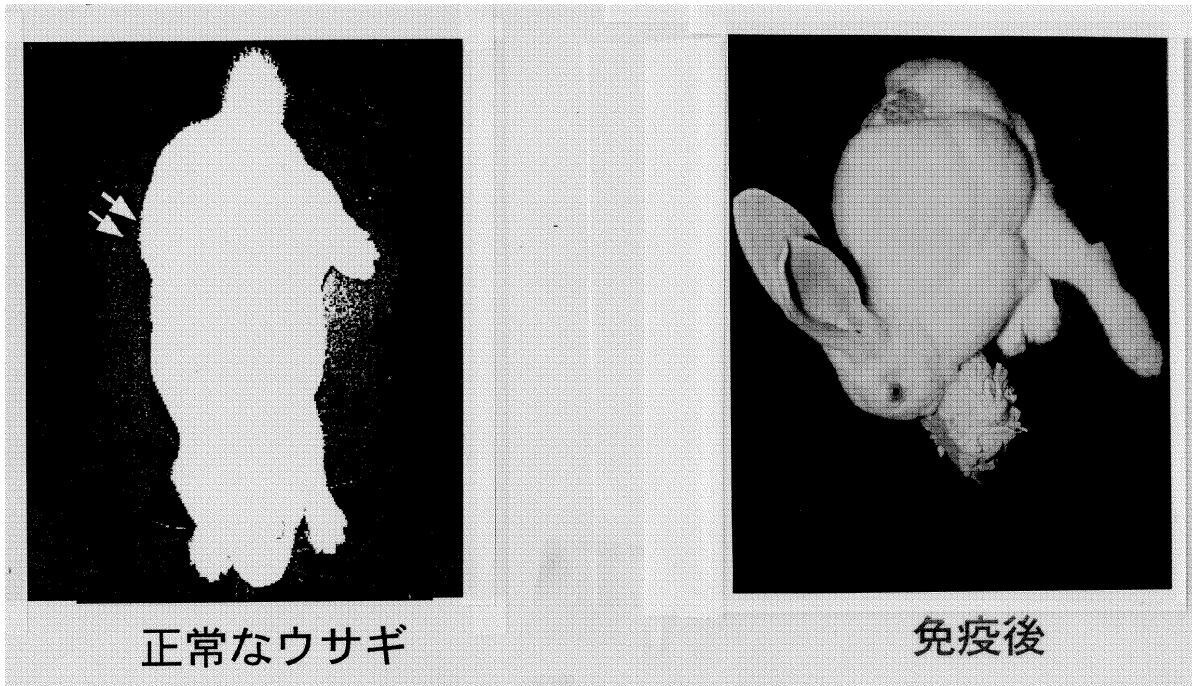
MSKVPRSSSEAEIHWETEDDMTEGDLGYLGRKPGGIYEVPCSISKKSRSKNSPPFPFRKGEERSETSFQYSR
RKGFDQTSAEGRASRLSSDVSSELNSELRLRRLHEALDVEILKTELEASRQLRQKEALKILQSMAMLGKAT
SHTQMLQKTEIQRSLKEIEINALQWEMEFQDRFKNIEESWIKQCDRLNCDNAVLENLKLRTTEEIKMLKSKNAV
LNQRYLEALAMLDIKQKMQQEEESGFTDVSGLLEAVLGAQLCHGPGGSPCSAKMAASTRKLVLQLRHELETLQKS
KEEAIHITADAFRIAFEQQLMRKNEQALRLAGDLCKKAATVQQTTFRQTMDIRLQRKKTLLGRLGILPSENSS
KGAEDQDNMQEVFKMLVDLLNDKEEALAHQRKYSYMLARALEDKDTASERNKEKIPMSQTFPFKTAWHDASELGL
RDPVQSNHVSEPMACICSIQHPPKYSDCPRTLKRKCSLPSLTFYK*

```

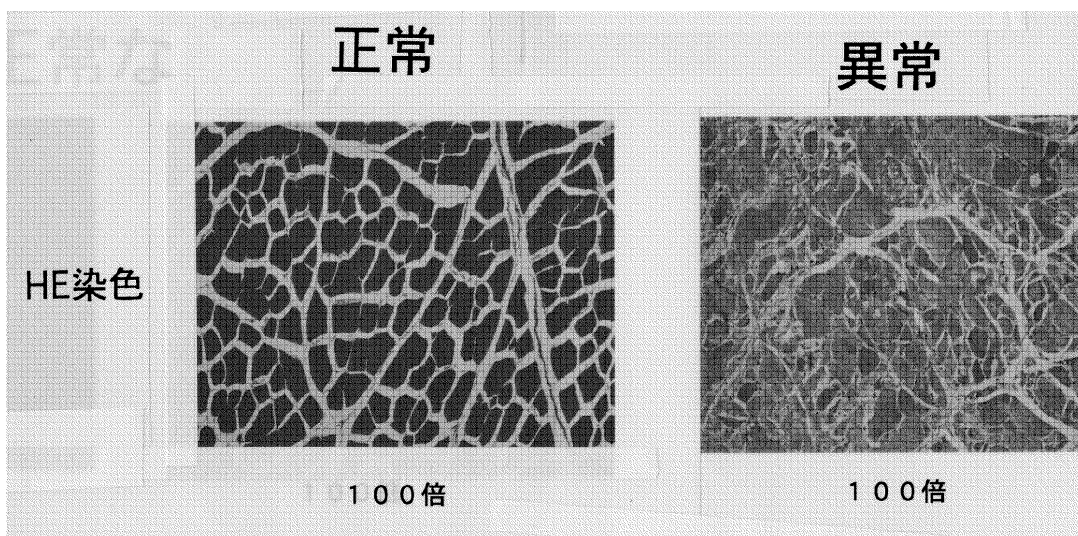
【図9】



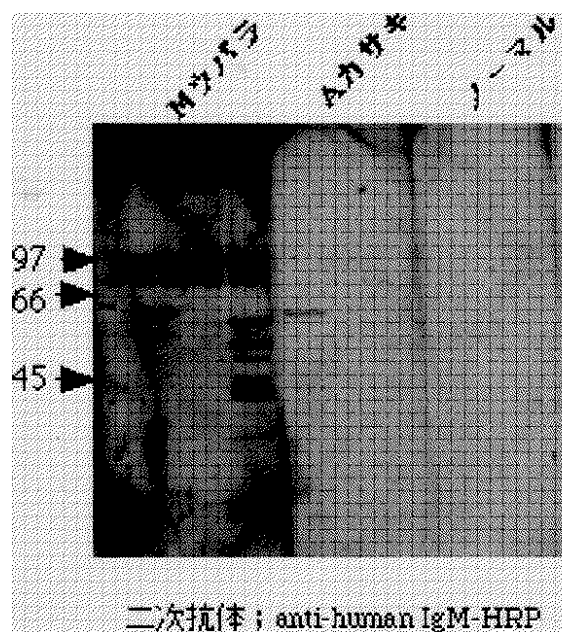
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)	
A 6 1 M 1/36	5 4 5	A 6 1 P 25/02	4 B 0 6 5	
A 6 1 P 25/02		C 0 7 K 14/47	4 C 0 7 7	
C 0 7 K 14/47		16/18	4 C 0 8 4	
		19/00	4 C 0 8 5	
C 1 2 N 1/15		C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5	
		1/19		
		1/21		
		9/00		
		5/10	C 1 2 P 21/08	
		9/00	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/15		Z
C 1 2 Q 1/04			33/50	Z
G 0 1 N 33/15			33/53	D
			33/566	
			33/577	B
			C 1 2 N 15/00	Z N A A
			5/00	A

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA34 AA35 AA40
BB06 BB20 CA25 CB01 CB17
CB21 DA12 DA13 DA14 DA36
DA77 FB02 FB03
4B024 AA01 BA43 BA61 CA01 CA04
CA07 EA06 GA11 HA12 HA15
4B050 CC03 DD07 DD11 LL01 LL03
4B063 QA01 QA08 QA19 QQ08 QQ79
QQ96 QR48 QR56 QS33 QX02
4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA91Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA25 CA27 CA44 CA46
4C077 AA12 BB01 KK13 MM04 MM09
NN04 PP01
4C084 AA17 NA14 ZA202
4C085 AA03 BB11 CC03 CC08 EE01
EE06 FF02 GG03 GG08
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40
DA76 DA86 EA21 EA50 EA61
FA74 HA06

专利名称(译)	Neurotonin及其用途		
公开(公告)号	JP2002233383A	公开(公告)日	2002-08-20
申请号	JP2001034217	申请日	2001-02-09
申请(专利权)人(译)	株式会社口コモジェン		
[标]发明人	中島利博		
发明人	中島利博		
IPC分类号	A01K67/027 A61K39/00 A61K45/00 A61M1/34 A61M1/36 A61P25/02 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/04 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P25/02 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2500/00		
FI分类号	A01K67/027 A61K39/00.H A61K45/00 A61M1/34.500 A61M1/36.545 A61P25/02 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12P21/08 C12Q1/04 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61M1/34.100 A61M1/36.165 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB06 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA43 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/EA06 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC03 4B050/DD07 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4C077/AA12 4C077/BB01 4C077/KK13 4C077/MM04 4C077/MM09 4C077/NN04 4C077/PP01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA202 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC08 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/GG03 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/EA61 4H045/FA74 4H045/HA06		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：指定引起艾萨克斯综合征过度兴奋的物质，并建立诊断/治疗疾病的有效方法。解决方案：使用来自Isaacs综合征患者的血清，通过免疫筛选技术从源自神经细胞的cDNA文库中分离特定的cDNA。阐明了其核苷酸序列，并通过基于序列的克隆获得了新的蛋白质神经调节素，并测定了其氨基酸序列。这种新蛋白质被认为是艾萨克斯综合征的关键物质，可用于研究外周神经元疾病和临床应用。

