

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-534255

(P2017-534255A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B065
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4C084
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 176 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-513737 (P2017-513737)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月11日 (2015.9.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月8日 (2017.5.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/049674
 (87) 国際公開番号 WO2016/040794
 (87) 国際公開日 平成28年3月17日 (2016.3.17)
 (31) 優先権主張番号 62/050,045
 (32) 優先日 平成26年9月12日 (2014.9.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507373324
 ホワイトヘッド インスティテュート フ
 ォー バイオメディカル リサーチ
 アメリカ合衆国 02142-1479
 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メイ
 ン ストリート 455
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポリポタンパク質Eを発現する細胞及びその使用

(57) 【要約】

シグナル配列とヒトApoEタンパク質とを含むポリペプチドを発現する酵母細胞が開示される。いくつかの実施形態では、当該ポリペプチドはApoE2を含む。いくつかの実施形態では、当該ポリペプチドはApoE3を含む。いくつかの実施形態では、当該ポリペプチドはApoE4を含む。ApoE誘導性毒性を予防または抑制する化合物を同定するために酵母細胞をスクリーニングする方法も開示される。そのようなスクリーニングによって同定された化合物は、アルツハイマー病などの神経変性障害を治療または予防するために使用することができる。ApoE誘導性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子を同定するために酵母細胞をスクリーニングする方法も開示される。当該方法を使用して同定されたApoE誘導性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子及びそのヒト相同体も開示される。ApoE誘導性毒性の修飾遺伝子の発現または活性を調節する化合物を同定する方法も開示される。

ApoE comes in three isoforms that differ at 2 AA positions

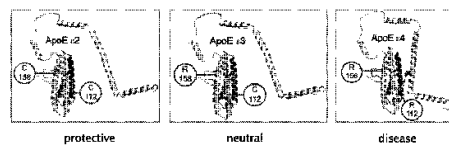


Fig 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト A p o E タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞であって、前記細胞における前記核酸の発現及び前記ポリペプチドの産生が、前記細胞の増殖または生存能力の低下をもたらす、前記酵母細胞。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、シグナル配列とヒト A p o E タンパク質とを含む、請求項 1 に記載の酵母細胞。

【請求項 3】

前記核酸の発現及び前記ポリペプチドの産生により、前記細胞が生存不能となる、請求項 1 または請求項 2 に記載の酵母細胞。

【請求項 4】

前記発現構築物が、前記酵母細胞のゲノムに組み込まれている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 5】

前記発現構築物が、組込み型プラスミドである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 6】

前記組込み型プラスミドが、p R S 3 0 3、p R S 3 0 4、p R S 3 0 5、p R S 3 0 6、またはそれらの誘導体である、請求項 5 に記載の酵母細胞。

【請求項 7】

前記プロモーターが、誘導性プロモーターである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 8】

前記誘導性プロモーターが、G A L 1 - 1 0、G A L 1、G A L L、またはG A L Sである、請求項 7 に記載の酵母細胞。

【請求項 9】

前記酵母が、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ウバエ (*Saccharomyces uvae*)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・クルイベリ (*Pichia kluyveri*)、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、カンジダ・スピーシーズ (*Candida sp.*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・ユティリス (*Candida utilis*)、カンジダ・カカオイ (*Candida cacaoi*)、ゲオトリクム・スピーシーズ (*Geotrichum sp.*)、またはゲオトリクム・フェルメンタンス (*Geotrichum fermentans*) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 10】

薬物排出または細胞透過性に関与するタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子が破壊されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が、P D R 1、P D R 3、P D R 5、S N Q 2、またはE R G 6 である、請求項 10 に記載の酵母細胞。

【請求項 12】

前記シグナル配列が、天然の酵母タンパク質のシグナル配列と同一である、請求項 1 ~

10

20

30

40

50

1 1 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 1 3】

前記シグナル配列が、酵母 K a r 2 p シグナル配列と同一である、請求項 1 2 に記載の酵母細胞。

【請求項 1 4】

前記ヒト A p o E タンパク質が、A p o E 2 である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 1 5】

前記ヒト A p o E タンパク質が、A p o E 3 である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

10

【請求項 1 6】

前記ヒト A p o E タンパク質が、A p o E 4 である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 1 7】

前記発現構築物を少なくとも 2 コピー含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 1 8】

前記発現構築物を少なくとも 3 コピー含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 1 9】

前記発現構築物を少なくとも 4 コピー含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

20

【請求項 2 0】

前記核酸が、ヒト A p o E タンパク質と検出可能なマーカ-とを含むポリペプチドをコードする、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 2 1】

前記核酸が、ヒト A p o E タンパク質と蛍光タンパク質とを含むポリペプチドをコードする、請求項 2 0 に記載の酵母細胞。

【請求項 2 2】

前記ポリペプチドが、S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2、または S E Q I D N O : 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

30

【請求項 2 3】

前記ポリペプチドが、S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2、または S E Q I D N O : 3 の配列に融合している S E Q I D N O : 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 2 4】

前記ポリペプチドが、S E Q I D N O : 8、S E Q I D N O : 9、または S E Q I D N O : 1 0 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

40

【請求項 2 5】

シグナル配列とヒトアミロイド タンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモ-ターを含む発現構築物をさらに含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 2 6】

前記酵母細胞が、シグナル配列と、野生型アミロイド 1 - 3 8、野生型アミロイド 1 - 3 9、野生型アミロイド 1 - 4 0、野生型アミロイド 1 - 4 1、野生型アミロイド 1 - 4 2、及び野生型アミロイド 1 - 4 3 からなる群より選択されるヒトアミロイド タンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモ-ターを含む発現構築物をさらに含み、任意で、前記アミロイド タンパク質が、A 2 T、H

50

6 R、D 7 N、A 2 1 G、E 2 2 G、E 2 2 Q、E 2 2 K、D 2 3 N、A 4 2 T、及び A 4 2 V からなる群より選択される突然変異を含む、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 2 7】

シグナル配列とヒトアミロイド タンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む前記発現構築物が、(i) 組み込み型プラスミドであるか、(i i) 前記酵母細胞のゲノムに組み込まれているか、(i i i) 誘導性プロモーターを含むか、(i v) GAL 1 - 1 0、GAL 1、GALL、及び GALS から選択される誘導性プロモーターを含むか、(v) 前記細胞において少なくとも 1、2、もしくは 3 コピー存在するか、(v i) 酵母シグナル配列を含むか、(v i i) 酵母 Kar 2 p シグナル配列を含むか、または(v i i i) (i) ~ (v i i) の任意の組み合わせである、請求項 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

10

【請求項 2 8】

前記細胞において、過剰発現されると Apo E 媒介性毒性を抑制または増強する酵母遺伝子の遺伝子産物の発現または活性が上昇もしくは低下している、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の酵母細胞。

【請求項 2 9】

前記核酸が、ヒト Apo E 2 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記細胞において、過剰発現されると Apo E 2 媒介性毒性を抑制または増強する酵母遺伝子の遺伝子産物の発現または活性が上昇もしくは低下している、請求項 2 8 に記載の酵母細胞。

20

【請求項 3 0】

前記核酸が、ヒト Apo E 3 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記細胞において、過剰発現されると Apo E 3 媒介性毒性を抑制または増強する酵母遺伝子の遺伝子産物の発現または活性が上昇もしくは低下している、請求項 2 8 に記載の酵母細胞。

【請求項 3 1】

前記核酸が、ヒト Apo E 4 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記細胞において、過剰発現されると Apo E 4 媒介性毒性を抑制または増強する酵母遺伝子の遺伝子産物の発現または活性が上昇もしくは低下している、請求項 2 8 に記載の酵母細胞。

【請求項 3 2】

以下の工程を含む、酵母細胞において毒性を誘導する方法：

30

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の細胞を提供する工程；及び

前記酵母細胞に対して毒性であるレベルの、ヒト Apo E タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸の発現を誘導する工程。

【請求項 3 3】

Apo E 媒介性毒性を予防または抑制する化合物を同定する方法であって、

候補薬剤の不在下で前記細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの前記核酸の発現を可能にする条件下にて、前記候補薬剤の存在下で、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の細胞を培養する工程；

前記候補薬剤の存在下で、細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び

前記候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、前記候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程を含み、

40

細胞増殖または生存能力が、前記候補薬剤の不在下でのものと比較して前記候補薬剤の存在下で上昇している場合に、前記候補薬剤が、Apo E 媒介性毒性を予防または抑制する化合物として同定される、前記方法。

【請求項 3 4】

Apo E 関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物を同定する方法であって、

候補薬剤の不在下で前記細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの前記核酸の発現を可能にする条件下にて、前記候補薬剤の存在下で、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の細胞を培養する工程；

50

前記候補薬剤の存在下で、細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び

前記候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、前記候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程を含み、

細胞増殖または生存能力が、前記候補薬剤の不在下でのものと比較して前記候補薬剤の存在下で上昇している場合に、前記候補薬剤が、A p o E 関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物として同定される、前記方法。

【請求項 35】

A p o E を発現する哺乳動物細胞と候補化合物を接触させる工程、及び前記候補化合物が前記哺乳動物細胞における少なくとも 1 つの A p o E 関連表現型を低減させるかどうかを判定する工程をさらに含み、任意で、前記 A p o E タンパク質が A p o E 4 タンパク質でありかつ前記表現型が A p o E 4 関連表現型である、請求項 34 に記載の方法。

10

【請求項 36】

A p o E 関連疾患のモデルとして機能する非ヒト動物に候補化合物を投与する工程、及び前記候補化合物が前記動物における少なくとも 1 つの A p o E 関連疾患表現型を低減させるかどうかを判定する工程をさらに含み、任意で、前記 A p o E 関連疾患表現型が A p o E 4 関連表現型である、請求項 34 または請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 A p o E 関連疾患が A p o E 4 関連神経変性疾患である、請求項 34 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記 A p o E 4 関連疾患が、アルツハイマー病、血管性認知障害、脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、または多発性硬化症である、請求項 34 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 39】

A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子を同定する方法であって、

請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の酵母細胞を提供する工程であって、前記酵母細胞が、遺伝子を過剰発現するように遺伝子改変されている、提供する工程；

前記遺伝子の過剰発現の不在下で前記酵母細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの前記タンパク質の発現を可能にする条件下にて、前記酵母細胞を培養する工程；

前記遺伝子の過剰発現の存在下で、細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び

前記遺伝子の過剰発現の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、前記遺伝子の過剰発現の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程を含み、

30

(i) 細胞増殖または生存能力が、前記遺伝子の過剰発現の不在下でのものと比較して、前記遺伝子の過剰発現の存在下で上昇している場合に、前記遺伝子が A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子として同定され、(i i) 細胞増殖または生存能力が、前記遺伝子の過剰発現の不在下でのものと比較して、前記遺伝子の過剰発現の存在下で低下している場合に、前記遺伝子が A p o E 媒介性毒性の増強遺伝子として同定される、前記方法。

【請求項 40】

前記遺伝子が酵母遺伝子である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記核酸が、ヒト A p o E 4 タンパク質を含むポリペプチドをコードする、請求項 39 または請求項 40 に記載の方法。

40

【請求項 42】

A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子を同定する方法であって、

請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の酵母細胞を提供する工程であって、前記酵母細胞のある内因性遺伝子が破壊されている、提供する工程；

前記内因性遺伝子が破壊されていない場合に前記酵母細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、ヒト A p o E タンパク質を含む前記ポリペプチドの発現を可能にする条件下にて、前記酵母細胞を培養する工程；

前記内因性遺伝子が破壊されている場合の細胞増殖または生存能力を測定する工程；及

50

び

前記内因性遺伝子が破壊されている場合に測定された細胞増殖または生存能力を、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合の細胞増殖または生存能力と比較する工程を含み、

(i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に上昇している場合に、前記遺伝子が、A p o E 媒介性毒性の増強遺伝子として同定され、(i i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に低下している場合に、前記遺伝子が、A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子として同定される、前記方法。

【請求項 4 3】

前記 A p o E タンパク質が A p o E 2 タンパク質であり、(i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に上昇している場合に、前記遺伝子が A p o E 4 媒介性毒性の増強遺伝子として同定され、(i i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に低下している場合に、前記遺伝子が A p o E 2 媒介性毒性の抑制遺伝子として同定される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 A p o E タンパク質が A p o E 3 タンパク質であり、(i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に上昇している場合に、前記遺伝子が A p o E 3 媒介性毒性の増強遺伝子として同定され、(i i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に低下している場合に、前記遺伝子が A p o E 3 媒介性毒性の抑制遺伝子として同定される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 A p o E タンパク質が A p o E 4 タンパク質であり、(i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に上昇している場合に、前記遺伝子が A p o E 4 媒介性毒性の増強遺伝子として同定され、(i i) 細胞増殖または生存能力が、前記内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、前記内因性遺伝子が破壊されている場合に低下している場合に、前記遺伝子が A p o E 4 媒介性毒性の抑制遺伝子として同定される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

A p o E 媒介性毒性を調節する方法であって、毒性誘導量の A p o E を発現する細胞を、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の増強遺伝子もしくは抑制遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する有効量の化合物と接触させる工程を含む、前記方法。

【請求項 4 7】

毒性誘導量の A p o E 2 を発現する細胞を、A p o E 2 媒介性毒性の増強遺伝子もしくは抑制遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する有効量の化合物と接触させる工程を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

毒性誘導量の A p o E 3 を発現する細胞を、A p o E 3 媒介性毒性の増強遺伝子もしくは抑制遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する有効量の化合物と接触させる工程を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

毒性誘導量の A p o E 4 を発現する細胞を、A p o E 4 媒介性毒性の増強遺伝子もしくは抑制遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する有効量の化合物と接触させる工程を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 0】

毒性誘導量の A p o E を発現する細胞を、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の増強遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を阻害する有効量の化合物と接触させる工程を含む方法によって、A p o E 媒介性毒性を阻害する工程を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

毒性誘導量の A p o E を発現する細胞を、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の増強遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を阻害する有効量の化合物、あるいは表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を増強する有効量の化合物と接触させる工程を含む方法によって、A p o E 媒介性毒性を阻害する工程を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

10

【請求項 5 2】

A p o E 媒介性毒性を阻害する化合物を同定する方法であって、(a) 当該細胞の生存能力を低減させる量の A p o E を発現する細胞を提供する工程、(b) 前記細胞を、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する薬剤と接触させる工程、ならびに (c) 前記薬剤の存在下で細胞生存能力を測定する工程を含み、前記薬剤の不在下での細胞生存能力と比較したときの前記薬剤の存在下での細胞生存能力の上昇によって、前記薬剤が A p o E 媒介性毒性を阻害する化合物として同定される、前記方法。

20

【請求項 5 3】

前記方法が、(a) 当該細胞の生存能力を低減させる量の A p o E 2 を発現する細胞を提供する工程、(b) 前記細胞を、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 2 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する薬剤と接触させる工程、ならびに (c) 前記薬剤の存在下で細胞生存能力を測定する工程を含み、前記薬剤の不在下での細胞生存能力と比較したときの前記薬剤の存在下での細胞生存能力の上昇によって前記薬剤が A p o E 2 媒介性毒性を阻害する化合物として同定される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記方法が、(a) 当該細胞の生存能力を低減させる量の A p o E 3 を発現する細胞を提供する工程、(b) 前記細胞を、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 3 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する薬剤と接触させる工程、ならびに (c) 前記薬剤の存在下で細胞生存能力を測定する工程を含み、前記薬剤の不在下での細胞生存能力と比較したときの前記薬剤の存在下での細胞生存能力の上昇によって前記薬剤が A p o E 3 媒介性毒性を阻害する化合物として同定される、請求項 5 2 に記載の方法。

30

【請求項 5 5】

前記方法が、(a) 当該細胞の生存能力を低減させる量の A p o E 4 を発現する細胞を提供する工程、(b) 前記細胞を、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 4 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する薬剤と接触させる工程、ならびに (c) 前記薬剤の存在下で細胞生存能力を測定する工程を含み、前記薬剤の不在下での細胞生存能力と比較したときの前記薬剤の存在下での細胞生存能力の上昇によって前記薬剤が A p o E 4 媒介性毒性を阻害する化合物として同定される、請求項 5 2 に記載の方法。

40

【請求項 5 6】

前記薬剤が合成化合物である、請求項 4 6 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記薬剤が、小分子、核酸、タンパク質、抗体、またはペプチド模倣物である、請求項 4 6 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 58】

前記細胞が酵母細胞である、請求項 46 ~ 57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 46 ~ 57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

ApoE 媒介性疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体の発現または活性を調節する治療量または予防量の化合物を含む薬学的組成物を投与する工程を含む、前記方法。

10

【請求項 61】

前記化合物が、ApoE 媒介性毒性の抑制因子またはそのヒト相同体の発現または活性を増強するか、あるいは ApoE 媒介性毒性の増強因子またはそのヒト相同体の発現または活性を阻害する、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

ApoE 媒介性疾患の存在またはその発症し易さについて個体を評価する方法であって、対象から生体試料を得る工程；表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である酵母遺伝子のヒト相同体によってコードされる 1 つ以上のタンパク質の発現または活性について、前記試料を分析する工程；ならびに前記対象からの前記試料中の前記 1 つ以上のタンパク質の発現または活性を、好適な対照値と比較する工程を含み、前記比較の結果によって、前記対象が前記 ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそれを発症するリスクがある個体であるかどうかを示される、前記方法。

20

【請求項 63】

前記試料が、ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子のヒト相同体によってコードされる 1 つ以上のタンパク質の発現または活性について分析され、ApoE 媒介性疾患を有しないかまたはそれを発症するリスクがない個体間での前記 1 つ以上のタンパク質の発現または活性を表す対照値と比較したときの、前記対象からの前記試料において上昇した前記 1 つ以上のタンパク質の発現または活性によって、前記対象が ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそれを発症するリスクがある個体であることが示されるか、あるいは、前記試料が、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子によってコードされる 1 つ以上のタンパク質の発現または活性について分析され、ApoE 媒介性疾患を有しないかまたはそれを発症するリスクがない個体間での前記 1 つ以上のタンパク質の発現または活性を表す対照値と比較したときの、前記対象からの前記試料において低下した前記 1 つ以上のタンパク質の発現または活性によって、前記対象が ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそれを発症するリスクがある個体であることが示される、請求項 62 に記載の方法。

30

【請求項 64】

ApoE 媒介性疾患の存在またはその発症し易さについて個体を評価する方法であって、前記対象における ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子及び増強遺伝子のヒト相同体からなる群より選択される遺伝子の少なくとも一部分の配列を得る工程；及び前記対象からの前記配列を好適な対照配列と比較する工程を含み、前記比較の結果によって、前記対象が ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそれを発症するリスクがある個体であるかどうかを示され、任意で、前記抑制遺伝子または増強遺伝子が、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている、前記方法。

40

【請求項 65】

ヒト ApoE タンパク質を含むポリペプチドをコードする第 1 の核酸に機能的に連結された第 1 のプロモーターを含む第 1 の発現構築物を含む細胞であって、(a) 前記細胞が、表 1 A、1 B、2 A、2 B、及び 2 C のいずれか 1 つ以上に列記されている ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるポリペプチドをコードする第 2 の核酸に機能的に連結された第 2 のプロモーターを含む第 2

50

の発現構築物をさらに含むか、あるいは (b) 前記細胞において、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如している、前記細胞。

【請求項 6 6】

前記第 1 の発現構築物、前記第 2 の発現構築物、またはその両方が、前記細胞のゲノムに組み込まれている、請求項 6 5 に記載の細胞。

【請求項 6 7】

前記第 1 のプロモーター、前記第 2 のプロモーター、またはその両方が、誘導性プロモーターである、請求項 6 5 または請求項 6 6 に記載の細胞。

10

【請求項 6 8】

A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子内に突然変異を有する、請求項 6 5 に記載の細胞。

【請求項 6 9】

A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子内に遺伝子操作された突然変異を有する、請求項 6 5 に記載の細胞。

【請求項 7 0】

前記第 1 の核酸が、ヒト A p o E 2 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記第 2 の核酸が、A p o E 2 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質をコードする、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

20

【請求項 7 1】

前記第 1 の核酸が、ヒト A p o E 2 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記細胞において、A p o E 2 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如している、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7 2】

前記第 1 の核酸が、ヒト A p o E 3 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記第 2 の核酸が、A p o E 3 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質をコードする、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

30

【請求項 7 3】

前記第 1 の核酸が、ヒト A p o E 3 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記細胞において、A p o E 3 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如している、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7 4】

前記第 1 の核酸が、ヒト A p o E 4 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記第 2 の核酸が、A p o E 4 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質をコードする、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

40

【請求項 7 5】

前記第 1 の核酸が、ヒト A p o E 4 タンパク質を含むポリペプチドをコードし、前記細胞において、A p o E 4 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如している、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7 6】

前記細胞が、アミロイド タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチドをさらに含み、任意で、前記ポリヌクレオチドが異種ポリヌクレオチドであり、さらに任意で、前記プロモーターが誘導性プロモ

50

ーターである、請求項 65 ~ 75 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 77】

前記第 1 の核酸が、シグナル配列とヒト A p o E タンパク質とを含むポリペプチドをコードする、請求項 65 ~ 76 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 78】

ヒト A p o E タンパク質を含むポリペプチドをコードする配列に機能的に連結された第 1 のプロモーターを含む第 1 の核酸を含む細胞であって、(a) 前記細胞が、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるポリペプチドをコードする第 2 の核酸に機能的に連結された第 2 のプロモーターを含む第 2 の核酸をさらに含み、前記第 1 の核酸、前記第 2 の核酸、またはその両方が、異種核酸であるか、あるいは (b) 前記細胞において、表 1 A、1 B、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如しており、(i) 前記第 1 の核酸が異種核酸であるか、(i i) 前記細胞が、A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされる前記タンパク質の発現または活性が低減するように遺伝子操作されているか、あるいは (i i i) (i) と (i i) との両方である、前記細胞。

10

【請求項 79】

前記ヒト A p o E タンパク質がヒト A p o E 2 タンパク質であり、前記抑制遺伝子もしくは増強遺伝子が、A p o E 2 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体である、請求項 78 に記載の細胞。

20

【請求項 80】

前記ヒト A p o E タンパク質がヒト A p o E 3 タンパク質であり、前記抑制遺伝子もしくは増強遺伝子が、A p o E 3 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体である、請求項 78 に記載の細胞。

【請求項 81】

前記ヒト A p o E タンパク質がヒト A p o E 4 タンパク質であり、前記抑制遺伝子もしくは増強遺伝子が、A p o E 4 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体である、請求項 78 に記載の細胞。

30

【請求項 82】

前記ポリペプチドが、シグナル配列とヒト A p o E タンパク質とを含む、請求項 78 ~ 81 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 83】

シグナル配列とアミロイド タンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 78 ~ 82 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 84】

酵母細胞である、請求項 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 85】

前記細胞がヒト細胞であり、任意で、前記ヒト細胞が、誘導多能性幹 (i P S) 細胞または i P S 細胞から生成された細胞である、請求項 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の細胞。

40

【請求項 86】

前記細胞が神経細胞であり、任意で、前記神経細胞がインビトロで生成される、請求項 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 87】

候補薬剤の不在下で前記細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルで前記第 1 の核酸を発現するか、またはそれを発現するように誘導され得る、請求項 78 ~ 86 のいずれか一項に記載の細胞。

50

【請求項 88】

A p o E 媒介性毒性を予防または抑制する化合物を同定する方法であって、
候補薬剤の不在下で前記細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの前記第 1 の核酸の発現を可能にする条件下にて、前記候補薬剤の存在下で、請求項 65 ~ 87 のいずれか一項に記載の細胞を培養する工程；
前記候補薬剤の存在下で、細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び
前記候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、前記候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程を含み、
細胞増殖または生存能力が、前記候補薬剤の不在下でのものと比較して前記候補薬剤の存在下で上昇している場合に、前記候補薬剤が、A p o E 媒介性毒性を予防または抑制する化合物として同定される、前記方法。

10

【請求項 89】

A p o E 関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物を同定する方法であって、
候補薬剤の不在下で前記細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの前記第 1 の核酸の発現を可能にする条件下にて、前記候補薬剤の存在下で、請求項 65 ~ 87 のいずれか一項に記載の細胞を培養する工程；
前記候補薬剤の存在下で、細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び
前記候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、前記候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程を含み、
細胞増殖または生存能力が、前記候補薬剤の不在下でのものと比較して前記候補薬剤の存在下で上昇している場合に、前記候補薬剤が、A p o E 関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物として同定される、前記方法。

20

【請求項 90】

A p o E タンパク質を含むポリペプチドを発現する哺乳動物細胞と候補化合物を接触させる工程、及び前記候補化合物が前記哺乳動物細胞における少なくとも 1 つの A p o E 関連表現型を低減させるかどうかを判定する工程をさらに含み、任意で、前記 A p o E タンパク質が A p o E 4 タンパク質でありかつ前記表現型が A p o E 4 関連表現型である、請求項 88 または請求項 89 に記載の方法。

30

【請求項 91】

A p o E 関連疾患のモデルとして機能する非ヒト動物に候補化合物を投与する工程、及び前記候補化合物が前記動物における少なくとも 1 つの A p o E 関連疾患表現型を低減させるかどうかを判定する工程をさらに含み、任意で、前記 A p o E 関連疾患表現型が A p o E 4 関連表現型である、請求項 88 または請求項 89 に記載の方法。

【請求項 92】

前記 A p o E 関連疾患が A p o E 4 関連神経変性疾患である、請求項 89 ~ 91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】

前記 A p o E 4 関連疾患が、アルツハイマー病、血管性認知障害、脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、または多発性硬化症である、請求項 89 ~ 91 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 94】

前記化合物の分子標的または前記化合物が関与する生物学的経路もしくはプロセスを同定する工程をさらに含む、請求項 33 ~ 38、52 ~ 59、または 85 ~ 93 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 95】

前記ヒト相同体が、表 1 C、1 D、2 A、2 B、及び 2 C のいずれか 1 つ以上に列記されている、請求項 46 ~ 94 のいずれか一項に記載の細胞または方法。

【請求項 96】

前記ヒト相同体が、表 3 に列記されている酵母遺伝子のヒト相同体である、請求項 46

50

～ 94 のいずれか一項に記載の方法または細胞。

【請求項 97】

以下の工程を含む、ヒト A p o E タンパク質の結合パートナーを同定する方法：
請求項 1～31 または 65～87 のいずれか一項に記載の細胞を提供する工程；
ヒト A p o E タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸を発現させる工程；及び
前記ポリペプチドに結合する内因性ポリペプチドまたは内因性脂質を同定する工程であ
って、それによってヒト A p o E タンパク質結合パートナーが同定される、工程。

【請求項 98】

以下の工程を含む、ヒト A p o E タンパク質の結合パートナーを同定する方法：
ヒト A p o E タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたブ
ロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞を提供する工程；
前記核酸の発現を可能にする条件下にて前記酵母細胞を培養する工程；及び
前記ポリペプチドに結合する内因性酵母ポリペプチドを同定する工程であって、それ
によってヒト A p o E タンパク質結合パートナーが同定される、工程。

【請求項 99】

以下の工程を含む、ヒト A p o E タンパク質の結合パートナーを同定する方法：
ヒト A p o E タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸を、前記核酸の発現を可
能にする条件下にて酵母細胞において発現させる工程；ならびに
前記ポリペプチドに結合する内因性脂質または内因性ポリペプチドを同定する工程であ
って、

(i) ヒト A p o E タンパク質複合体を単離すること、及び
(i i) 前記ヒト A p o E タンパク質複体内に存在する内因性脂質または内因性ポリ
ペプチドを質量分析によって同定することであって、それによって前記内因性脂質または
前記内因性ポリペプチドが前記ヒト A p o E タンパク質の結合パートナーとして同定され
ることを含む、同定する工程。

【請求項 100】

前記ヒト A p o E タンパク質が、A p o E 2、A p o E 3、及び A p o E 4 から選択さ
れる、請求項 97～99 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 101】

ヒト A p o E 結合タンパク質を含む前記ポリペプチドが、検出可能なマーカーを含む、
請求項 97～100 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

前記検出可能なマーカーが、蛍光タンパク質またはエピトープタグである、請求項 10
1 に記載の方法。

【請求項 103】

前記エピトープタグが、タンデムアフィニティー精製タグ、グルタチオン - S - トラン
スフェラーゼタグ、V5 タグ、ポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質タグ、キ
チン結合タンパク質タグ、カルモジュリンタグ、E タグ、S P B タグ、S t r e p タグ、
V S V タグ、F c、ヘマグルチニンタグ、m y c タグ、及び F L A G タグからなる群より
選択される、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記細胞を溶解する工程をさらに含み、それによって抽出物が生成される、請求項 97
～103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

前記抽出物から前記ヒト A p o E タンパク質を単離する工程をさらに含み、それによ
ってヒト A p o E タンパク質複合体が形成される、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

前記ヒト A p o E タンパク質を単離する工程が、共免疫沈降、同時精製、アフィニティ
ークロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、またはイオン交換クロマトグラフィ
を含む、請求項 105 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項107】

前記ヒトApoEタンパク質複合体内に存在する内因性ポリペプチドを同定する工程をさらに含む、請求項105に記載の方法。

【請求項108】

前記ApoEタンパク質複合体内に存在する内因性ポリペプチドを同定する工程が、質量分析またはエドマン分解を含む、請求項107に記載の方法。

【請求項109】

前記ヒトApoEタンパク質複合体内に存在する内因性脂質を同定する工程を含む、請求項106に記載の方法。

【請求項110】

内因性脂質を同定する工程が、質量分析を含む、請求項109に記載の方法。

【請求項111】

前記結合パートナーが、ApoE関連疾患の治療のための治療標的候補である、請求項96～109のいずれか一項に記載の方法。

【請求項112】

前記ApoE関連疾患が、ApoE4関連神経変性疾患である、請求項111に記載の方法。

【請求項113】

前記ApoE4関連疾患が、アルツハイマー病、血管性認知障害、脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、または多発性硬化症である、請求項112に記載の方法。

【請求項114】

ApoE媒介性毒性に關与する生物学的プロセスまたは生物学的経路を、前記方法の前記工程によって同定された結合パートナーの同一性に基づいて同定する工程をさらに含む、請求項96～113のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

アルツハイマー病は、神経原線維変化及びアミロイドペプチドを含有する斑によって特徴付けられる神経変性障害である。アルツハイマー病(AD)の患者は、進行性認知症及び人格障害を示す。アミロイド前駆体タンパク質(APP)のタンパク質分解切断は、アミノ酸38～43個の長さを有するアミロイド(A β)ペプチドの生成をもたらす。アミロイド1-42ペプチドは、自己凝集する傾向が特に高く、アルツハイマー病の発症に強く結びついている。

【0002】

ヒトアポリポタンパク質Eは、脂質輸送及び代謝において重要な役割を果たす、アミノ酸299個の分泌糖タンパク質である。ApoEは、主に肝臓内で合成されるが、脳を含むいくつかの他の器官及び組織内でも合成される。中枢神経系において、ApoEは、主にアストロサイト及びミクログリアによって産生され、ApoE受容体を介してコレステロールを神経細胞に輸送する。APOE遺伝子は、3つの一般的な多型対立遺伝子であるE2、E3、及びE4を有し、これらは、それぞれApoE2、ApoE3、及びApoE4として知られるApoEアイソフォームをコードする。最も一般的なアイソフォームであるApoE3は、それぞれ112位及び158位にシステイン及びアルギニンを含有し、一方でApoE2は、両方の位置にシステインを有し、ApoE4は、両方の位置にアルギニンを有する。これらのアイソフォームはアミノ酸1個または2個分しか異ならないが、この差異はいくつかの影響を有する。APOEのE4対立遺伝子は、最も十分に認証されている遅発性アルツハイマー病の遺伝的危険因子であり、また、早発性ADのリスク上昇、及び中枢神経系に影響を及ぼす多様な他の疾患に関連する。APOEのE2対立遺伝子は、ADを発症する最も低いリスクに関連し、一方でE3対立遺伝子は、この疾患を発症する中等度のリスクをもたらす。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0003】

概要

本発明は、少なくとも部分的には、ヒトアポリポタンパク質E (ApoE) タンパク質が酵母細胞において発現されると毒性であるという発見に関する。この酵母におけるApoE媒介性毒性の発見により、ApoE誘導性毒性を調節する化合物または遺伝因子を同定するためにApoE発現酵母細胞を使用するスクリーニングアッセイの実施が可能となる。そのようなスクリーニングによって同定された化合物は、ApoEの1つまたは複数のアイソフォームが病理学的役割を果たす疾患の治療または予防のために使用することができる。例えば、そのようなスクリーニングによって同定された化合物は、ApoE4が関与する神経系に影響を及ぼす疾患及び障害、例えば、アルツハイマー病などの神経変性疾患の治療のために使用することができる。

10

【0004】

いくつかの態様では、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞であって、当該細胞における当該核酸の発現及び当該ポリペプチドの産生が当該細胞の増殖または生存能力の低下をもたらす、前記酵母細胞が本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、当該核酸の発現及び当該ポリペプチドの産生により、酵母細胞が生存不能となる。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質はヒトApoE2タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質はヒトApoE3タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質はヒトApoE4タンパク質である。

20

【0005】

いくつかの実施形態では、発現構築物は、シグナル配列とヒトApoEタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含み、細胞における核酸の発現及びポリペプチドの産生は、細胞の増殖または生存能力の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸の発現及びポリペプチドの産生により、酵母細胞が生存不能となる。シグナル配列は、ポリペプチドが細胞内の小胞体を標的とすることを引き起こし、小胞体においてポリペプチドは分泌経路に進入する。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、発現構築物によってコードされるポリペプチドのアミノ末端に位置する。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、コードされるポリペプチドの同時翻訳輸送を指示するものである。シグナル配列は、天然のシグナル配列と同一であってもよく、または人工的(非天然の)シグナル配列であってもよい。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、天然の酵母タンパク質のシグナル配列(例えば、酵母Kar2pシグナル配列)と同一である。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、天然の哺乳動物タンパク質(例えば、ヒトタンパク質)のシグナル配列と同一である。

30

【0006】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている発現構築物によってコードされるポリペプチドは、シグナル配列とヒトApoEタンパク質とを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている発現構築物によってコードされるポリペプチドは、シグナル配列と、リンカーペプチド配列と、ヒトApoEタンパク質とを含むか、またはそれらからなる。

40

【0007】

いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドの切断、ひいてはシグナル配列の除去は、ポリペプチド全体の翻訳が完了する前に起こってよい。この現象は、ポリペプチドの少なくともヒトApoEタンパク質の部分が翻訳され、細胞の増殖または生存能力の低下をもたらす限り、「細胞におけるポリペプチドの産生が、細胞の増殖または生存能力の低下をもたらす」という表現に包含される。

【0008】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている発現構築物によってコードされるポリペプチドは、ヒトApoEタンパク質と、1つ以上の異種ペプチド配列とを含有し得

50

る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている発現構築物によってコードされるポリペプチドは、シグナル配列と、ヒトApoEタンパク質と、1つ以上の異種ペプチド配列とを含有し得る。「異種ペプチド配列」は、ApoEタンパク質配列またはシグナル配列ではない任意のポリペプチド配列を指す。異種ペプチド配列は、ポリペプチドのアミノ末端、シグナル配列とヒトApoEタンパク質との間、ヒトApoEタンパク質のカルボキシ末端、及び/またはポリペプチドのカルボキシ末端に存在することができる。いくつかの実施形態では、異種ペプチド配列は、「検出タンパク質」を含み、この用語は、検出可能な標識として機能するタンパク質（例えば、蛍光タンパク質、酵素、またはエピトープタグ）を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ヒトApoEタンパク質と検出タンパク質（例えば、蛍光タンパク質、酵素、またはエピトープタグ）とを含有する融合タンパク質である。例えば、いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、シグナル配列と、ヒトApoEタンパク質と、検出タンパク質とを含有する融合タンパク質である。蛍光タンパク質の例としては、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、及びシアン蛍光タンパク質が挙げられる。検出タンパク質として機能し得る酵素には、発光反応において、または有色もしくは別様に検出可能な物質を生成するように、基質に作用することができるものが含まれる。例としては、例えば、ルシフェラーゼまたは β -ガラクトシダーゼが挙げられる。

10

【0009】

いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物、ならびに、シグナル配列とヒトアミロイドタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、シグナル配列とヒトApoEタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物、ならびに、シグナル配列とヒトアミロイドタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結された第1のプロモーター、及び、シグナル配列とヒトアミロイドタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結された第2のプロモーターを含む、発現構築物を含む。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞のいずれかにおけるApoEタンパク質は、ApoE2である。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞のいずれかにおけるApoEタンパク質は、ApoE3である。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞のいずれかにおけるApoEタンパク質は、ApoE4である。

20

30

【0010】

いくつかの実施形態では、酵母細胞は、当該細胞におけるシグナル配列とヒトアミロイドタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸の発現及びかかるポリペプチドの産生が、シグナル配列とヒトApoEタンパク質とを含むポリペプチドが存在しないかまたは発現しない条件下では、細胞の増殖または生存能力の低下において十分な結果をもたらさないであろうことを特徴とする。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、当該細胞における、シグナル配列とヒトアミロイドタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸の発現及びかかるポリペプチドの産生が、シグナル配列とヒトApoEタンパク質とを含むポリペプチドが存在しないかまたは発現しない条件下で、細胞の増殖または生存能力の低下をもたらすであろうことを特徴とする。

40

【0011】

いくつかの実施形態では、ヒトApoEを含むポリペプチドをコードする（例えば、シグナル配列とヒトApoEタンパク質とを含むポリペプチドをコードする）核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞は、ヒトアミロイドタンパク質を含むポリペプチド（例えば、シグナル配列とヒトアミロイドタンパク質とを含むポリペプチド）をコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含まない。

50

【0012】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている発現構築物は、酵母細胞のゲノムに組み込まれている。例えば、発現構築物は、pRS303、pRS304、pRS305、pRS306などの組み込み型プラスミド、またはそれらの誘導体とすることができる。

【0013】

酵母細胞は、発現構築物（例えば、その組み込みコピー）を1コピー以上（例えば、2コピー、3コピー、4コピー、またはそれよりも多く）有することができる。

【0014】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、GAL1-10、GAL1、GALL、またはGALSなどの誘導性プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、GPD、ADH、TEF、CYC1、またはMRP7などの構成的活性型プロモーターである。本発明の酵母細胞が、核酸に機能的に連結されたプロモーターを各々が含む2つ以上の発現構築物を含むか、または、第1及び第2のプロモーターを含む発現構築物を含む実施形態では、プロモーターは、同じであっても異なってもよい。

10

【0015】

いくつかの実施形態では、酵母は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ウバエ (*Saccharomyces uvae*)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・クルイベリ (*Pichia kluyveri*)、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、カンジダ・スピーシーズ (*Candida sp.*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・ユティリス (*Candida utilis*)、カンジダ・カカオイ (*Candida cacaoi*)、ゲオトリクム・スピーシーズ (*Geotrichum sp.*)、またはゲオトリクム・フェルメンタンス (*Geotrichum fermentans*) である。

20

30

【0016】

いくつかの実施形態では、酵母細胞において、薬物排出または細胞透過性に関与するタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子が破壊されている。酵母細胞において、例えば、遺伝子PDR1、PDR3、PDR5、SNQ2、またはERG6のうちの1つ以上が破壊されていてもよい。

【0017】

酵母細胞において毒性を誘導する方法も開示され、これは、ApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸を含む本明細書に記載の酵母細胞を提供する工程；及び酵母細胞に対して毒性であるレベルの核酸の発現を酵母細胞において誘導する工程；による。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、シグナル配列とApoEタンパク質とを含む。

40

【0018】

ApoE誘導性毒性を予防または抑制する化合物を同定する方法も開示され、これは、候補薬剤の不在下で細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、ApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸の発現を可能にする条件下にて、候補薬剤の存在下で、本明細書に記載の酵母細胞を培養する工程；候補薬剤の存在下で、細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程；によるものであり、細胞増殖または生存能力が、候補薬剤の不在下でのものと比較して、候補薬剤の存在下で上昇している場合に、当該候補薬剤は、ApoE誘導性毒性を予防または抑制する化合物

50

として同定される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、シグナル配列とA p o Eタンパク質とを含む。いくつかの実施形態では、A p o E誘導性毒性を予防または抑制する化合物は、A p o E関連疾患のための候補治療薬として機能する。

【0019】

A p o E誘導性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子を同定する方法も開示され、これは、遺伝子を過剰発現するように遺伝子改変されている、本明細書に記載の酵母細胞を提供する工程；遺伝子の過剰発現の不在下で酵母細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、A p o Eタンパク質を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下にて、酵母細胞を培養する工程；遺伝子の過剰発現の存在下で、細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び遺伝子の過剰発現の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、遺伝子の過剰発現の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程；によるものであり、(i)細胞増殖または生存能力が、遺伝子の過剰発現の不在下でのものと比較して、遺伝子の過剰発現の存在下で上昇している場合に、この遺伝子は、アミロイド 誘導性毒性の抑制遺伝子として同定され、(i i)細胞増殖または生存能力が、遺伝子の過剰発現の不在下でのものと比較して、遺伝子の過剰発現の存在下で低下している場合に、この遺伝子は、A p o E誘導性毒性の増強遺伝子として同定される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、シグナル配列とA p o Eタンパク質とを含む。

10

【0020】

A p o E誘導性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子を同定する方法も開示され、これは、酵母細胞のある内因性遺伝子が破壊されている、本明細書に記載の酵母細胞を提供する工程；当該内因性遺伝子が破壊されていない場合に当該酵母細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、A p o Eタンパク質を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下にて、当該酵母細胞を培養する工程；当該内因性遺伝子が破壊されている場合に、細胞増殖または生存能力を測定する工程；当該内因性遺伝子が破壊されている場合に測定された細胞増殖または生存能力を、当該内因性遺伝子が破壊されていない場合の細胞増殖または生存能力と比較する工程；によるものであり、(i)細胞増殖または生存能力が、当該内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、当該内因性遺伝子が破壊されている場合に上昇している場合に、この遺伝子は、A p o E誘導性毒性の増強遺伝子として同定され、(i i)細胞増殖または生存能力が、当該内因性遺伝子が破壊されていない場合と比較して、内因性遺伝子が破壊されている場合に低下している場合に、この遺伝子は、A p o E誘導性毒性の抑制遺伝子として同定される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、シグナル配列とA p o Eタンパク質とを含む。内因性遺伝子が破壊されている酵母細胞の使用に対する代替手段として、当該方法は、RNA干渉の使用によって内因性遺伝子の発現が抑制されている酵母細胞を使用して行われてもよい。

20

30

【0021】

いくつかの実施形態では、A p o E媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子を同定する方法は、A p o E媒介性毒性の抑制遺伝子として同定された遺伝子の哺乳動物相同体を同定する工程をさらに含む。

【0022】

前述の方法のうちの特定のものに従ってA p o E媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子として同定された様々な酵母遺伝子、それらによりコードされるタンパク質、そして、これらの遺伝子及びタンパク質の一部に関しては、他の生物（例えば、ヒトなどの哺乳動物種）において見出されるそれらの相同体も開示される。注目すべきことに、本明細書においてA p o E媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子として同定されたいくつかの酵母遺伝子は、アルツハイマー病の遺伝的危険因子としてこれまでに同定されているヒト相同体を有する。本開示は、A p o Eと、こうしたADの遺伝的危険因子のうちの特定のものとの間の遺伝子相互作用を、初めて認識するものとなると考えられる。いくつかの実施形態では、A p o E媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子は、表3に列記されている。いくつかの実施形態では、A p o E媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子は、小胞輸送に関与する（例えば、A T G 2 0、U B P 3、T R S 6 5、B R E 5、M U K 1、

40

50

及び GYP5)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子は、エンドサイトーシスに關与する（例えば、RVS161、OSH2、RVS167、YAP1802、及び OSH3）。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子は、ユビキチン化 / 脱ユビキチン化に關与する（例えば、APC11、UBP3、UBP7、CDC73、BRE5、及び RRI2）。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子は、脂質代謝に關与する（例えば、PER1、MDH3、GPI8、SMP3、及び SUR1）。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子は、DNA 修復に關与する（例えば、MGT1、PCD1、CDC73、及び RAD14）。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子は、ミトコンドリア機構に關与する（例えば、ATG20、MHR1、MRP4、RRM3、ILM1、MST1、YTA12、POR1、及び MRPL10）。

10

【0023】

いくつかの態様では、アルツハイマー病の遺伝的危険因子であるヒト相同体を有する酵母遺伝子を過剰発現すると共に特定の ApoE アイソフォームを発現する酵母細胞であって、該酵母遺伝子の過剰発現が酵母細胞における ApoE の毒性を増強する、酵母細胞が、ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそれを発症するリスクがある対象であって、特定の ApoE アイソフォームを発現しておりかつ AD の遺伝的危険因子を有する、対象を治療するための候補化合物を同定するためのモデル系として機能し得る。

20

【0024】

いくつかの態様では、アルツハイマー病の遺伝的危険因子であるヒト相同体を有する酵母遺伝子の活性の発現が低減していると共に特定の ApoE アイソフォームを発現する酵母細胞であって、該酵母遺伝子の過剰発現が酵母細胞における ApoE の毒性を抑制する、酵母細胞が、ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそれを発症するリスクがある対象であって、特定のアイソフォームを発現しておりかつ AD の遺伝的危険因子を有する、対象を治療するための候補化合物を同定するためのモデル系として機能し得る。

30

【0025】

ヒト ApoE タンパク質を含むポリペプチドをコードする第 1 の核酸に機能的に連結された第 1 のプロモーターを含む第 1 の発現構築物を含む細胞も開示され、(a) 当該細胞は、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるポリペプチドをコードする第 2 の核酸に機能的に連結された第 2 のプロモーターを含む第 2 の発現構築物をさらに含むか、あるいは (b) 当該細胞において、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそれらのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如している。いくつかの実施形態では、第 1 の核酸は、シグナル配列とヒト ApoE タンパク質とを含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーター、第 2 のプロモーター、またはその両方が、制御可能（例えば、誘導可能）である。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性の低減または欠如は、そのタンパク質をコードする遺伝子内の突然変異から生じる。いくつかの実施形態では、突然変異は、遺伝子操作された突然変異である。いくつかの実施形態では、発現または活性の低減または欠如は、制御可能、例えば、誘導可能である。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、表 1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されている酵母遺伝子である。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、表 3 に列記されている酵母遺伝子である。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、小胞輸送に關与する（例えば、ATG20、UBP3、TRS65、BRE5、MUK1、GYP5、またはそれらの哺乳動物（例えば、ヒト）相同体）。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、エンドサイトーシスに關与する（例えば、RVS161、OSH2、RVS167、YAP1802、OSH3、またはそれらの哺乳動物（

40

40

50

例えば、ヒト) 相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、ユビキチン化/脱ユビキチン化に關与する(例えば、APC11、UBP3、UBP7、CDC73、BRE5、RRI2、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト) 相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、脂質代謝に關与する(例えば、PER1、MDH3、GPI8、SMP3、SUR1、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト) 相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、DNA 修復に關与する(例えば、MGT1、PCD1、CDC73、RAD14、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト) 相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、ミトコンドリア機構に關与する(例えば、ATG20、MHR1、MRP4、RRM3、ILM1、MST1、YTA12、POR1、MRPL10、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト) 相同体)。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、ヒト相同体は、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されている遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒト相同体は、表3に列記されている酵母遺伝子の相同体である。いくつかの実施形態では、ヒトApoE タンパク質はヒトApoE 2 タンパク質であり、抑制遺伝子または増強遺伝子は、ApoE 2 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子、例えば、表1A、1B、1C、1D、2A、及び3のいずれかまたはより多くに列記されているApoE 2 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、ヒトApoE タンパク質はヒトApoE 3 タンパク質であり、抑制遺伝子または増強遺伝子は、ApoE 3 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子、例えば、表1A、1B、1C、1D、2B、及び3のいずれか1つ以上に列記されているApoE 3 媒介性毒性の抑制因子または増強因子のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、ヒトApoE タンパク質はヒトApoE 4 タンパク質であり、抑制遺伝子または増強遺伝子は、ApoE 4 媒介性毒性の抑制因子または増強因子、例えば、表1A、1B、1C、1D、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されているApoE 4 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、細胞は酵母細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞) である。

20

【0027】

ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子である酵母遺伝子によってコードされるタンパク質の哺乳動物相同体をコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を生成または提供する工程を含む方法も、本明細書に開示され、このプロモーターは、哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞) における発現を指示することができる。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体はヒト相同体である。いくつかの実施形態では、プロモーターは制御可能(例えば、誘導可能) である。いくつかの実施形態では、タンパク質の発現または活性は誘導可能である。いくつかの実施形態では、当該方法は、発現構築物を哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞) に導入する工程を含む。いくつかの実施形態では、当該方法は、哺乳動物細胞において哺乳動物相同体の発現または活性を誘導する工程をさらに含む。本発明の方法に従って生成された哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞) も開示される。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である酵母遺伝子は、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されている。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である酵母遺伝子は、表3に列記されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、表3に列記されている酵母遺伝子の相同体である哺乳動物(例えば、ヒト) 遺伝子である。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、小胞輸送に關与する(例えば、ATG20、UBP3、TRS65、BRE5、MUK1、GYP5、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)

30

40

50

相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、エンドサイトーシスに關与する(例えば、RVS161、OSH2、RVS167、YAP1802、OSH3、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、ユビキチン化/脱ユビキチン化に關与する(例えば、APC11、UBP3、UBP7、CDC73、BRE5、RRI2、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、脂質代謝に關与する(例えば、PER1、MDH3、GPI8、SMP3、SUR1、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、DNA 修復に關与する(例えば、MGT1、PCD1、CDC73、RAD14、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体)。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子は、ミトコンドリア機構に關与する(例えば、ATG20、MHR1、MRP4、RRM3、ILM1、MST1、YTA12、POR1、MRPL10、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体)。

10

【0028】

ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子である酵母遺伝子によってコードされるタンパク質の哺乳動物相同体(例えば、ヒト相同体)の発現または活性が低減または欠如するように、哺乳動物細胞を遺伝子操作することを含む方法も、本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ApoE 媒介性毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子である酵母遺伝子によってコードされるタンパク質の哺乳動物相同体をコードする内因性遺伝子に突然変異を導入することによって遺伝子操作されている。本発明の方法に従って生成された哺乳動物細胞も開示される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である酵母遺伝子は、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、表3に列記されている酵母遺伝子の相同体である哺乳動物(例えば、ヒト)遺伝子である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、小胞輸送に關与する酵母遺伝子(例えば、ATG20、UBP3、TRS65、BRE5、MUK1、及びGYP5)の相同体であるヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、エンドサイトーシスに關与する酵母遺伝子(例えば、RVS161、OSH2、RVS167、及びYAP1802)の相同体であるヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、ユビキチン化/脱ユビキチン化に關与する酵母遺伝子(例えば、APC11、UBP3、UBP7、CDC73、BRE5、及びRRI2)の相同体であるヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、脂質代謝に關与する酵母遺伝子(例えば、PER1、MDH3、GPI8、SMP3、及びSUR1)の相同体であるヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、DNA 修復に關与する酵母遺伝子(例えば、MGT1、PCD1、CDC73、及びRAD14)の相同体であるヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、ミトコンドリア機構に關与する酵母遺伝子(例えば、ATG20、MHR1、MRP4、RRM3、ILM1、MST1、YTA12、POR1、及びMRPL10)の相同体であるヒト遺伝子、または非ヒト哺乳動物に見出されるその相同体である。

20

30

40

【0029】

ApoE タンパク質を含むポリペプチドをコードする内因性遺伝子を含む哺乳動物細胞も開示され、当該細胞は、(a) ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子の哺

50

乳動物相同体によってコードされるポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物をさらに含むか、あるいは (b) A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である酵母遺伝子の哺乳動物相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如するように遺伝子操作されている。いくつかの実施形態では、ヒト相同体は、表 1 C、1 D、2 A、2 B、及び 2 C のいずれか 1 つ以上に列記されている遺伝子である。いくつかの実施形態では、哺乳動物相同体は、表 3 に列記されている酵母遺伝子の相同体であるヒト遺伝子である。いくつかの実施形態では、哺乳動物 (例えば、ヒト) 相同体は、小胞輸送に關与する酵母遺伝子 (例えば、A T G 2 0、U B P 3、T R S 6 5、B R E 5、M U K 1、及び G Y P 5) の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物 (例えば、ヒト) 相同体は、エンドサイトーシスに關与する酵母遺伝子 (例えば、R V S 1 6 1、O S H 2、R V S 1 6 7、及び Y A P 1 8 0 2) の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物 (例えば、ヒト) 相同体は、ユビキチン化 / 脱ユビキチン化に關与する酵母遺伝子 (例えば、A P C 1 1、U B P 3、U B P 7、C D C 7 3、B R E 5、及び R R I 2) の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物 (例えば、ヒト) 相同体は、脂質代謝に關与する酵母遺伝子 (例えば、P E R 1、M D H 3、G P I 8、S M P 3、及び S U R 1) の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物 (例えば、ヒト) 相同体は、D N A 修復に關与する酵母遺伝子 (例えば、M G T 1、P C D 1、C D C 7 3、及び R A D 1 4) の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物 (例えば、ヒト) 相同体は、ミトコンドリア機構に關与する酵母遺伝子 (例えば、A T G 2 0、M H R 1、M R P 4、R R M 3、I L M 1、M S T 1、Y T A 1 2、P O R 1、及び M R P L 1 0) の相同体である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 2 タンパク質であり、A p o E 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である酵母遺伝子は、A p o E 2 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 3 タンパク質であり、抑制遺伝子または増強遺伝子は、A p o E 3 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 4 タンパク質であり、抑制遺伝子または増強遺伝子は、A p o E 4 媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子である。

【 0 0 3 0 】

本明細書に記載されている哺乳動物細胞に關連する任意の態様のいくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞 (例えば、ヒト細胞) は、多能性幹細胞または多能性幹細胞から生成された細胞である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、誘導多能性幹 (i P S) 細胞または胚性幹 (E S) 細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、神経幹細胞、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、またはグリア細胞である。いくつかの実施形態では、神経幹細胞、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、またはグリア細胞は、多能性幹細胞 (i P S 細胞または E S 細胞) から、または異なる細胞型の体細胞からの分化転換によって、インビトロで生成される。いくつかの実施形態では、細胞、例えば、i P S 細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、またはグリア細胞は、A p o E 媒介性疾患を患う対象から得られる。

【 0 0 3 1 】

本明細書に記載されているヒト細胞に關連する任意の態様のいくつかの実施形態では、細胞の A P O E 遺伝子型は、2 / 2、2 / 3、2 / 4、3 / 3、3 / 4、または 4 / 4 であってもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、A p o E 2、A p o E 3、または A p o E 4 をコードする A P O E 遺伝子に対してホモ接合性である (すなわち、それらの遺伝子型は、2 / 2、3 / 3、または 4 / 4 である)。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも 1 つの 2 対立遺伝子を含む (すなわち、それらの遺伝子型は、2 / 2、2 / 3、または 2 / 4 である)。いくつかの実施形態では、細胞は、2 に対してヘテロ接合性である (すなわち、それらの遺伝子型は、2 / 3 または 2 / 4 である)。いくつかの実施形態では、細胞は、2 に

対してホモ接合性である（すなわち、それらの遺伝子型は、 $2/2$ である）。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも1つの 3 対立遺伝子を含む（すなわち、それらの遺伝子型は、 $2/3$ 、 $3/3$ 、または $3/4$ である）。いくつかの実施形態では、細胞は、 3 に対してヘテロ接合性である（すなわち、それらの遺伝子型は、 $2/3$ または $3/4$ である）。いくつかの実施形態では、細胞は、 3 に対してホモ接合性である（すなわち、それらの遺伝子型は、 $3/3$ である）。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも1つの 4 対立遺伝子を含む（すなわち、それらの遺伝子型は、 $2/4$ 、 $3/4$ 、または $4/4$ である）。いくつかの実施形態では、細胞は、 4 に対してヘテロ接合性である（すなわち、それらの遺伝子型は、 $2/4$ または $3/4$ である）。いくつかの実施形態では、細胞は、 4 に対してホモ接合性である（すなわち、それらの遺伝子型は、 $4/4$ である）。同様に、ヒト対象に関連する任意の態様において、この対象は、様々な実施形態における前述のAPOE遺伝子型のいずれを有してもよい。

10

20

30

40

50

【0032】

本明細書に記載されている細胞に関連する任意の態様のいくつかの実施形態では、細胞は、アミロイドタンパク質を発現し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、アミロイドタンパク質を自然に発現し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、変異体アミロイドタンパク質を自然に発現し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、アミロイドタンパク質を発現するように遺伝子操作されている。いくつかの実施形態では、細胞は、遺伝子操作されていない同型の哺乳動物細胞と比べてアミロイドタンパク質を過剰発現するように遺伝子操作されている哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞であり、変異体アミロイドタンパク質を発現するように遺伝子操作されている。対象に関連する任意の態様において、当該対象は、アミロイドタンパク質を発現し得る。いくつかの実施形態では、対象は、アミロイドタンパク質を自然に発現し得る。いくつかの実施形態では、対象は、アミロイドタンパク質を発現するように遺伝子操作されている非ヒト動物である。

【0033】

さらに、APOE媒介性毒性の増強遺伝子及び抑制遺伝子ならびに/またはそれらの哺乳動物相同体に関する、スクリーニングアッセイ及び治療方法が開示される。いくつかの実施形態では、スクリーニングアッセイは、APOE媒介性毒性を予防または抑制する候補化合物を同定するためのものであり、このアッセイは、APOEを発現し、かつAPOE媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはその哺乳動物相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が上昇または低下している、細胞を利用する。例えば、APOE媒介性毒性を予防または抑制する候補化合物を同定する方法が開示され、当該方法は、ヒトAPOEタンパク質を含むポリペプチドをコードする第1の核酸に機能的に連結された第1のプロモーターを含む第1の発現構築物を含む細胞を培養する工程であって、(a)前記細胞が、APOE媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるポリペプチドをコードする第2の核酸に機能的に連結された第2のプロモーターを含む第2の発現構築物をさらに含むか、あるいは(b)前記細胞において、APOE媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如している、細胞を、候補薬剤の不在下で細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、APOEタンパク質を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下にて、候補薬剤の存在下で培養する工程；候補薬剤の存在下で細胞増殖または生存能力を測定する工程；候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程；を含み、細胞増殖または生存能力が、候補薬剤の不在下でのものと比較して、候補薬剤の存在下で上昇している場合に、当該候補薬剤は、APOE媒介性毒性を予防または抑制する化合物として同定される。

【0034】

APOE関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物を同定

する方法も本明細書に開示され、当該方法は、候補薬剤の不在下で細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、A p o Eタンパク質を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下にて、候補薬剤の存在下で前述の細胞を培養する工程；候補薬剤の存在下で細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程；を含み、細胞増殖または生存能力が、候補薬剤の不在下でのものと比較して、候補薬剤の存在下で上昇している場合に、当該候補薬剤は、A p o E関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物として同定される。

【0035】

A p o E媒介性毒性を予防または抑制する候補化合物を同定する方法も開示され、当該方法は、A p o Eタンパク質を含むポリペプチドをコードする遺伝子を含む哺乳動物細胞を培養する工程であって、前記細胞が、(a) A p o E媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子の哺乳動物相同体によってコードされるポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物をさらに含むか、あるいは(b) A p o E媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子の哺乳動物相同体によってコードされるタンパク質の発現もしくは活性が低減もしくは欠如するかまたは誘導的に低減もしくは欠如するように遺伝子操作されている、細胞を、候補薬剤の不在下で細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、A p o Eタンパク質を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下にて、候補薬剤の存在下で培養する工程；候補薬剤の存在下で細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程；を含み、細胞増殖または生存能力が、候補薬剤の不在下でのものと比較して、候補薬剤の存在下で上昇している場合に、当該候補薬剤は、A p o E媒介性毒性を予防または抑制する化合物として同定される。

10

20

【0036】

A p o E関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物を同定する方法も本明細書に開示され、当該方法は、候補薬剤の不在下で細胞において毒性を誘導するのに十分なレベルでの、A p o Eタンパク質を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下にて、候補薬剤の存在下で前述の哺乳動物細胞を培養する工程；候補薬剤の存在下で細胞増殖または生存能力を測定する工程；及び候補薬剤の存在下で測定された細胞増殖または生存能力を、候補薬剤の不在下での細胞増殖または生存能力と比較する工程；を含み、細胞増殖または生存能力が、候補薬剤の不在下でのものと比較して、候補薬剤の存在下で上昇している場合に、当該候補薬剤は、A p o E関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補化合物として同定される。

30

【0037】

A p o E媒介性毒性を調節する(例えば、予防または抑制する)候補化合物を同定する方法のいずれかのいくつかの実施形態では、特定のA p o Eアイソフォーム(A p o E 2、A p o E 3、またはA p o E 4タンパク質)を含むポリペプチドを発現する細胞を使用して同定された化合物は、当該化合物の作用が当該特定のアイソフォームに対して特異的であるか否かを判定するために、さらに試験されてもよい。いくつかの実施形態では、当該方法は、当該作用が特定のアイソフォームに対して特異的であると判定する工程を含む。いくつかの実施形態では、当該方法は、化合物が、A p o Eアイソフォームのうちの2つまたは3つ全てによって媒介される毒性を調節する(例えば、毒性を予防または抑制する)と判定する工程を含む。いくつかの実施形態では、特定のアイソフォームによって媒介される毒性を予防または抑制する化合物は、A p o E媒介性疾患を有するかまたはそのリスクがある対象を治療するために有用であり得、ここで、この対象は、特定のアイソフォームを発現する。いくつかの実施形態では、2つ以上のアイソフォームのいずれかによって媒介される毒性を予防または抑制する化合物は、A p o E媒介性疾患を有するかまたはそのリスクがある対象を治療するために有用であり得、ここで、この対象は、2つ以上のアイソフォームのうち少なくとも1つを発現する。

40

【0038】

50

いくつかの態様では、本明細書に記載されている遺伝子操作された酵母細胞は、ApoE 媒介性疾患の遺伝的危険因子である特定の遺伝子における突然変異または遺伝的変異を有すると共に特定の ApoE アイソフォームを発現する、ヒト細胞及びヒト対象のためのモデルとして機能し得る。そのようなモデルは、創薬のために、また、疾患リスクを修飾し、かつそれ自体が創薬の標的となり得る、さらなる遺伝因子の同定のために、有用であり得る。

【0039】

ApoE 媒介性毒性を予防または抑制する候補化合物を同定する方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ApoE タンパク質を含むポリペプチドを発現し、かつ ApoE 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が上昇または低下している細胞を使用して同定された化合物は、ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそのリスクがある対象を治療するために使用され得、ここで、この対象は、疾患を発症するリスクの上昇に関連するか、または疾患の低年齢発症に関連する、ヒト相同体をコードする遺伝子における突然変異または遺伝的変異を有する。いくつかの実施形態では、対象は、化合物を同定するために使用された細胞と同じ ApoE アイソフォームを発現する。例えば、いくつかの実施形態では、ApoE2 を発現し、かつ ApoE2 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が上昇または低下している酵母細胞において、ApoE 媒介性毒性を予防または抑制するものとして同定された候補化合物は、ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそのリスクがあり、疾患を発症するリスクの上昇に関連するか、または疾患の低年齢発症に関連する、ヒト相同体をコードする遺伝子における突然変異または遺伝的変異を有し、かつ ApoE2 を発現する対象を治療するために使用されてもよい。いくつかの実施形態では、ApoE3 を発現し、かつ ApoE3 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が上昇または低下している酵母細胞において、ApoE 媒介性毒性を予防または抑制するものとして同定された候補化合物は、ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそのリスクがあり、疾患を発症するリスクの上昇に関連するか、または疾患の低年齢発症に関連する、ヒト相同体をコードする遺伝子における突然変異または遺伝的変異を有し、かつ ApoE3 を発現する対象を治療するために使用されてもよい。いくつかの実施形態では、ApoE4 を発現し、かつ ApoE4 媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそのヒト相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が上昇または低下している酵母細胞において、ApoE 媒介性毒性を予防または抑制するものとして同定された候補化合物は、ApoE 媒介性疾患を有するかまたはそのリスクがあり、疾患を発症するリスクの上昇に関連するか、または疾患の低年齢発症に関連する、ヒト相同体をコードする遺伝子における突然変異または遺伝的変異を有し、かつ ApoE4 を発現する対象を治療するために使用されてもよい。

【0040】

いくつかの実施形態では、化合物（例えば、候補治療薬）を同定する方法のいずれかは、化合物と物理的に相互作用しかつ当該化合物によって活性が阻害されるかまたは上昇する分子標的を同定する工程；発現または活性または修飾状態が化合物の影響を受ける遺伝子及びタンパク質を同定する工程；あるいは、化合物の影響を受けるかまたは化合物の分子標的が関与する生物学的経路もしくはプロセスを同定する工程；をさらに含んでもよい。そのような分子標的、遺伝子、タンパク質、生物学的経路及びプロセス、ならびにそれらの分子成分は、ApoE 媒介性毒性を調節するさらなる化合物の同定のための標的として使用されてもよい。いくつかの実施形態では、そのような分子標的、遺伝子、タンパク質、生物学的経路及びプロセス、ならびにそれらの分子成分は、ApoE 関連疾患を治療するかまたはそのリスクを低減させるための候補治療薬である、さらなる化合物の同定のための標的として使用されてもよい。

【0041】

化合物の分子標的を同定するために使用され得る方法には、例えば、当該化合物が結合

10

20

30

40

50

するタンパク質を同定するための親和性試薬として当該化合物を使用すること、架橋すること（例えば、当該化合物の架橋可能な類似体を使用すること）、及び当該化合物と架橋されるタンパク質を同定することなどの生化学的方法、ならびに、当該化合物が細胞に及ぼす作用に欠失または過剰発現が著しく影響する遺伝子を同定することなどの遺伝学的方法が含まれる。発現または活性または修飾状態が化合物の影響を受ける遺伝子及びタンパク質を同定するために使用され得る方法には、例えば、発現プロファイリング、RNA-Seq、タンパク質マイクロアレイなどが含まれる。いくつかの実施形態では、酵母におけるApoE媒介性毒性を調節（例えば、阻害）する化合物を同定する工程、及び前述の種類のアッセイまたは他の好適なアッセイのいずれかを行って、当該化合物の分子標的を同定する工程を含む方法が、本明細書に記載されている。

10

【0042】

さらに、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法が、本明細書に開示される。前出の酵母細胞もしくは哺乳動物（例えば、ヒト）細胞のいずれか、または本明細書に記載されている任意の酵母細胞もしくは哺乳動物（例えば、ヒト）細胞が、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、当該方法は、ヒトApoEタンパク質の発現が細胞に対して毒性である条件下で行われる。他の実施形態では、当該方法は、ヒトApoEタンパク質の発現が細胞に対して毒性ではない条件下で行われてもよい。

【0043】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法であって、本明細書に記載されている細胞を提供する工程；ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸を発現させる工程；及びポリペプチドに結合する内因性ポリペプチドまたは内因性脂質を同定する工程であって、それによってヒトApoEタンパク質結合パートナーが同定される、工程；を含む方法が、本明細書に開示される。

20

【0044】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法であって、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞を提供する工程；核酸の発現を可能にする条件下にて酵母細胞を培養する工程；及びポリペプチドに結合する内因性酵母ポリペプチドを同定する工程であって、それによってヒトApoEタンパク質結合パートナーが同定される、工程；を含む方法も、本明細書に開示される。

30

【0045】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法であって、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸を、当該核酸の発現を可能にする条件下にて酵母細胞において発現させる工程；及びポリペプチドに結合する内因性脂質または内因性ポリペプチドを同定する工程；を含む方法も、本明細書に開示され、該同定する工程は、(i)ヒトApoEタンパク質複合体を単離する工程；及び(ii)ヒトApoEタンパク質複体内に存在する内因性脂質または内因性ポリペプチドを質量分析によって同定する工程であって、それによって内因性脂質または内因性ポリペプチドがヒトApoEタンパク質の結合パートナーとして同定される、工程を含む。

40

【0046】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する前出の方法のいずれにおいても、ヒトApoEタンパク質は、ApoE2、ApoE3、及びApoE4から選択され得る。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質はApoE2である。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質はApoE3である。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質はApoE4である。いくつかの実施形態では、ヒトApoE結合タンパク質を含むポリペプチドは、検出可能なマーカーを含む。いくつかの実施形態では、検出可能なマーカーは、蛍光タンパク質またはエピトプタグである。いくつかの実施形態では、エピトプタグは、タンデムアフィニティー精製タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ、V5タグ、ポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質タグ

50

、キチン結合タンパク質タグ、カルモジュリンタグ、Eタグ、SPBタグ、Streptタグ、VSVタグ、Fc、ヘマグルチニンタグ、mycタグ、及びFLAGタグからなる群より選択される。

【0047】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する前出の方法のいずれも、細胞を溶解して抽出物を生成する工程を含み得る。いくつかの実施形態では、当該方法は、抽出物からヒトApoEタンパク質を単離してヒトApoE複合体を形成させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質の単離する工程は、共免疫沈降、同時精製、アフィニティークロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、またはイオン交換クロマトグラフィを含む。いくつかの実施形態では、当該方法は、ヒトApoEタンパク質複体内に存在する内因性ポリペプチドを同定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、ApoEタンパク質複体内に存在する内因性ポリペプチドを同定する工程は、質量分析またはエドマン分解を含む。いくつかの実施形態では、当該方法は、ヒトApoEタンパク質複体内に存在する内因性脂質を同定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、内因性脂質を同定する工程は、質量分析を含む。

10

【0048】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する前出の方法のいずれにおいても、結合パートナーは、ApoE関連疾患の治療のための治療標的候補であり得る。いくつかの実施形態では、ApoE関連疾患はApoE4関連神経変性疾患である。いくつかの実施形態では、ApoE4関連疾患は、アルツハイマー病、血管性認知障害、脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、または多発性硬化症である。いくつかの実施形態では、当該方法は、ApoE媒介性毒性に關与する生物学的プロセスまたは生物学的経路を、本発明の方法の工程によって同定された結合パートナーの同一性に基づいて同定する工程をさらに含む。

20

【0049】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと同様または同等の方法及び材料が本発明の実践または試験に使用され得るが、好ましい方法及び材料は以下に記載されているものである。本明細書に言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、それらの全体において参照により組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含め本出願が優先する。加えて、材料、方法、及び実施例は、例示に過ぎず、限定を意図するものではない。

30

【0050】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】アイソフォーム間で異なるアミノ酸位置(112位及び158位)及びこれらの違いから生じる構造の違いを示す、ヒトApoEアイソフォームであるApoE2、ApoE3、及びApoE4のモデル構造。(Hatters, DM, et al., Trends in Biochemical Sciences, 31(8): 445-454, 2006から出典された図)。

40

【図2】酵母はApoEアイソフォーム特異的毒性表現型を示す。(A)Kar2pシグナル配列とeGFPに融合しているヒトApoEタンパク質とを含むポリペプチド(本明細書において「Kar2ss-ApoE-eGFP」とも称される)をコードする核酸に機能的に連結されたGALプロモーターを含む発現構築物の一部分の概略図。(B)酵母Kar2pシグナル配列-eGFP融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性対照ベクター(各写真の一番上の横列)(本明細書において「Kar2ss-eGFP」とも称される)、あるいはKar2ss-ApoE2-eGFP融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド(各写真の第2の横列)、Kar2ss-Apo

50

E 3 - e G F P 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（各写真の第3の横列）、または K a r 2 s s - A p o E 4 - e G F P 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（各写真の一番下の横列）のいずれかで形質転換した酵母細胞の写真。これらの酵母細胞を、左から右に漸増する希釈度（より低い酵母細胞濃度）でガラクトース（左の写真）またはグルコース（右の写真）上にスポットティングし、増殖を評定した。実験用及び対照用の形質転換体は、A p o E 発現の不在下では等しく良好に増殖したが（グルコース、A p o E 「オフ」）、一方で、A p o E 発現は細胞増殖を大いに阻害した（ガラクトース、A p o E 「オン」）。A p o E 2 菌株は、構築物を4コピー保有した。A p o E 3 及び A p o E 4 菌株は、構築物を3～4コピー保有した。相対的な増殖レベルが写真の上に示されている。（C）示されている通り、e G F P（対照）、K a r 2 s s - A p o E 2 - e G F P、K a r 2 s s - A p o E 3 - e G F P、または K a r 2 s s - A p o E 4 - e G F P 融合タンパク質を発現する、ガラクトース含有液体培地中で培養された酵母菌株の増殖曲線を示すグラフ。

10

【図3】A p o E アイソフォームは、酵母において異なるレベルの毒性を示す。（A）ガラクトース含有液体培地中で培養された、K a r 2 s s - A p o E 2 - e G F P、K a r 2 s s - A p o E 3 - e G F P、または K a r 2 s s - A p o E 4 - e G F P 融合タンパク質の4個の遺伝子コピーを含有する酵母細胞の増殖曲線のグラフ。（B）A p o E 2、A p o E 3、及び A p o E 4 のタンパク質レベル（抗 G F P 抗体を用いて評定されたもの）を、ローディング対照として機能した P G K 1 のタンパク質レベルと比較して示すウェスタンブロット。

20

【図4】A p o E 構築物を G F P でタグ付けすることは、それらの毒性に影響を及ぼさない。左のパネル：K a r 2 s s - A p o E 2 - e G F P 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（左の縦列）、K a r 2 s s - A p o E 3 - e G F P 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（中央の縦列）、あるいは酵母 K a r 2 s s - A p o E 4 - e G F P 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（右の縦列）で形質転換した酵母細胞の写真。これらの酵母細胞を、ガラクトース（上部分、左及び右のパネル）またはグルコース（下部分、左及び右のパネル）上にスポットティングし、増殖を評定した。右のパネル：K a r 2 s s - A p o E 2 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（左の縦列）、酵母 K a r 2 s s - A p o E 3 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（中央の縦列）、または K a r 2 s s - A p o E 4 融合ポリペプチドをコードするガラクトース誘導性発現プラスミド（右の縦列）で形質転換した酵母細胞の写真。これらの酵母細胞を、ガラクトース（上部分、左及び右のパネル）またはグルコース（下部分、左及び右のパネル）上にスポットティングし、増殖を評定した。形質転換体は、グルコースプレート上では等しく良好に増殖した。A p o E 発現は、タンパク質が e G F P に融合されていたかどうかに関わらず、対立遺伝子に依存する様式で細胞増殖を阻害した。これらの実験は、2ミクロン発現プラスミド内にある A p o E 構築物を用いて行った。

30

【図5】K a r 2 s s - A p o E 2 - e G F P、K a r 2 s s - A p o E 3 - e G F P、または K a r 2 s s - A p o E 4 - e G F P をコードする発現構築物を異なるコピー数保有する菌株の増殖及び A p o E タンパク質レベル。（A）e G F P（対照）、及び種々の量の A p o E 2、A p o E 3、または A p o E 4 タンパク質を示されている通りに（K a r 2 s s - A p o E - e G F P 融合体として）発現する、ガラクトース含有液体培地中で培養された酵母菌株の増殖曲線を示すグラフ。（B）A p o E 2、A p o E 3、または A p o E 4 を含有する K a r 2 s s - A p o E - e G F P 融合タンパク質をコードする示されている発現構築物で形質転換した種々の酵母における P G K と比べて異なるレベルの A p o E 2、A p o E 3、及び A p o E 4 タンパク質（抗 G F P 抗体を使用して評定されたもの）を示すウェスタンブロット。

40

【図6A】ヒト A p o E アイソフォームである A p o E 2、A p o E 3、及び A p o E 4 のモデル構造。アイソフォーム間で異なるアミノ酸位置（112位及び158位）、及びこれらの違いから生じる A r g 6 1（R 6 1）近傍における違いを示している。

50

【図6B】R61T突然変異がApoE4の構造をApoE3の構造に似たものにすることを示す、ヒトApoEアイソフォームであるApoE2、ApoE3、及びApoE4のモデル構造(Hatters, DM, et al., Trends in Biochemical Sciences, 31(8): 445-454, 2006から出典された図)。

【図7】R61T突然変異は、ApoE4に導入されるとApoE3様表現型を回復する。示されている通り、Kar2ss-ApoE2-eGFP融合ポリペプチド(一番上の横列)、Kar2ss-ApoE3-eGFP融合ポリペプチド(第2の横列)、Kar2ss-ApoE4-eGFP融合ポリペプチド(第3の横列)、Kar2ss-ApoE2(R61T)-eGFP融合ポリペプチド(第4の横列)、Kar2ss-ApoE3(R61T)-eGFP融合ポリペプチド(第5の横列)、Kar2ss-ApoE4(R61T)-eGFP融合ポリペプチド(一番下の横列)をコードするガラクトース誘導性発現プラスミドで形質転換した酵母細胞の写真。これらの酵母細胞を、左から右に漸増する希釈度(より低い酵母細胞濃度)でガラクトース(左の写真)またはグルコース(右の写真)上にスポットティングし、増殖を評定した。実験用及び対照用の形質転換体は、ApoE発現の不在下では等しく良好に増殖した(グルコース、ApoE「オフ」)。Rが61位にあるApoEアイソフォームの発現は細胞増殖を大いに阻害し(ガラクトース、ApoE「オン」、上3つの横列)、ApoE4が最も高い効果を示した。ApoE4 R61Tの毒性は、明らかにApoE4の毒性と比べて低減していた(第3の横列(ApoE4(疾患))と一番下の横列(ApoE4 R61T)とを比較されたい)。相対的な増殖レベルが写真の上に示されている。これらの実験は、2ミクロン発現プラスミド内にあるApoE構築物を用いて行った。

10

20

【図8】ApoE誘導性毒性抑制遺伝子を同定するためのスクリーニングに使用されたApoE発現菌株(「ApoE高毒性(hitox)」菌株)のガラクトース含有液体培地における増殖曲線。

【図9A】酵母において抑制因子のスクリーニングを行うための手順を示す概略図。

【図9B】特定のApoEアイソフォームを使用して抑制因子スクリーニングを行うための手順を示す概略図。

【図10】クリオキノールまたはNAB2の存在下におけるApoE発現酵母菌株の増殖曲線。

30

【図11A】エンドサイトーシスについてのMUP1アッセイの概略図。図の上部は、ApoE発現構築物(左)及びMUP1-mKate2融合タンパク質をコードするMUP1レポーター構築物(右)を示す。図の下部は、ガラクトースの存在下及びメチオニンの不在下の条件(-MET、左)、ならびにガラクトース及びメチオニンの存在下(+MET、右)における、ApoE発現構築物及びMUP1構築物を保有する酵母菌株の概略図を示す。メチオニンの不在下では、MUP1融合タンパク質は細胞膜に留まるが(左)、メチオニンの存在下では、MUP1融合タンパク質は細胞内に取り込まれる(右)。

【図11B】上パネルは、(i)ヒトApoEタンパク質、-シヌクレイン、またはAと、(ii)MUP1レポーター構築物との両方を発現する酵母菌株の蛍光画像を示す。下パネルは、ガラクトース含有培地上の様々な菌株の増殖を示す。

40

【図11C】ApoE4、A、及び-シヌクレインは、異なる方法でエンドソーム輸送を妨害する。図11Bで説明された通りに示されている菌株を、8時間にわたってApoE4、A、及び-シヌクレインを発現するように誘導した。蛍光顕微鏡写真に示されているように、MUP1の輸送は、ApoE4、A、または-シヌクレインの存在下で異なるように見える。

【図12】ApoE修飾遺伝子スクリーニングの結果の概要。480個の遺伝子を再検証分析のために選択した。ベン図(下部)は、示されているApoEアイソフォームに関する再検証されたヒットの重複を示す。

【図13】ApoE4発現は、Ste3のエンドサイトーシスを妨害する。示されている神経変性タンパク質発現構築物を保有する酵母細胞を、pAG423-Ste3-mKa

50

t e 2 プラスミドで形質転換し、6 ~ 8 時間にわたって、培養培地へのガラクトースの添加により S t e 3 - m K a t e 2 及び神経変性タンパク質を発現するように誘導した。上の横列は、位相差顕微鏡を使用した細胞の代表的画像を示す。下の横列は、m K a t e 2 蛍光についての代表的な蛍光顕微鏡写真を示す。液胞への S t e 3 エンドサイトーシスは、A 及び - シヌクレインの発現によってのみならず、A p o E 4 の発現によっても妨害されている。

【発明を実施するための形態】

【0052】

詳細な説明

いくつかの態様では、A p o E タンパク質を含むポリペプチドを産生するように遺伝子操作された酵母細胞が本明細書に記載され、ここで、当該細胞におけるポリペプチドの産生は、当該細胞の増殖または生存能力の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの産生により、酵母細胞が生存不能となる。いくつかの実施形態では、A p o E タンパク質はヒト A p o E タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 2 タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 3 タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 4 タンパク質である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、シグナル配列と A p o E タンパク質とを含む。

10

【0053】

いくつかの態様では、ヒト A p o E タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞が本明細書に記載され、当該細胞における核酸の発現及びポリペプチドの産生は、当該細胞の増殖または生存能力の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの産生により、酵母細胞が生存不能となる。いくつかの実施形態では、A p o E タンパク質はヒト A p o E タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 2 タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 3 タンパク質である。いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質はヒト A p o E 4 タンパク質である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、シグナル配列と A p o E タンパク質とを含む。

20

【0054】

本明細書に記載されている A p o E 発現酵母細胞は、A p o E 誘導性毒性を調節する化合物または遺伝因子、例えば、A p o E 誘導性毒性を阻害する化合物を同定するために使用することができる。そのようなスクリーニングによって同定された化合物は、A p o E 関連疾患の治療または予防に使用することができる。本明細書で使用される場合、「A p o E 関連疾患」は、対象のゲノムにおける A P O E 遺伝子の特定の対立遺伝子の存在と疾患の発症との間に統計的に有意な関連性があること、疾患発症の平均年齢よりも平均して少なくとも3年低い年齢における疾患の発症、または重度もしくは急速に進行する形態の疾患を有することを特徴とする疾患である。いくつかの実施形態では、当該対立遺伝子を少なくとも1コピー有する個体は、母集団内の個体間でのリスクと比較して、またはその特定の対立遺伝子を保有しない個体間でのリスクと比較して、少なくとも1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.75倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、または5倍高い、疾患発症リスクまたは疾患を有するリスクを有する。個体または群は、同齡であってもよい。

30

40

【0055】

本明細書で使用される場合、「A p o E 誘導性毒性」及び「A p o E 媒介性毒性」は、A p o E タンパク質の発現の結果として、またはそれに関連して生じる、1つ以上の細胞機能もしくは構造における低減、障害、または他の異常、増殖もしくは生存能力の低減、あるいはそれらの組み合わせを指すために、互換的に使用される。酵母細胞との関連では、A p o E 媒介性毒性は、増殖または生存能力の低減、例えば、生存能力の低減または生存不能、あるいは1つ以上の細胞機能もしくは構造における低減、障害、または他の異常

50

、例えば、エンドサイトーシスもしくは小胞輸送における低減、障害、または他の異常として顕在化し得る。神経細胞またはグリア細胞、例えば、哺乳類の神経細胞またはグリア細胞との関連では、ApoE 媒介性毒性は、増殖または生存能力の低減、例えば、生存能力の低減または生存不能、あるいは1つ以上の細胞機能もしくは構造における低減、障害、または他の異常として顕在化し得る。細胞機能は、細胞内で、あるいは細胞それ自体によって、または1つ以上の他の細胞と一緒に、インビトロまたはインビボで（例えば、インビボの組織または器官との関連で）行われる、生物学的プロセス及び経路のいずれをも含む。いくつかの実施形態では、細胞機能は、エンドサイトーシス、小胞輸送、軸索輸送、ミトコンドリア機能（例えば、ATP 産生）、神経突起伸長、神経伝達、神経発生、または恒常性維持である。インビボのApoE 媒介性毒性は、細胞機能障害から死にまで及び、多様な範囲及び多様な方法で顕在化し得る。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性は、特定のApoE アイソフォームを発現する対象における、ApoE 媒介性疾患の発症（またはApoE 媒介性疾患の1つ以上の症状もしくは徴候）またはApoE 媒介性疾患を発症する傾向の増加によって、対象において証明され得る。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性は、少なくとも部分的には、正常対照と比較したときのアミロイド凝集体の形成、沈着、蓄積、もしくは存続性の増加、またはアミロイド媒介性毒性の上昇として顕在化し得る。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性は、正常対照と比較したときの認知、挙動、もしくは記憶の低下または欠陥として顕在化し得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を本明細書に記載されている薬剤と接触させること、またはそれで処置することによって、ApoE 媒介性毒性の1つ以上の兆候が軽減される。

【0056】

いくつかの実施形態では、ApoE 関連疾患は、ApoE 4 をコードする 4 対立遺伝子に関連し、ApoE 4 関連疾患と称され得る。いくつかの実施形態では、ApoE 4 関連疾患は、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病（AD）、レビー小体型認知症（DLB）、軽度認知障害（MCI）、前頭側頭型認知症（FTD）、脳アミロイド血管症（CAA）、CAA 関連脳内出血、血管性認知障害、パーキンソン病（PD）、多発性硬化症（MS）、外傷性脳損傷（TBI）、または脆弱X 関連振戦/失調症候群である。CAA は、脳血管壁におけるタンパク質、主にアミロイドタンパク質の沈着によって特徴付けられる病態である。CAA は、AD 患者において高頻度の所見であるが、AD の証拠の不在下でも起こる。

【0057】

いくつかの実施形態では、ApoE 関連疾患は、「アミロイド 関連疾患」であり、この用語は、例えば、特に脳内でのアミロイド斑の形態における、アミロイドペプチドの異常に高いレベルの産生、蓄積、及び/または凝集によって特徴付けられるあらゆる病態を指す。アミロイド 関連疾患には、AD、ダウン症候群、脆弱X 症候群、CAA、CAA 関連脳内出血、及び孤発性封入体筋炎が含まれる。ApoE 4 は、A クリアランスを阻害し得、かつ/またはApoE 3 及びApoE 2 と比較してA クリアランスの媒介における効率が低いことが示唆されている。免疫組織学的証拠は、A と併せて、AD 患者の脳内の斑におけるApoE の存在を実証し、斑におけるA 沈着は、非保因者と比較してAPOE 4 保因者においてより豊富である。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、A 媒介性毒性を調節する（例えば、阻害する）化合物及び遺伝因子を同定するために使用され得る。

【0058】

ヒトApoE タンパク質を発現する、本明細書に記載の酵母細胞及び哺乳動物細胞は、ヒトApoE タンパク質の結合パートナーを同定する方法において使用されてもよい。当該結合パートナーは、細胞内の任意の結合パートナー及び/または細胞から分泌される任意の結合パートナー、例えば、内因性ポリペプチドまたは内因性脂質であり得る。本発明の方法によって同定される結合パートナーは、ApoE 関連疾患の治療のための治療標的候補であり得る。ヒトApoE タンパク質の結合パートナーは、ApoE 媒介性毒性に関

与する生物学的経路または生物学的プロセスに關与する場合もある。

【 0 0 5 9 】

タンパク質及び核酸

いくつかの態様では、A p o E 誘導性毒性を阻害する候補化合物を同定するために有用な組成物及び方法が、本明細書に記載されている。いくつかの態様では、A p o E 誘導性毒性の抑制因子または増強因子である遺伝子（及びそれらがコードするタンパク質）（A p o E 媒介性毒性の「抑制遺伝子」もしくは「増強遺伝子」、または総称して「修飾遺伝子」もしくは「修飾因子」と呼ばれる場合もある）を同定するために有用な組成物及び方法が、本明細書に記載されている。本明細書に記載されている組成物及び方法のうち特定のものは、シグナル配列とヒト A p o E タンパク質とを含む融合ポリペプチドを含むか、または使用する。

10

【 0 0 6 0 】

「ヒト A p o E タンパク質」という用語には、アミノ酸配列が、天然の野生型 A p o E タンパク質のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるタンパク質、ならびに、アミノ酸配列が、天然の変異型 A p o E タンパク質のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるタンパク質が含まれる。ヒト A P O E は、N C B I 遺伝子 I D 番号 3 4 8 を有する。A P O E は、ヒトにおける 3 つの一般的な対立遺伝子である A P O E 2（頻度約 8 %）、A P O E 3（頻度約 8 0 %）、及び A P O E 4（頻度約 1 4 %）を有する。ヒト A p o E タンパク質は、1 8 個のアミノ酸からなるシグナル配列を含む 3 1 7 個のアミノ酸からなる前駆体ポリペプチドとして天然に合成され、これは、切断されて、成熟した 2 9 9 個のアミノ酸からなるポリペプチドを産生する。ヒト A p o E 3 前駆体ポリペプチドの配列は、N C B I R e f S e q アクセッション番号 N P _ 0 0 0 0 3 2 . 1 で確認される。説明の目的のために、成熟した 2 9 9 個のアミノ酸からなるヒト A p o E ポリペプチドに基づくアミノ酸の付番が、本明細書において使用されている。

20

【 0 0 6 1 】

3 つの一般的な A P O E 対立遺伝子によってコードされるタンパク質は、成熟タンパク質におけるの 1 1 2 位及び 1 5 8 位に位置する 2 個のアミノ酸において異なる。A p o E 2 は、残基 1 1 2 及び 1 5 8 にシステインを有し、A p o E 3 は、残基 1 1 2 にシステイン、そして残基 1 5 8 にアルギニンを有し、A p o E 4 は、残基 1 1 2 及び 1 5 8 にアルギニンを有する。成熟野生型ヒト A p o E タンパク質の配列が以下に示されており、1 1 2 位及び 1 5 8 位のアミノ酸は太字で示され下線が引かれている。

30

【 0 0 6 2 】

A p o E 2 の配列は次の通りである。

KVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVT
 QELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDV**CGR**
 LVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQK**CL**AVYQAGAREGAE
 RGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRL
 DEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPPLVEDMQRQWAGLVEKVQAA
 VG TSAAPVPSDNH (SEQ ID NO: 1)

40

【 0 0 6 3 】

A p o E 3 の配列は次の通りである。

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVT
 QELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGR
 LVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAE
 RGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRL
 DEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFPEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAA
 VG TSAAPVPSDNH (SEQ ID NO: 2)

【 0 0 6 4 】

10

A p o E 4 の配列は次の通りである。

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVT
 QELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVRGR
 LVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAE
 RGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRL
 DEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFPEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAA
 VG TSAAPVPSDNH (SEQ ID NO: 3)

20

【 0 0 6 5 】

天然の A p o E 突然変異には A p o E 4 (L 2 8 P) が含まれ、これは、A p o E 4 自
 体の作用を調整した後も重篤なままである遅発性 A D のリスク上昇を保因者に与える (
 K a m b o h , M I , e t a l . N e u r o s c i L e t t . 1 9 9 9 M a r 2
 6 ; 2 6 3 (2 - 3) : 1 2 9 - 3 2) 。他のバリエーションには、E 1 3 K 、 R 1 3 6 C 、
 G 1 9 6 S 、 Q 2 4 8 E 、 R 2 5 1 G 、及び G 2 7 8 W が含まれる (T i n d a l e , L
 C , e t a l . , N e u r o b i o l o g y o f A g i n g , 3 5 , 7 2 7 e 1 -
 7 2 7 e 3 (2 0 1 4)) 。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、ヒト A p o E タンパク質のバリエーションが使用され得る。「バ
 リエーションヒト A p o E タンパク質」(「ヒト A p o E バリエーション」とも称される)は、1
 個以上のアミノ酸において(置換、欠失、及び/または付加、例えば、挿入によって)天
 然のヒト A p o E タンパク質とは異なるポリペプチドを含むかまたはそれからなり、自然
 に発生することは知られておらず、少なくとも 2 0 0 個、2 5 0 個、2 6 0 個、2 7 0 個
 、2 8 0 個、2 9 0 個、2 9 5 個、または 2 9 9 個のアミノ酸(ヒト A p o E の全長)の
 長さによって、天然のヒト A p o E タンパク質と少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、
 9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれ以上同一である。いくつかの実施形態では
 、バリエーションヒト A p o E タンパク質は、天然の A p o E タンパク質とは最大 3 0 個のア
 ミノ酸で異なり(例えば、2 0 個以下のアミノ酸で異なるか、1 0 個以下のアミノ酸で異
 なるか、5 個以下のアミノ酸で異なるか、4 個以下のアミノ酸で異なるか、3 個以下のア
 ミノ酸で異なるか、2 個以下のアミノ酸で異なるか、または 1 個のアミノ酸で異なり)、
 少なくともいくつかの実施形態では、本明細書に記載されている融合ポリペプチドにて発
 現されると酵母細胞の増殖または生存能力の低下を引き起こす能力を保持している。いく
 つかの実施形態では、ヒト A p o E バリエーションは、1 つ以上の特定の位置、例えば、6 1
 位または 2 5 5 位において、野生型または変異型 A p o E と異なる。例えば、このバリエ
 ーションは、R 6 1 T 変換を保有し得る。いくつかの実施形態では、残基 2 5 3 ~ 2 8 9 の領
 域内にある 1 個以上の巨大かつ/または疎水性の残基が、より小さな疎水性残基または極
 性/荷電残基のいずれかで置き換えられている。例えば、当該変換は、F 2 5 7 A 、 W 2
 6 4 R 、 V 2 6 9 A 、 L 2 7 9 Q 、及び V 2 8 7 E であってもよい。いくつかの実施形態
 では、当該変換は、野生型 A p o E タンパク質と比べてバリエーションの毒性を低減させる。

30

40

50

いくつかの実施形態では、当該改変は、野生型 A p o E タンパク質と比べてバリエーションの毒性を上昇させる。いくつかの実施形態では、バリエーションヒト A p o E タンパク質は、ヒト A p o E タンパク質の断片（「ヒト A p o E タンパク質断片」）を含むかまたはそれからなる。ヒト A p o E タンパク質断片は、ヒト A p o E タンパク質よりも短く、断片の全長にわたってヒト A p o E タンパク質と同一である。いくつかの実施形態では、バリエーションまたは断片のヒト A p o E タンパク質は、完全長ヒト A p o E タンパク質と比べて、N 末端トランケーション、C 末端トランケーション、またはその両方を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションまたは断片のヒト A p o E タンパク質は、ヒト A p o E タンパク質の N 末端、C 末端、またはその両方から、最大 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、10 個、15 個、20 個、または 25 個のアミノ酸を欠いている。いくつかの実施形態では、バリエーションは、代替的または付加的に、最大 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、10 個、15 個、20 個、または 25 個のアミノ酸、最大で合計 50 個のアミノ酸の内部欠失を 1 つ以上有し得る。いくつかの実施形態では、バリエーションまたは断片のヒト A p o E タンパク質は、ヒト A p o E タンパク質の少なくともアミノ酸 272 ~ 299 を欠いている。本開示がバリエーションまたは断片のヒト A p o E タンパク質に言及する場合、そのバリエーションまたは断片は、A p o E 2、A p o E 3、もしくは A p o E 4 のバリエーションまたは断片であり得ることが理解されるべきである。本開示が A p o E タンパク質に言及する場合、本開示は、バリエーション A p o E タンパク質または A p o E タンパク質の断片が使用される実施形態を提供することも理解されるべきである。いくつかの実施形態では、例えば、異なるレベルの毒性を有するバリエーションが、A p o E 媒介性毒性の抑制因子もしくは増強因子である遺伝子の過剰発現または阻害と組み合わせて、スクリーニングに使用され得る。

【0067】

本明細書で使用される場合、「シグナル配列」または「分泌シグナル」という用語は、ポリペプチド内に存在し、かつポリペプチドが細胞内の小胞体を標的化することを引き起こす、ペプチド配列を指す。実施例に記載されている例示的なシグナル配列は、酵母 K a r 2 p シグナル配列

MFFNRLSAGKLLVPLSVVLYALFVVILPLQNSFHSSNVLVRG (SEQ ID NO: 4)

である。しかしながら、多種多様なシグナル配列が知られており、本明細書に記載されている融合ポリペプチドの小胞体標的化を引き起こすために使用することができる。シグナル配列は、例えば、Wilkinson et al. (1997) J Membr Biol. 155 (3): 189-97, Haguenaue - Tsapis (1992) Mol Microbiol. 6 (5): 573-9、及び Pool (2005) Mol Membr Biol. 22 (1-2): 3-15 において概説されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物（例えば、ヒト）のシグナル配列が使用される。例えば、いくつかの実施形態では、天然のヒト A p o E 前駆体ポリペプチド内に見出されるシグナル配列、例えば、

MKVLWAALLVTFLAGCQA (SEQ ID NO: 5)

が使用され得る。いくつかの実施形態では、ヒトインスリンの前駆体タンパク質（NCBI 遺伝子 ID 3630）の分泌シグナル配列が使用され得る。ヒトインスリンの前駆体タンパク質の分泌シグナル配列は、配列

MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA (SEQ ID NO: 11)

を有する。

【0068】

ヒト A p o E タンパク質を含有する、例えば、シグナル配列とヒト A p o E タンパク質とを含有するポリペプチドは、任意で、A p o E タンパク質に融合している第 2 のドメインを含んでもよい。融合タンパク質の第 2 のドメインは、例えば、免疫グロブリンドメイン、二量体化ドメイン、標的化ドメイン、安定化ドメイン、精製ドメイン、または検出タンパク質であり得る。例示的な検出タンパク質としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）（それぞれ e GFP、e CFP、e YFP、及び e BFP として知られる G

F P、C F P、Y F P、またはB F Pの増強版を含む)、Cerulean、dsRedなどの蛍光タンパク質；mKate、mTomato、mCherry、 α -ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼ(A P)などの酵素が挙げられる。検出タンパク質の他の例としては、タンデムアフィニティー精製(T A P)タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(G S T)タグ、V5タグ、ポリヒスチジンタグ(例えば、His₆)、マルトース結合タンパク質(M B P)タグ、キチン結合タンパク質(C B P)タグ、カルモジュリンタグ、Eタグ、S P Bタグ、Streptタグ、V S Vタグ、Fc、ヘマグルチニン(H A)タグ、mycタグ、及びF L A Gタグなどのエピトープが挙げられる。例えば、A p o Eタンパク質は、A p o Eタンパク質のN末端もしくはC末端または他の部分でG F Pと融合していてもよい。このような融合タンパク質は、組換え酵母細胞におけるA p o Eタンパク質の迅速かつ容易な検出及び同定のための方法を提供する。A p o Eタンパク質は、1つ、2つ、またはそれよりも多くのドメインと融合していてもよい。例えば、それは、N末端において第1のドメインと、そしてC末端において第2のドメインと融合していてもよい。異種ドメインまたはタンパク質が複数の目的を果たし得ることは、当業者であれば理解するであろう。いくつかの実施形態では、シグナル配列とA p o Eタンパク質との間、A p o Eタンパク質と第2のドメインとの間、またはその両方に、リンカーペプチドが存在し得る。いくつかの実施形態では、リンカーペプチドは、1~50アミノ酸長、例えば、5~25アミノ酸長であり得る。

【0069】

細胞がA p o Eタンパク質を発現するように、A p o Eタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸、例えば、プラスミドを調製し、細胞に導入する方法も、本明細書に記載されている。「A p o E核酸」という用語は、本明細書に記載されているA p o Eタンパク質のいずれかをコードする配列を含有する核酸を包含する。例示的なA p o E核酸としては、ヒトA p o E 2、ヒトA p o E 3、またはヒトA p o E 4をコードするものが挙げられる。

【0070】

「核酸」という用語は、概して、少なくとも1つの核酸塩基、例えば、DNAまたはRNA内に見出される天然のプリンまたはピリミジン塩基を含有する、DNA、RNA、またはそれらの誘導体もしくは模倣物の少なくとも1つの分子または鎖を指す。概して、「核酸」という用語は、少なくとも1つの一本鎖分子を指すが、特定の実施形態では、少なくとも1つの一本鎖分子に対して部分的に、実質的に、または完全に相補的である、少なくとも1本の付加的な鎖も包含する。したがって、核酸は、一本鎖分子を含む特定の配列についての1本または複数本の相補鎖または「相補体」を含む、少なくとも1つの二本鎖分子または少なくとも1つの三本鎖分子を包含してもよい。

【0071】

いくつかの実施形態では、シグナル配列とヒトA p o Eタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞は、ヒトアミロイドタンパク質をコードする発現構築物をさらに含む。本明細書で使用される場合、「ヒトアミロイドタンパク質」という用語は、そのアミノ酸配列が、ヒトアミロイド前駆体タンパク質(A P P)のタンパク質分解プロセッシングによって得られ、かつアルツハイマー病などのアミロイド病態に関連する天然の38~43アミノ酸アミロイドペプチドの配列と同一である、タンパク質を指す。「ヒトアミロイドタンパク質」という用語には、アミノ酸配列が、天然の野生型アミロイドペプチドのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるタンパク質、ならびに、アミノ酸配列が、天然の変異体アミロイドペプチドのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるタンパク質が含まれる。野生型アミロイドペプチドは、アミロイド1-38、アミロイド1-39、アミロイド1-40、アミロイド1-41、アミロイド1-42、及びアミロイド1-43を含む。ヒトアミロイドのアミノ酸1~43は、次の通りである。

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAI (SEQ ID NO: 6)

【0072】

40

アミロイド の突然変異には、A 2 T、H 6 R、D 7 N、A 2 1 G、E 2 2 G（北極型）、E 2 2 Q（オランダ型）、E 2 2 K（イタリア型）、D 2 3 N（アイオワ型）、A 4 2 T、及びA 4 2 Vが含まれる（付番はS E Q I D N O : 7のアミロイド ペプチドに対するものである）。これらの突然変異は、任意で、アミロイド ペプチド1 - 3 8、1 - 3 9、1 - 4 0、1 - 4 1、1 - 4 2、及び1 - 4 3のうちのいずれに存在してもよい。

【0073】

いくつかの実施形態では、ヒトアミロイド タンパク質は、シグナル配列とヒトアミロイド タンパク質とを含む融合ポリペプチドの一部として発現される。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、天然の酵母タンパク質のシグナル配列と同一であり（例えば、シグナル配列は、酵母K a r 2 pシグナル配列またはM A T シグナル配列と同一であり）、ヒトアミロイド タンパク質は、野生型アミロイド 1 - 4 2である。シグナル配列とヒトアミロイド タンパク質とを含有するポリペプチドは、任意で、第2のドメインと融合していてもよい。融合タンパク質の第2のドメインは、任意で、免疫グロブリンドメイン、二量体化ドメイン、標的化ドメイン、安定化ドメイン、精製ドメイン、または検出タンパク質、例えば、ヒトA p o Eを含む融合タンパク質に関して上述した第2のドメインのうちのいずれかとすることができ、同じ目的のいずれのために使用されてもよく、N末端、C末端、もしくはタンパク質内の他の場所に位置してもよく、かつ/または、ヒトA p o Eタンパク質について上述したように、リンカーペプチドによってアミロイド タンパク質に結合していてもよい。シグナル配列とヒトアミロイド タンパク質とを含むポリペプチドをコードする例示的な核酸構築物、及び酵母細胞へのそれらの導入は、米国特許出願公開第20130022988号及び同第20130045483号に記載されている。これらの文献には、シグナル配列とヒトアミロイド タンパク質とを含有する融合ポリペプチドが酵母細胞において発現されると毒性であるという発見も記載されている。ある特定の実施形態において、本発明は、任意のかかる核酸構築物を、ヒトA p o Eタンパク質をコードする核酸構築物と組み合わせて、例えば、酵母細胞において使用することを企図している。ある特定の実施形態において、シグナル配列とヒトアミロイド タンパク質とを含有する融合ポリペプチドは、誘導性プロモーターの制御下で発現され得る。

【0074】

いくつかの実施形態では、ヒトアミロイド タンパク質のバリエーションを使用することができる。本開示において、「バリエーションヒトアミロイド タンパク質」は、（置換、欠失、及び/または挿入によって）天然のアミロイド ペプチドとは、最大10個のアミノ酸で異なり（例えば、5個以下のアミノ酸で異なるか、4個以下のアミノ酸で異なるか、3個以下のアミノ酸で異なるか、2個以下のアミノ酸で異なるか、または1個のアミノ酸で異なり）、少なくともいくつかの実施形態では、シグナル配列を含む融合ポリペプチドにて発現されると酵母細胞の増殖または生存能力の低下を引き起こす能力を有する。

【0075】

いくつかの実施形態では、酵母細胞は、ヒトA p o Eタンパク質及び第1の検出可能ドメインを含む第1のポリペプチド、ならびにヒトアミロイド タンパク質及び第2の検出可能ドメインを含む第2のポリペプチドを発現し、第1及び第2の検出可能ドメインは異なり、例えば色によって容易に区別可能である。いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、ヒトA p o Eタンパク質及び第1の検出可能ドメインに融合しているシグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、ヒトアミロイドタンパク質及び第2の検出可能ドメインに融合しているシグナル配列を含む。

【0076】

いくつかの実施形態では、シグナル配列とヒトA p o Eタンパク質とを含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞は、ヒトアミロイド タンパク質をコードする発現構築物を含まない。

【0077】

A p o Eを含むポリペプチドをコードする例示的な核酸配列は、実施例において提供さ

10

20

30

40

50

れる。しかしながら、遺伝コードの縮重に起因して、所与のアミノ酸配列が多種多様な核酸配列のいずれによってコードされてもよいことは、当業者であれば理解するであろう。任意のかかる核酸配列を使用して、目的のポリペプチド、例えば、ヒト ApoE を含むポリペプチドをコードしてもよい。本開示の任意の態様のいくつかの実施形態では、核酸配列は、目的の種の細胞における発現のためにコドン最適化される。例えば、いくつかの実施形態では、ヒト ApoE を含むポリペプチドは、酵母内での発現のためにコドン最適化される。

【0078】

酵母細胞、ベクター

本明細書に記載されている組成物及び方法に使用することができる酵母菌株としては、10
 サッカロミセス・セレピシエ、サッカロミセス・ウバエ、サッカロミセス・クルイベリ、シゾサッカロミセス・ボンベ、クルイベロミセス・ラクティス、ハンセヌラ・ポリモルファ、ピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・クルイベリ、ヤロウイア・リポリティカ、カンジダ・スピーシーズ、カンジダ・アルピカンス、カンジダ・ユティリス、カンジダ・カカオイ、ゲオトリクム・スピーシーズ、及びゲオトリクム・フェルメンタンスが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における考察の大部分はサッカロミセス・セレピシエに関するが、これは例示を目的とするものに過ぎない。他の酵母菌株が、S・セレピシエに代わることができる。

【0079】

本開示のある特定の態様は、候補治療薬（例えば、医薬品、化学薬剤、または遺伝子薬剤）を同定するためのスクリーニング法に関する。本明細書に記載されている方法は、任意で、ERG6 遺伝子、PDR1 遺伝子、PDR3 遺伝子、PDR5 遺伝子、SNQ2 遺伝子、及び/または、膜排出ポンプに影響を及ぼし、かつ/もしくは薬物の透過性を増加させる任意の他の遺伝子において突然変異を有する、酵母菌株において行うことができる。いくつかの実施形態では、この菌株は、PDR1 及び PDR3 をコードする遺伝子内に突然変異を有する。20

【0080】

本明細書に記載されている融合ポリペプチドをコードする核酸は、プラスミド、線状核酸分子、人工染色体、及びエピソームベクターを含むがこれらに限定されない核酸ベクターを使用して、酵母細胞内にトランスフェクトされ得る。30

【0081】

酵母細胞における組換えプラスミド発現及び複製に使用される3つの周知の系には、組込み型プラスミド、低コピー数のARS-CENプラスミド、及び高コピー数の2 μ プラスミドが含まれる。Sikorski, "Extrachromosomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*," in *Plasmid, A Practical Approach*, Ed. K. G. Hardy, IRL Press, 1993、及び *Yeast Cloning Vectors and Genes, Current Protocols in Molecular Biology, Section II, Unit 13.4, Eds., Ausubel et al., 1994*、ならびにそれらの後続文書を参照されたい。40

【0082】

組込み型プラスミドの一例はYIpであり、これは、ハプロイドゲノム1つ当たり1コピーで維持され、メンデルの法則で遺伝する。このようなプラスミドは、目的の遺伝子、細菌の複製起点、及び選択可能な遺伝子（典型的には抗生物質耐性マーカー）を含有し、細菌内で産生される。精製されたベクターは、選択可能な遺伝子内で直線化され、コンピテント酵母細胞を形質転換するために使用される。

【0083】

低コピー数のARS-CENプラスミドの一例はY Cpであり、これは、自律複製配列（ARS1）及び動原体配列（CEN4）を含有する。これらのプラスミドは、通常、細胞1個当たり1~2コピー数で存在する。CEN配列の除去はYRpプラスミドを産生し50

、これは、典型的には細胞1個当たり100～200コピー数で存在する。しかしながら、このプラスミドは、有糸分裂的にも減数分裂的にも不安定である。

【0084】

高コピー数の2 μ プラスミドの一例はYEpであり、これは、およそ1kbの長さの配列(2 μ 配列と呼ばれる)を含有する。2 μ 配列は、より高いプラスミドコピー数をもたらす酵母レプリコンとして作用する。例えば、コピー数は、細胞1個当たり50～100コピー数、例えば、細胞1個当たり約60～80コピー数であり得る。しかしながら、これらのプラスミドは不安定であり得、維持のための選択を必要とする場合がある。コピー数は、プラスミド上で選択遺伝子を不活性化されたプロモーターに機能的に連結させることによって増加させることができる。

10

【0085】

多種多様なプラスミドを、本明細書に記載されている組成物及び方法に使用することができる。いくつかの実施形態では、プラスミドは、組込み型プラスミド(例えば、pRS303、pRS304、pRS305、pRS306、またはそれらの誘導体)である。例えば、Alberti et al. (2007) "A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast* 24(10):913-19を参照されたい。いくつかの実施形態では、プラスミドは、エピソームプラスミド(例えば、p426GPD、p416GPD、p426TEF、p423GPD、p425GPD、p424GPD、またはp426GAL)である。いくつかの実施形態では、プラスミドは、動原体プラスミド(例えば、pRS313、pRS314、pRS315、pRS316、またはそれらの誘導体)である。

20

【0086】

使用されるプラスミドの型に関わらず、酵母細胞は、典型的に、化学的方法(例えば、Rose et al., 1990, *Methods in Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、またはBurke, DJ, et al., *Methods in Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2005に記載されている方法)によって形質転換される。細胞は典型的に、DNA1 μ g当たりおよそ10⁴のコロニー形成単位(形質転換細胞)の形質転換効率を達成するように、酢酸リチウムで処理される。酵母は、切断された選択可能なマーカーが、変異した(通常は点突然変異または小欠失)宿主遺伝子と組み換わって機能を回復するように、相同組換えを行う。次いで、形質転換細胞が選択培地上で単離される。当然ながら、核酸を酵母細胞に導入する任意の好適な手段を使用することができる。

30

【0087】

本明細書に記載されている酵母ベクター(プラスミド)は、典型的には、酵母複製起点、抗生物質耐性遺伝子、細菌複製起点(細菌細胞内での複製のため)、多重クローニング部位、及び酵母細胞内での維持のための酵母栄養遺伝子を含有する。栄養遺伝子(または「栄養要求性マーカー」)は、ほとんどの場合、次のうちの1つである: 1) TRP1(ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ)、2) URA3(オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ)、3) LEU2(3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ)、4) HIS3(イミダゾールグリセロールリン酸デヒドロゲナーゼまたはIGPデヒドロゲナーゼ)、または5) LYS2(-アミノアジピン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)。

40

【0088】

本明細書に記載されている酵母ベクター(プラスミド)は、プロモーター配列を含有してもよい。「プロモーター」は、転写の開始及び速度が制御される核酸配列の領域である

50

、制御配列である。これは、特異的な転写核酸配列を開始するために、RNAポリメラーゼ及び他の転写因子などの制御タンパク質及び分子が結合し得る遺伝子要素を含有してもよい。「機能的に連結された」及び「作動可能に位置付けられた」という表現は、プロモーターが、ある核酸配列に対して、その配列の転写開始及び/または発現を制御するために正しい機能的な位置及び/または向きにあることを意味する。

【0089】

プロモーターは、コードセグメント及び/またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得ることができるように、核酸配列と自然に関連するものであり得る。そのようなプロモーターは、「内因性プロモーター」と称することができる。あるいは、プロモーターは、組換えまたは異種プロモーターであってもよく、これは、その自然環境において通常は核酸配列と関連しないプロモーターを指す。そのようなプロモーターには、他の遺伝子のプロモーター及び非天然のプロモーターが含まれ得る。用いられるプロモーターは、構成的であっても制御可能（例えば、誘導可能）であってもよい。

10

【0090】

多様なプロモーター（要素）が、酵母細胞内のRNAの発現を制御するために用いられ得る。誘導性酵母プロモーターの例としては、ガラクトース誘導性プロモーターGAL1-10、GAL1、GALL、GALS、及び銅誘導性プロモーターCUP1が挙げられる。抑圧性酵母プロモーターの例としては、メチオニン抑圧性プロモーターMet25及びMet3が挙げられる。酵母における制御可能な発現を達成するためにtetOプロモーターを使用してもよい。構成的酵母プロモーターの例としては、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター（GPD）、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター（ADH）、翻訳延長因子1プロモーター（TEF）、チトクロムc-オキシダーゼプロモーター（CYC1）、及びMRP7が挙げられる。ADHなどのある特定の遺伝子がグルコース培地中で構成的であり得、グルコースの不在で抑圧され得ることは理解されよう。グルココルチコイド応答要素（GRE）を含む、グルココルチコイドホルモンによって誘導可能なプロモーターを含有する酵母の自律複製発現ベクターも説明されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Mumberg, D., et al., Gene, 156: 119-122 (1995)、Ronick et al., Methods Enzymol.; 283: 313-22 (1997)、Funk, M., et al., Methods Enzymol.; 350: 248-57 (2002)を参照されたい。因子、アルコールオキシダーゼ、及びPGHなどの構成的または誘導性プロモーターを含有する、さらに他の酵母ベクターが使用されてもよい。概説については、Ausubel et al., 1994を参照されたい。

20

30

【0091】

いくつかの実施形態では、ガラクトース以外の炭素源でのGALプロモーターからの発現、例えば、誘導性発現を可能にする酵母菌株が使用される。いくつかの実施形態では、この菌株は、Gal4 DNA結合ドメインが転写活性化ドメイン及び制御ドメインに融合されている融合タンパク質をコードする組込みまたはエピソーム（例えば、プラスミド由来の）遺伝子を担持する。融合タンパク質は、転写を活性化するその能力が制御ドメインに対する小分子の結合によって制御されることを特徴とする。例えば、いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、小分子の不在下では転写を活性化しないが、小分子の存在下では、融合タンパク質は転写を活性化する。例示的な小分子には、例えば、ステロイドホルモンが含まれ、対応する制御ドメインは、小分子に対する受容体の少なくとも一部分を含む。例えば、小分子は、エストロゲン（例えば、エストラジオール）、またはその類似体（例えば、タモキシフェン）であってもよく、対応する制御ドメインは、エストロゲン受容体（ER）の少なくとも一部分を含む。例示的な活性化ドメインとしては、例えば、単純ヘルペスウイルスタンパク質VP16活性化ドメインなどのウイルスタンパク質活性化ドメインが挙げられる。いくつかの実施形態では、この菌株は、Gal4-ER-VP16融合タンパク質をコードする組込みまたはエピソーム（例えば、プラスミド由来の

40

50

）遺伝子を担持する。培地中のエストロゲン受容体リガンド、例えば、エストラジオールの存在は、ガラクトース以外の炭素源でのGALプロモーターからの発現を可能にする。例えば、Gao CY and Pinkham JL et al., *Biotechniques*, 2000; 29(6): 1226-31を参照されたい。目的の分子、例えば、ApoEタンパク質の発現を、例えば、ガラクトースまたは他の炭素源を含有する培養培地上で、条件付きにするための多数の方法が存在することは、当業者であれば理解するであろう。

【0092】

いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE2、ApoE3、またはApoE4を含むポリペプチドをコードする核酸の1~20個の組み込みコピー、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個の組み込みコピーを保有する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE2を含むポリペプチドをコードする核酸の4個の組み込みコピーを保有する。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE2を含むポリペプチドをコードする核酸の13~15個の組み込みコピーを保有する。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE3を含むポリペプチドをコードする核酸の2~10個の組み込みコピー、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の組み込みコピーを保有する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE3を含むポリペプチドをコードする核酸の3~4個の組み込みコピーを保有する。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE3を含むポリペプチドをコードする核酸の5~9個の組み込みコピーを保有する。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE4を含むポリペプチドをコードする核酸の1~5個の組み込みコピー、例えば、1個、2個、3個、4個、または5個の組み込みコピーを保有する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE4を含むポリペプチドをコードする核酸の2個の組み込みコピーを保有する。いくつかの実施形態では、本発明の酵母細胞は、ApoE4を含むポリペプチドをコードする核酸の3~4個の組み込みコピーを保有する。いくつかの実施形態では、複数コピーが、単一の遺伝子座において組み込まれている。いくつかの実施形態では、1コピー以上が、2つ以上の遺伝子座の各々において組み込まれている。いくつかの実施形態では、細胞内のApoEアイソフォームをコードする核酸は、同じプロモーターに機能的に連結される。いくつかの実施形態では、細胞内のApoEアイソフォームをコードする2つ以上の核酸は、異なるプロモーターに機能的に連結される。いくつかの実施形態では、細胞内のApoEアイソフォームをコードする2つ以上の核酸は、単一のプロモーターに機能的に連結される。いくつかの実施形態では、細胞内のApoEアイソフォームをコードする2つ以上の核酸は、同じプロモーターの個別のコピーに機能的に連結されている。いくつかの実施形態では、酵母細胞は、第1のApoEアイソフォームを含むポリペプチドをコードする核酸を1コピー以上、第2のApoEアイソフォームを含むポリペプチドをコードする核酸を1コピー以上、及び任意で、第3のApoEアイソフォームを含むポリペプチドをコードする核酸を1コピー以上、保有していてもよい。ApoEアイソフォームは、任意の組み合わせのApoE2、ApoE3、またはApoE4であってよい。この核酸は、1つ以上のプロモーターに機能的に連結される。この菌株は、本明細書に記載されているもののような、化合物スクリーニング、遺伝子スクリーニング、またはその両方のために使用され得る。いくつかの実施形態では、この菌株は、本明細書に記載されているもののような、ヒトApoEタンパク質結合パートナーを同定する方法において使用されてもよい。

【0093】

いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及び/または図に記載されているApoE2中等度毒性(intox)、ApoE3中等度毒性、またはApoE4中等度毒性菌株の0.5倍~2倍のApoEポリペプチドを細胞に産生させるかまたは含有させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及

び/または図に記載されているApoE2高毒性、ApoE3高毒性、またはApoE4高毒性菌株の0.5倍~2倍のApoEポリペプチドを細胞に産生させるかまたは含有させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及び/または図に記載されているApoE2中等度毒性、ApoE3中等度毒性、またはApoE4中等度毒性菌株の0.75倍~1.25倍のApoEポリペプチドを細胞に産生させるかまたは含有させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及び/または図に記載されているApoE2高毒性、ApoE3高毒性、またはApoE4高毒性菌株の0.75倍~1.25倍のApoEポリペプチドを細胞に産生させるかまたは含有させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及び/または図に記載されているApoE2中等度毒性、ApoE3中等度毒性、またはApoE4中等度毒性菌株とほぼ同じ量のApoEポリペプチドを細胞に産生させるかまたは含有させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及び/または図に記載されているApoE2高毒性、ApoE3高毒性、またはApoE4高毒性菌株とほぼ同じ量のApoEポリペプチドを細胞に産生させるかまたは含有させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの量は、ウェスタンブロットによって、蛍光によって、ELISAアッセイによって、表面プラズモン共鳴法(例えば、BIACORE)、質量分析、または他の好適なアッセイを使用して、判定されてもよい。本明細書で使用される「約」という用語は、別段の記載がある場合または文脈から明白である場合を除き、概して、ある数からいずれかの方向に(その数字を上回るかまたは下回って)1%の範囲内、もしくはいくつかの実施形態では5%の範囲内、またはいくつかの実施形態ではある数から10%の範囲内に含まれる数を含む(ただし、かかる数が可能値の100%を容認不可能なほど超過する場合を除く)。

【0094】

いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及び/または図に記載されているApoE2中等度毒性、ApoE3中等度毒性、またはApoE4中等度毒性菌株とほぼ同じレベルの毒性を細胞に示させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に、実施例及び/または図に記載されているApoE2高毒性、ApoE3高毒性、またはApoE4高毒性菌株とほぼ同じレベルの毒性を細胞に示させる、構築物を含有する。いくつかの実施形態では、「低毒性(lowtox)」菌株は、実施例及び/または図に記載されている中等度毒性菌株よりも少ないコピーを有する。例えば、いくつかの実施形態では、低毒性菌株は、ApoE2を含むポリペプチドをコードする核酸を2~3コピー、ApoE3を含むポリペプチドをコードする核酸を1~2コピー、またはApoE4を含むポリペプチドをコードする核酸を1コピー、有する。いくつかの実施形態では、酵母菌株は、発現時に毒性を引き起こさない構築物を含有する。いくつかの実施形態では、毒性レベルは、固形培養培地上で培養された酵母において測定される。いくつかの実施形態では、毒性レベルは、液体培養培地上で培養された酵母において測定される。いくつかの実施形態では、液体培養培地上で培養された酵母の毒性レベルは、ApoEタンパク質が発現される条件下に酵母細胞を置いた後、約20~約60時間に1回以上測定される。例えば、いくつかの実施形態では、毒性レベルは、ApoEタンパク質が発現される条件下に酵母細胞を置いた後、20~40時間の間の1つ以上の時点と40~60時間の間の1つ以上の時点とでほぼ同じである。

【0095】

いくつかの実施形態では、細胞増殖は、光学密度600(OD600)または細胞計数に基づいて測定される。いくつかの実施形態では、2つの菌株は、それらのOD600もしくは細胞の数が互いの $\pm 20\%$ 以内、 $\pm 10\%$ 以内、または $\pm 5\%$ 以内である場合、ApoEが発現される条件下にこれらの菌株が置かれた(または別の毒性誘導条件が課された)後の所与の時点で、ほぼ同じレベルの毒性を示す。

【0096】

ApoE媒介性毒性の調節因子

ある特定の遺伝子の過剰発現はApoE媒介性細胞毒性の調節をもたらすことが分かっている。これらの遺伝子のうち1個以上の発現を調節する化合物、またはコードされたタンパク質のうち1つ以上の活性を調節する化合物を使用して、ApoE媒介性毒性を調節することができる。毒性の調節、例えば、毒性の抑制または増強は、多様な異なる用途を有し得る。本発明のいくつかの態様では、これらの遺伝子のうち1個以上の発現を調節する化合物、またはコードされたタンパク質のうち1つ以上の活性を調節する化合物を使用して、ApoE媒介性毒性、例えば、ApoE4媒介性毒性を阻害することができる。本発明のいくつかの態様では、これらの遺伝子のうち1個以上の発現を調節する化合物、またはコードされたタンパク質のうち1つ以上の活性を調節する化合物を使用して、ApoE関連疾患、例えば、ApoE4関連疾患、例えば、アルツハイマー病などの神経変性疾患を治療または予防することができる。いくつかの実施形態では、これらの遺伝子のうち1個以上の発現を調節する化合物、またはコードされたタンパク質のうち1つ以上の活性を調節する化合物を使用して、ApoE媒介性毒性を増強することができる。ApoE媒介性毒性の増強は、例えば、ApoE媒介性毒性を阻害する遺伝子または化合物のさらなるスクリーニングを容易にするため、かつ/またはApoE媒介性障害の潜在的な治療薬を同定もしくは特性化するためのさらなるモデル系の開発において、有用であり得る。

10

20

30

40

50

【0097】

付随する実施例に詳述されるように、酵母細胞におけるApoEの発現に関連する細胞毒性を調節する(例えば、抑制または増強する)いくつかの遺伝子が同定されている。表1A、1B、2A、2B、2C、及び3は、過剰発現時にApoE毒性の増強遺伝子または抑制遺伝子として同定されている遺伝子の遺伝子名及びSaccharomyces Genome Database (SGD) ID、ならびに(表1A、1B、及び3において)これらの遺伝子によってコードされるタンパク質に関する非限定的な記述的情報を列記している。これらの遺伝子は、ApoE2、ApoE3、またはApoE4のいずれかを含むポリペプチドをコードする発現構築物を保有する酵母菌株内で行われた、酵母読み取り枠のプール型スクリーニングにおいて同定された。一次スクリーニングにおいて少なくとも1つのApoEアイソフォームの毒性の調節因子として同定されたヒットを、個別に形質転換して、ApoE2、ApoE3、またはApoE4のいずれかを含むポリペプチドをコードする発現構築物を保有する酵母菌株にすることによって試験した。再検証されたヒットの部分集合(実施例7参照)が、表3に列記されている。各遺伝子によってコードされるmRNA及びタンパク質の配列は、とりわけNCBI RefSeqデータベース、Universal Protein Resource (UniProt)データベース、またはSGDなどの様々なデータベースから得ることができる。

【0098】

酵母細胞におけるApoE媒介性毒性の調節因子として同定されたいくつかの酵母遺伝子は、ヒトにおける1個以上の相同遺伝子を有する。本明細書に記載されている酵母モデル系においてApoEが毒性を誘導する機序は、ヒト細胞においてApoE(例えば、ApoE4)が毒性を誘導する機序と同様であることが予想される。酵母細胞においてApoE媒介性毒性を調節するものと同定された酵母遺伝子の多くが、ヒトにおける相同遺伝子を有する。結果として、同定された酵母遺伝子(及びそれらのコードされたタンパク質)のヒト対応物は、ヒト細胞においてApoE媒介性毒性を調節する、例えば、抑制するための、有用な標的となることが予想される。概して、酵母遺伝子の「対応物」(「相同体」と互換的に使用される)、例えば、ヒト対応物は、配列類似性、構造的類似性、及び/または機能的類似性に基づいて同定され得る。いくつかの実施形態では、Homologene(完全に配列決定された様々な真核生物ゲノムの注釈付き遺伝子の中から相同体を自動検出するためのシステム、www.ncbi.nlm.nih.gov/homologeneにてワールドワイドウェブ上で利用可能)が使用される。当然ながら、配列及び/または他の特徴に基づいて相同体を同定する他の手段を使用してもよい。相同遺伝子が、該遺伝子によってコードされるタンパク質の相同性核酸配列、相同性アミノ酸配列、またはその両方として同定されてもよいことは理解されよう。相同構造は、例えば、N

MR、X線結晶学、分子モデリング、または他の方法によって決定される、予測されるかもしくは実験的に決定される2次元または3次元構造に基づいて同定されてもよい。ヒト遺伝子に関する本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、ヒト遺伝子は、本明細書において特定された酵母抑制因子または増強因子の相同体であり、当該相同性は、例えば、Homologene、BioMart-Ensembl、BLAST検索、構造的相同性を使用して、かつ/または相同性機能に基づいて同定されてもよい。

【0099】

表1Aまたは表1Bにおいて特定されるいくつかの酵母遺伝子は、1つ以上のヒト相同体を有する。表1C及び1Dは、それぞれ、表1A及び1Bに列記されている酵母遺伝子のヒト相同体、ならびにそれらの対応するUniProtアクセッション番号を列記している。表1Aまたは表1Bにおいて単一のアスタリスクで同定されている遺伝子は、アルツハイマー病危険因子である1つ以上のヒト相同体を有する。

10

【0100】

表2A、2B、及び2Cは、本明細書において特定されるヒト相同体のうちの特定のものに関する公式記号(HUGO Gene Nomenclature Committee)及びNational Center for Biotechnology Information(NCBI)遺伝子ID番号を列記している。ApoE媒介性毒性の修飾因子である酵母遺伝子の相同体として本明細書において特定されるいくつかのヒト遺伝子は、アルツハイマー病の既知の遺伝的危険因子であり、すなわち、かかる遺伝子の特定の対立遺伝子またはかかる遺伝子内の突然変異が、ADと関連する。例えば、これらの遺伝子の一部のある特定の対立遺伝子は、ADを有しない対照群よりも著しく高い頻度でADを有する個体に存在することが分かっており、故にADの危険対立遺伝子と見なされる。(ADの遺伝的危険因子を同定した研究の説明、及び他の関連情報については、Lambert JC, et al., Nat Genet. 2013; 45(12): 1452-8、及びこの文献中の参考文献を参照されたい)。既知のアルツハイマー病危険因子であるヒト相同体が、表2A、2B、及び2Cに列記されている。ヒト相同体遺伝子のNCBI遺伝子IDが、表2A、2B、及び2Cに列記されている。加えて、AXL2(表1A)及びSTE6(表1B)は、AD危険因子であるヒト相同体を有する酵母修飾因子である。それらのヒト相同体は、それぞれ、DSG2(遺伝子ID1829)及びABCA7(遺伝子ID10347)である。本開示の態様が、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているヒト相同体に言及する場合は必ず、本開示は、DSG2及びABCA7に関連する実施形態を提供する。

20

30

【0101】

表3は、ApoE4を発現する酵母細胞における増強因子または抑制因子として再検証されたヒットの部分集合を列記している(実施例7参照)。表3に列記されている酵母遺伝子のヒト相同体を含むさらなる詳細は、本明細書において、例えば、表1C、1D、2A、2B、及び2Cにおいて確認することができる。

【0102】

各遺伝子によってコードされるmRNA及びタンパク質の配列は、とりわけNCBI RefSeqデータベースまたはUniProtデータベースなどの様々なデータベースから得ることができる。

40

【0103】

(表1A)過剰発現されるとApoE毒性を調節する酵母遺伝子

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
PRS2	YER099C	5-ホスホー リボシル-1 (α) -ピロリン酸 シンターゼ、 PRPPを合成する	E 0.9	0.145	1.0	0.742	S 2.7	0.003
RVS167	YDR388W	エンドサイトーシス及 びエキソサイトーシス に關与するアクチン 結合タンパク質	S 1.1	0.353	S 1.5	0.003	S 1.1	0.220
PUP2*	YGR253C	20Sプロテアソームの α 5サブユニット	E 0.7	0.000	1.0	0.221	S 1.8	0.000
FPS1	YLL043W	アクアグリセロポリン、 細胞膜チャネル	S 1.1	0.121	1.0	1.000	S 1.3	0.000
RPT4	YOR259C	26Sプロテアソームの 19S制御粒子の ATPアーゼ	S 1.4	0.016	S 1.5	0.017	S 1.9	0.001
DCP2*	YNL118C	Dcp1p-Dcp2p デキャッピング酵素 複合体の 触媒サブユニット	S 1.2	0.002	S 1.1	0.132	S 2.4	0.000

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
MAD1	YGL086W	紡錘体形成チェック ポイントに関連する コイルドコイル タンパク質	S 1.1	0.223	S 1.1	0.018	S 2.1	0.000
CGI121	YML036W	EKC/KEOPS複合体の 構成要素	S 1.3	0.007	S 1.1	0.071	S 2.2	0.001
VPS53*	YJL029C	GARP (Golgi- associated retrograde protein) 複合体の構成要素	E 0.3	0.001	E 0.5	0.000	E 0.7	0.023
CDC73	YLR418C	Paf1p複合体の 構成要素	E 1.0	0.527	1.0	0.968	S 1.7	0.000
KRE11	YGR166W	輸送タンパク質粒子 (TRAPP) 複合体IIの 構成要素	S 1.3	0.013	1.0	0.927	S 1.7	0.000
SMD2	YLR275W	コアSmタンパク質 Sm D2	E 0.7	0.043	E 0.9	0.065	S 1.8	0.001
SIC1	YLR079W	サイクリン依存性 キナーゼ阻害因子(CKI)	E 0.9	0.082	E 0.9	0.053	S 1.3	0.000

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
PCL2	YDL127W	サイクリン、 サイクリン依存性 キナーゼPho85pと 相互作用する	S 1.2	0.154	1.1	0.022	S 1.9	0.000
KEL3	YPL263C	機能未知の 細胞質タンパク質	S 1.7	0.034	1.3	0.001	E 0.9	0.500
SLA1	YBL007C	細胞骨格タンパク質 結合タンパク質	E 0.9	0.172	1.0	0.355	S 1.3	0.008
GCD2	YGR083C	翻訳開始因子eIF2Bの δサブユニット	E 0.9	0.421	1.2	0.002	E 0.9	0.010
URA4*	YLR420W	ジヒドロオロターゼ	1.0	0.923	1.2	0.001	S 2.1	0.000
RRM3	YHR031C	rDNA複製及び Ty1転移に関与する DNAヘリカーゼ	S 1.2	0.052	1.2	0.022	S 2.1	0.000
MGT1	YDL200C	DNA修復メチル トランスフェラーゼ	S 1.1	0.120	1.2	0.005	S 1.6	0.000

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
		(6-O- メチルグアニン- DNAメチラーゼ)						
GPI8	YDR331W	GPIトランス アミダーゼ複合体の ER膜糖タンパク質 サブユニット	S 1.1	0.366	S 1.6	0.039	E 0.9	0.113
SEC62	YPL094C	Sec63複合体の 必須サブユニット	S 1.3	0.025	S 1.4	0.013	S 1.8	0.001
CWC24*	YLR323C	共通スプライシング 因子	S 1.3	0.000	S 1.3	0.000	S 1.6	0.000
GLK1	YCL040W	グルコキナーゼ	S 1.1	0.287	E 0.9	0.008	S 1.5	0.000
PGI1	YBR196C	解糖酵素 ホスホグルコース イソメラーゼ	E 0.9	0.153	S 1.3	0.006	S 1.7	0.003
GYP5	YPL249C	酵母Rabファミリー メンバーの GTPアーゼ活性化 タンパク質 (GAP)	S 1.1	0.049	S 1.1	0.168	S 1.9	0.002
GUD1	YDL238C	グアニンデアミナーゼ	S 1.1	0.093	E 0.9	0.216	S 2.0	0.001

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
VPS9*	YML097C	グアニン ヌクレオチド 交換因子 (GEF)	E 0.3	0.001	E 0.5	0.000	E 0.7	0.025
HXT17	YNR072W	ヘキソース トランスポーター	S 1.3	0.002	S 1.2	0.059	1.0	0.954
STE24	YJR117W	高度に保存された 亜鉛メタロ プロテアーゼ	S 1.6	0.000	1.0	0.684	E 0.9	0.375
HMG2	YLR450W	HMG-CoA レダクターゼ	E 0.5	0.003	E 0.8	0.612	S 1.3	0.098
ERG11	YHR007C	ラノステロール14- α -デメチラーゼ	E 0.8	0.080	S 1.3	0.262	E 0.8	0.171
ALG1*	YBR110W	マンノシル トランスフェラーゼ	S 1.3	0.003	S 1.3	0.002	1.3	0.050
OSH3	YHR073W	オキシステロール 結合タンパク質 ファミリーのメンバー	1.0	0.880	S 1.7	0.013	E 0.7	0.009
OSH2	YDL019C	7つのメンバーを 有するオキシステロール 結合タンパク質 ファミリーのメンバー	E 0.8	0.084	S 2.4	0.025	E 0.8	0.044
MRPL10	YNL284C	大サブユニットの ミトコンドリア リボソームタンパク質	1.0	0.383	E 0.9	0.066	S 2.2	0.001

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
MRP49	YKL167C	大サブユニットの ミトコンドリア リボソームタンパク質	1.0	0.810	S 1.2	0.003	S 1.2	0.006
ATP11	YNL315C	分子シャペロン	1.0	0.639	E 0.9	0.550	S 1.4	0.000
GNT1*	YOR320C	N-アセチル グルコサミン トランスフェラーゼ	E 0.9	0.206	S 1.3	0.003	S 1.8	0.002
YLR455 W	YLR455W	機能未知の 核タンパク質	1.0	0.824	E 0.5	0.000	E 0.7	0.054
PGS1	YCL004W	ホスファチジル グリセロール リン酸シンターゼ	1.0	0.855	1.0	0.257	E 0.9	0.316
SPO14	YKR031C	ホスホリパーゼD	E 0.7	0.008	E 0.9	0.683	E 0.8	0.032
INP52	YNL106C	ポリホスファチジル イノシトールホスファターゼ	S 1.2	0.035	1.0	0.510	E 0.7	0.029
REC102*	YLR329W	減数分裂組換えの 初期に関与する タンパク質	S 1.4	0.001	E 0.9	0.014	S 3.5	0.000
MHR1	YDR296W	ミトコンドリア内の 相同組換えに 関与するタンパク質	1.0	0.020	S 1.6	0.001	S 2.0	0.014

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
YAP1802	YGR241C	クラスリンケージ 構築に関与する AP180ファミリーの タンパク質	S 1.2	0.054	E 0.8	0.024	S 1.9	0.038
PER1	YCR044C	小胞体の タンパク質	1.0	0.810	S 1.9	0.020	S 1.3	0.020
STM1	YLR150W	栄養素ストレス下 での最適な翻訳に 必要とされる タンパク質	S 1.3	0.011	S 1.3	0.002	E 0.9	0.005
SPS4	YOR313C	胞子形成中に 発現が誘導される タンパク質	E 0.8	0.133	S 1.4	0.018	S 2.0	0.000
VTH2	YJL222W	推定膜糖タンパク質	S 2.2	0.015	S 2.9	0.008	S 3.0	0.011
YDL206 W	YDL206W	機能未知の 推定タンパク質	1.0	0.455	1.3	0.020	1.2	0.044
YPT32*	YGL210W	エキソサイトーシス 経路に関与するRab ファミリーGTPアーゼ	E 0.3	0.001	E 0.5	0.000	E 0.8	0.028

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
RPL34A	YER056C- A	リボソーム60S サブユニット タンパク質L34A	S 1.1	0.224	S 1.1	0.248	S 1.8	0.002
CDC42	YLR229C	小型rho様GTPアーゼ	S 1.3	0.084	S 1.3	0.000	E 0.9	0.201
ATG20	YDL113C	ソーティングネキシン ファミリーメンバー	E 0.8	0.076	S 1.6	0.046	1.8	0.000
PRP3*	YDR473C	スプライシング因子	S 1.1	0.011	S 1.4	0.000	2.0	0.000
RIM1	YCR028C- A	ミトコンドリア ゲノム維持に必須の ssDNA結合タンパク質	1.0	0.916	S 1.3	0.020	S 1.3	0.018
RRI2	YOL117W	GOP9シグナロソーム (GSN) 複合体の サブユニット	E 0.8	0.010	S 1.1	0.407	S 1.8	0.000
ORC3*	YLL004W	複製開始点認識 複合体 (ORC) の サブユニット	E 0.8	0.001	S 1.3	0.001	S 1.3	0.004
PML1*	YLR016C	RES複合体の サブユニット	S 1.2	0.236	S 1.4	0.001	S 1.7	0.001
TAD2	YJL035C	tRNA特異的アデニン -34デアミナーゼの サブユニット	E 0.9	0.006	E 0.9	0.045	1.2	0.001

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E3に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値	E4に対する 効果サイズ (抑制因子 (S)、 増強因子 (E))	P値
UBC9	YDL064W	Smt3p結合経路に 関与する SUMO結合酵素	E 0.9	0.419	S 1.3	0.002	E 0.9	0.179
YDL012C	YDL012C	保存された CYSTMモジュールを 有する尾部アンカー型 (Tail-anchored) 細胞膜タンパク質	E 0.9	0.094	S 1.1	0.202	S 1.5	0.000
MBP1*	YDL056W	転写因子	S 1.8	0.003	S 1.4	0.012	S 1.6	0.000
HAP4	YKL109W	転写因子	S 1.4	0.002	1.0	0.627	E 0.9	0.174
GPI17	YDR434W	膜貫通タンパク質	E 0.8	0.053	1.0	0.694	E 0.8	0.049
UBP15	YMR304W	タンパク質 脱ユビキチン化に 関与するユビキチン 特異的プロテアーゼ	E 0.6	0.001	E 0.8	0.008	E 0.8	0.062

* 少なくとも2つの菌株において $p < 0.004$ で有意

【0104】

(表1B) 過剰発現されると Apof 毒性を調節する酵母遺伝子

10

20

30

40

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
DIB1	YPR082C	U4/U6aU5 tri-snRNPの 17-kDa構成要素	1.0	0.550	S 1.1	0.237	E 0.7	0.003
NGL3	YML118W	ポリA RNAに対して 特異的な3' -5' エキソヌクレアーゼ	E 0.8	0.006	S 1.2	0.116	E 0.7	0.002
ADK1	YDR226W	プリン代謝に 必要とされる アデニル酸キナーゼ	E 0.9	0.215	E 0.9	0.130	S 1.5	0.001
ALT1	YLR089C	アラニン トランスアミナーゼ (グルタミン酸ピルビン酸 トランスアミナーゼ)	1.0	0.795	S 1.3	0.001	E 0.9	0.113
PRE10	YOR362C	20Sプロテアソームの α 7サブユニット	E 0.2	0.001	S 1.2	0.048	E 0.9	0.108
APE2*	YKL157W	アミノペプチダーゼ ytcII	E 0.7	0.001	E 0.8	0.015	E 0.6	0.002
RVS161	YCR009C	アンフィフィリン様 脂質ラフトタンパク質	E 0.9	0.088	S 1.1	0.061	S 1.5	0.001
LSC2	YGR244C	サクシニル-CoAリガーゼの β サブユニット	0.7	0.001	S 1.2	0.191	E 0.9	0.048

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
APL6	YGR261C	酵母AP-3複合体の β 3様サブユニット	E 0.9	0.001	S 1.2	0.036	E 0.9	0.584
RRI1	YDL216C	COP9シグナソーム (CSN) 複合体の 触媒サブユニット	E 0.8	0.010	S 1.3	0.003	S 1.5	0.065
CEX1	YOR112W	核アミノアシル化 依存性tRNA 搬出経路の構成要素	E 0.7	0.001	E 0.8	0.027	E 0.9	0.207
TRS130	YMR218C	輸送タンパク質粒子 (TRAPP) 複合体IIの構成要素	E 0.7	0.006	E 0.7	0.003	E 0.8	0.019
RPP0	YLR340W	リボソームストークの 保存されたリボソーム タンパク質P0	S 1.1	0.004	S 1.2	0.007	S 1.6	0.002
CYS4	YGR155W	シスタチオニン β-シクタンターゼ	E 0.6	0.006	E 0.9	0.118	S 1.8	0.000
CDD1	YLR245C	シチジンデアミナーゼ	E 0.9	0.179	S 1.2	0.018	S 1.3	0.000

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
ADE3	YGR204W	細胞質三機能酵素 C1-テトラヒドロ 葉酸シンターゼ	1.0	0.993	S 1.1	0.334	E 0.7	0.003
FOL3	0.0	葉酸生成成に 関与する ジヒドロ葉酸 シンターゼ	E 0.8	0.002	S 1.4	0.019	E 0.9	0.219
DUS1	YML080W	ジヒドロウリジン シンターゼ	S 1.1	0.416	1.0	0.727	S 1.7	0.001
NTG2	YOL043C	DNA N-グリコシラーゼ 及び脱プリン/ 脱ピリミジン部位 (AP) リアーゼ	E 0.6	0.000	S 1.1	0.157	E 0.8	0.018
CTS1	YLR286C	エンドキチナーゼ	E 0.7	0.012	S 1.1	0.102	E 0.6	0.002
YNR064C	YNR064C	エポキシド ヒドロラーゼ	E 0.9	0.422	1.0	0.496	1.6	0.001
XRN1*	YGL173C	進化的に保存された 5' -3' エキソヌクレアーゼ	E 0.5	0.002	1.0	0.769	E 0.6	0.001
STE14	YDR410C	ファルネシルシステイン -カルボキシルメチル トランスフェラーゼ	S 1.2	0.068	S 1.3	0.001	S 2.3	0.005

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
FBP1	YLR377C	フルクトース-1,6- ビスホスファターゼ	1.0	0.950	1.0	0.657	S 1.6	0.000
RPS31*	YLR167W	切断されてリボソーム タンパク質S31及び ユビキチンを産生する 融合タンパク質	E 0.7	0.000	E 0.9	0.060	E 0.6	0.001
MUK1	YPL070W	グアニン ヌクレオチド 交換因子 (GEF)	E 0.3	0.006	E 0.5	0.025	S 1.5	0.003
NHP6A*	YPR052C	高移動度 (HMG) タンパク質	E 0.7	0.000	E 0.9	0.400	E 0.6	0.001
AXL2	YIL140W	内在性 細胞膜タンパク質	E 0.9	0.083	S 1.2	0.002	1.0	0.912
SUR1	YPL057C	マンノシルイノシトール ホスホリルセラミド (MIPC) シンターゼ 触媒サブユニット	E 0.7	0.014	E 0.7	0.015	S 1.8	0.000
OMA1	YKR087C	ミトコンドリア 内膜の メタロエンド ペプチダーゼ	1.0	0.822	E 0.8	0.011	S 1.6	0.000
MES1	YGR264C	メチオニル- tRNAシンターゼ	E 0.8	0.084	1.0	0.792	E 0.7	0.003

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
PDC6	YGR087C	ピルビン酸 デカルボキシラーゼの マイナーアイソフォーム	E 0.7	0.009	E 0.8	0.002	S 1.2	0.198
ADK2	YER170W	ミトコンドリア アデニル酸キナーゼ	1.0	0.509	S 1.3	0.007	E 0.7	0.000
RMD9*	YGL107C	呼吸増殖に 必要とされる ミトコンドリア タンパク質	E 0.8	0.063	E 0.6	0.001	E 0.6	0.002
MRPL24*	YMR193W	大サブユニットの ミトコンドリア リボソームタンパク質	E 0.6	0.002	E 0.8	0.001	S 1.1	0.066
MRP4	YHL004W	小サブユニットの ミトコンドリア リボソームタンパク質	S 1.7	0.001	S 1.2	0.035	S 1.7	0.005
RSM10	YDR041W	小サブユニットの ミトコンドリア リボソームタンパク質	E 0.7	0.001	1.0	0.875	S 1.1	0.449
RSM26*	YJR101W	小サブユニットの ミトコンドリア リボソームタンパク質	E 0.5	0.003	E 0.7	0.000	E 0.9	0.120
PCF11	YDR228C	mRNA 3' 末端 プロセシング因子	E 0.8	0.032	E 0.8	0.001	E 0.8	0.017

遺伝子名	Saccharomyces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
AIM14	0.0	核周囲型ERに局在化するNADPHオキシダーゼ	E 0.4	0.000	E 0.8	0.074	1.0	0.426
COQ3*	YOL096C	0-メチルトランスフェラーゼ	1.1	0.001	E 0.5	0.018	S 1.8	0.000
CTF3*	YLR381W	Mcm16p及びMcm22pと複合体を形成する外側動原体タンパク質	E 0.7	0.001	E 0.8	0.011	E 0.6	0.001
RRD2	YPL152W	ペプチジル-プロリリンシノトランス-イソメラゼ	E 0.3	0.001	1.0	0.413	E 0.7	0.004
TIP20	YGL145W	ERへのCOPI小胞融合に必要とされる表在性膜タンパク質	E 0.9	0.431	1.0	0.367	S 1.2	0.001
PRM2	YIL037C	フェロモン制御されるタンパク質	S 1.2	0.025	S 1.2	0.069	S 1.5	0.000
TPS2	YDR074W	トレハロース-6-Pシンターゼ/ホスファターゼ複合体のホスファターゼサブユニット	E 0.5	0.004	E 0.5	0.003	E 0.7	0.018

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
PTP2	YOR208W	ホスホチロシン 特異的タンパク質 ホスファターゼ	E 0.6	0.004	E 0.6	0.003	E 0.8	0.043
STE6	YKL209C	細胞膜ATP 結合カセット (ABC) トランスポーター	E 0.8	0.041	E 0.7	0.000	1.0	0.500
ECM2	YBR065C	プレmRNA スプライシング因子	E 0.8	0.003	E 0.9	0.036	E 0.7	0.006
VRP1	YLR337C	プロリンに富むアク チン結合タンパク質	E 0.8	0.019	S 1.3	0.000	S 1.2	0.085
RPS6A	YPL090C	小 (40S) リボソーム サブユニットの タンパク質成分	E 0.8	0.001	E 0.9	0.087	E 0.9	0.071
MAK32	YCR019W	L-A dsRNA含有粒子の 安定性に必要な タンパク質	S 1.2	0.182	S 1.2	0.171	S 1.9	0.001
SPS18*	YNL204C	機能未知の タンパク質、 推定上の亜鉛結合 ドメインを含有する	E 0.7	0.000	S 1.1	0.206	E 0.6	0.002
TSR3	0.0	20SプレrRNA プロセシングに必要 とされるタンパク質	E 0.7	0.012	E 0.7	0.019	S 1.4	0.001

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
RMD6	YEL072W	胞子形成に必要と されるタンパク質	E 0.7	0.001	E 0.8	0.257	1.0	0.899
YER152C	YER152C	2-アミノアジピン酸 トランスアミナーゼ 活性を有する タンパク質	S 1.2	0.133	E 0.8	0.038	E 0.7	0.003
RAD23*	YEL037C	ユビキチン様 N末端を有する タンパク質	E 0.3	0.003	E 0.7	0.002	E 0.9	0.119
RIX7	YLL034C	AAAファミリーの 推定ATPアーゼ	E 0.6	0.003	E 0.7	0.049	E 0.8	0.031
YGR250c *	YGR250C	推定RNA結合 タンパク質	E 0.3	0.001	E 0.5	0.000	E 0.7	0.023
SUT2	YPR009W	Zn2Cys6 ファミリーの 推定転写因子	E 0.7	0.001	E 0.8	0.016	E 0.6	0.004
GIC2	YDR309C	重複性rho様 GTPアーゼCdc42p エフェクター	E 0.8	0.002	E 0.7	0.036	E 0.9	0.260
PRP5	YBR237W	DEADボックスファミリー におけるRNAヘリカーゼ	E 0.7	0.022	E 0.6	0.000	S 1.1	0.055
RPA14	YDR156W	RNAポリメラーゼ I サブユニットA14	S 1.3	0.028	E 0.9	0.179	S 1.4	0.000

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
RPA43	YOR340C	RNAポリメラーゼI サブユニットA43	E 0.8	0.001	E 0.8	0.017	E 0.9	0.289
RPC53	YDL150W	RNAポリメラーゼIII サブユニットC53	1.0	0.752	E 0.7	0.010	E 0.6	0.001
SAH1	YER043C	S-アデノシル-L- ホモシステイン ヒドロラーゼ	E 0.7	0.038	E 0.7	0.001	E 0.7	0.006
SIR4	YDR227W	サイレントクロマチン ドメインの構築に 関与する SIRタンパク質	E 0.7	0.001	E 0.9	0.501	E 0.8	0.105
SOR1	YJR159W	ソルビトール デヒドロゲナーゼ	E 0.8	0.002	S 1.2	0.022	E 0.7	0.015
ADY4*	YLR227C	減数分裂外斑の 構造的構成要素	E 0.8	0.002	E 0.9	0.236	E 0.6	0.002
HRP1	YOL123W	切断因子Iの サブユニット	E 0.4	0.001	1.0	0.868	S 1.1	0.250
CAB4	0.0	CoA合成タンパク質 複合体 (CoA-SPC)の サブユニット	S 1.4	0.024	S 1.3	0.006	E 0.8	0.001

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
HSE1	YHL002W	エンドソーム Vps27p-Hse1p 複合体のサブユニット	S 1.2	0.000	S 1.2	0.009	1.1	0.388
GET2	YER083C	GET複合体の サブユニット	E 0.8	0.003	S 1.2	0.005	E 0.9	0.080
SPT7	YBR081C	SAGA転写制御 複合体の サブユニット	E 0.7	0.001	S 1.2	0.166	E 0.7	0.008
SNF11	YDR073W	SWI/SNFクロマチン リモデリング 複合体の サブユニット	E 0.8	0.024	E 0.6	0.000	1.0	0.441
COX8	YLR395C	チトクロムc オキシダーゼ (複合体IV) の サブユニットVIII	E 0.8	0.002	S 1.2	0.012	E 0.9	0.239
FLO8	YER109C	転写因子	E 0.8	0.073	E 0.9	0.023	S 1.3	0.003
PDR3	YBL005W	多面的薬物耐性 ネットワークの 転写活性化因子	E 0.6	0.003	E 0.7	0.009	E 0.7	0.006

遺伝子名	Saccharo- myces Genome Database ID	説明	E2の再検証した OD/対照	P値	E3の再検証した OD/対照	P値	E4の再検証した OD/対照	P値
ANB1	YJR047C	翻訳延長因子eIF-5A	E 0.8	0.046	1.0	0.587	E 0.6	0.001
POM33	0.0	膜貫通 ヌクレオポリン	E 0.8	0.002	E 0.9	0.314	E 0.8	0.032
PTC7	YHR076W	2C型セリン/ スレオニン タンパク質 ホスファターゼ (PP2C)	S 1.1	0.008	S 1.2	0.018	S 1.5	0.000
AIR1*	YIL079C	亜鉛ナックル タンパク質	E 0.9	0.517	E 0.8	0.001	E 0.7	0.003
YJR008W	YJR008W	該当なし	E 0.7	0.218	E 0.7	0.000	E 0.7	0.142

*少なくとも2つの菌株において $p < 0.004$ で有意
【0105】

(表1C) 表1Aに列記されている酵母遺伝子のヒト相同体

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
ALG1	YBR110W	ALG1	Q9BT22
ATG20	YDL113C	SNX4	O95219
ATG20	YDL113C	PXK	Q7Z7A4
ATP11	YNL315C	ATPAF1	Q5TC12
CDC42	YLR229C	CDC42	P60953
CDC42	YLR229C	RAC2	P15153
CDC42	YLR229C	RAC1	P63000
CDC42	YLR229C	RAC3	P60763
CDC42	YLR229C	RHOQ	P17081
CDC42	YLR229C	RHOG	P84095
CDC42	YLR229C	RHOJ	Q9H4E5
CDC42	YLR229C	RHOU	Q7L0Q8
CDC42	YLR229C	RHOV	Q96L33
CDC42	YLR229C	RHOF	Q9HBH0
CDC42	YLR229C	RHOD	O00212
CDC73	YLR418C	CDC73	Q6P1J9
CGI121	YML036W	TPRKB	Q9Y3C4
CWC24	YLR323C	RNF113A	O15541
CWC24	YLR323C	RNF113B	Q8IZP6
DCP2	YNL118C	DCP2	Q8IU60
ERG11	YHR007C	CYP51A1	Q16850
FPS1	YLL043W	AQP9	O43315
FPS1	YLL043W	AQP3	Q92482
FPS1	YLL043W	AQP10	Q96PS8
GCD2	YGR083C	EIF2B4	Q9UI10
GLK1	YCL040W	HKDC1	Q2TB90
GLK1	YCL040W	HK2	P52789
GLK1	YCL040W	HK3	P52790
GLK1	YCL040W	HK1	P19367
GLK1	YCL040W	GCK	P35557
GNT1	YOR320C	KIAA1383	Q9P2G4
GPI17	YDR434W	PIGS	Q96S52
GPI8	YDR331W	PIGK	Q92643
GUD1	YDL238C	GDA	Q9Y2T3
GYP5	YPL249C	RABGAP1	Q9Y3P9
GYP5	YPL249C	EVI5	O60447
GYP5	YPL249C	RABGAP1L	Q5R372

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
GYP5	YPL249C	EVI5L	Q96CN4
GYP5	YPL249C	TBC1D1	Q86TI0
GYP5	YPL249C	TBC1D4	O60343
GYP5	YPL249C	USP6NL	Q92738
HAP4	YKL109W	ZNF654	Q8IZM8
HAP4	YKL109W	TSKS	Q9UJT2
HMG2	YLR450W	HMGCR	P04035
HXT17	YNR072W	SLC2A2	P11168
HXT17	YNR072W	SLC2A1	P11166
HXT17	YNR072W	SLC2A14	Q8TDB8
HXT17	YNR072W	SLC2A8	Q9NY64
HXT17	YNR072W	SLC2A3	P11169
HXT17	YNR072W	SLC2A6	Q9UGQ3
HXT17	YNR072W	SLC2A4	P14672
HXT17	YNR072W	SLC2A9	Q9NRM0
HXT17	YNR072W	SLC2A11	Q9BYW1
INP52	YNL106C	SYNJ1	O43426
INP52	YNL106C	SYNJ2	O15056
INP52	YNL106C	INPP5B	P32019
KEL3	YPL263C	KLHDC4	Q8TBB5
MAD1	YGL086W	ANKRD26	Q9UPS8
MAD1	YGL086W	CCDC144C	Q8IYA2
MAD1	YGL086W	TRIP11	Q15643
MAD1	YGL086W	TUFT1	Q9NNX1
MAD1	YGL086W	CALCOCO2	Q13137
MAD1	YGL086W	PHLDB2	Q86SQ0
MAD1	YGL086W	FSIP1	Q8NA03
MAD1	YGL086W	AZI2	Q9H6S1
MAD1	YGL086W	KRT10	P13645
MAD1	YGL086W	CCDC42	Q96M95
MAD1	YGL086W	KRT26	Q7Z3Y9
MAD1	YGL086W	SCEL	O95171
MAD1	YGL086W	PIK3R3	Q92569
MAD1	YGL086W	MIPOL1	Q8TD10
MAD1	YGL086W	RBBP8	Q99708
MBP1	YDL056W	ANK3	Q12955
MBP1	YDL056W	ANK2	Q01484
MBP1	YDL056W	ANKRD52	Q8NB46
MBP1	YDL056W	SDCCAG3	Q96C92

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
MBP1	YDL056W	ANKRD23	Q86SG2
MBP1	YDL056W	PPFIA1	Q13136
MBP1	YDL056W	ANKRD28	O15084
MBP1	YDL056W	KANK4	Q5T7N3
MBP1	YDL056W	DGKZ	Q13574
MBP1	YDL056W	ANKRD37	Q7Z713
MBP1	YDL056W	SNCAIP	Q9Y6H5
MGT1	YDL200C	MGMT	P16455
MRPL10	YNL284C	MRPL15	Q9P015
ORC3	YLL004W	CYP11B1	P15538
OSH2	YDL019C	OSBP	P22059
OSH2	YDL019C	OSBP2	Q969R2
OSH2	YDL019C	OSBPL7	Q9BZF2
OSH2	YDL019C	OSBPL1A	Q9BXW6
OSH2	YDL019C	OSBPL6	Q9BZF3
OSH2	YDL019C	OSBPL2	Q9H1P3
OSH2	YDL019C	OSBPL3	Q9H4L5
OSH3	YHR073W	OSBPL7	Q9BZF2
OSH3	YHR073W	OSBPL6	Q9BZF3
OSH3	YHR073W	OSBPL1A	Q9BXW6
OSH3	YHR073W	OSBPL3	Q9H4L5
OSH3	YHR073W	OSBPL2	Q9H1P3
PCL2	YDL127W	CCNYL2	Q5T2Q4
PCL2	YDL127W	CCNT1	O60563
PCL2	YDL127W	CNPPD1	Q9BV87
PER1	YCR044C	PGAP3	Q96FM1
PGI1	YBR196C	GPI	P06744
PGS1	YCL004W	PGS1	Q32NB8
PML1	YLR016C	SNIP1	Q8TAD8
PML1	YLR016C	KIAA0284	Q9Y4F5
PRP3	YDR473C	PRPF3	O43395
PRS2	YER099C	PRPS2	P11908
PRS2	YER099C	PRPS1	P60891
PRS2	YER099C	PRPS1L1	P21108
PRS2	YER099C	PRPSAP2	O60256
PRS2	YER099C	PRPSAP1	Q14558
PUP2	YGR253C	PSMA5	P28066
RIM1	YCR028C-A	SSBP1	Q04837
RPL34A	YER056C-A	RPL34	P49207

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
RPT4	YOR259C	PSMC6	P62333
RRM3	YHR031C	PIF1	Q9H611
RVS167	YDR388W	AMPH	P49418
RVS167	YDR388W	ITSN1	Q15811
RVS167	YDR388W	SH3D21	A4FU49
RVS167	YDR388W	ABI2	Q9NYB9
RVS167	YDR388W	FCHSD2	O94868
RVS167	YDR388W	SRC	P12931
RVS167	YDR388W	GRAP2	O75791
RVS167	YDR388W	ITSN2	Q9NZM3
RVS167	YDR388W	GRAP	Q13588
RVS167	YDR388W	PSTPIP1	O43586
RVS167	YDR388W	ABI1	Q8IZP0
RVS167	YDR388W	CTTN	Q14247
RVS167	YDR388W	CD2AP	Q9Y5K6
RVS167	YDR388W	HCLS1	P14317
RVS167	YDR388W	FCHSD1	Q86WN1
RVS167	YDR388W	NCK2	O43639
RVS167	YDR388W	PPP1R13L	Q8WUF5
RVS167	YDR388W	PACSIN2	Q9UNF0
RVS167	YDR388W	NCK1	P16333
RVS167	YDR388W	NEDD9	Q14511
SEC62	YPL094C	SEC62	Q99442
SIC1	YLR079W	SIPA1L3	O60292
SIC1	YLR079W	EVL	Q9UI08
SLA1	YBL007C	FGR	P09769
SLA1	YBL007C	OSTF1	Q92882
SLA1	YBL007C	FYN	P06241
SLA1	YBL007C	ITSN1	Q15811
SLA1	YBL007C	GRB2	P62993
SLA1	YBL007C	NCK1	P16333
SLA1	YBL007C	FCHSD2	O94868
SLA1	YBL007C	GRAP2	O75791
SLA1	YBL007C	NCK2	O43639
SLA1	YBL007C	EPS8L3	Q8TE67
SLA1	YBL007C	SORBS2	O94875
SLA1	YBL007C	SH3RF1	Q7Z6J0
SLA1	YBL007C	YES1	P07947
SLA1	YBL007C	PACSIN1	Q9BY11

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
SLA1	YBL007C	PACSIN2	Q9UNF0
SLA1	YBL007C	NCF1C	A8MVU1
SLA1	YBL007C	ITSN2	Q9NZM3
SLA1	YBL007C	SORBS1	Q9BX66
SLA1	YBL007C	SH3RF3	Q8TEJ3
SLA1	YBL007C	NCF1B	A6NI72
SMD2	YLR275W	SNRPD2	P62316
SPO14	YKR031C	PLD2	O14939
SPO14	YKR031C	PLD1	Q13393
STE24	YJR117W	ZMPSTE24	O75844
TAD2	YJL035C	ADAT2	Q7Z6V5
UBC9	YDL064W	UBE2I	P63279
UBP15	YMR304W	USP7	Q93009
UBP15	YMR304W	USP47	Q96K76
VPS53	YJL029C	VPS53	Q5VIR6
VPS9	YML097C	RABGEF1	Q9UJ41
VPS9	YML097C	GAPVD1	Q14C86
VPS9	YML097C	RIN2	Q8WYP3
VTH2	YJL222W	SORT1	Q99523
VTH2	YJL222W	SORL1	Q92673
VTH2	YJL222W	SORCS2	Q96PQ0
VTH2	YJL222W	SORCS1	Q8WY21
VTH2	YJL222W	SORCS3	Q9UPU3
YAP1802	YGR241C	PICALM	Q13492
YAP1802	YGR241C	SNAP91	O60641
YDL012C	YDL012C	MAGEC1	O60732
YDL012C	YDL012C	NCOR1P1	Q9H4R4
YDL012C	YDL012C	CCDC86	Q9H6F5
YDL012C	YDL012C	YLPM1	P49750
YDL206W	YDL206W	SLC24A6	Q6J4K2
YDL206W	YDL206W	SLC24A2	Q9UI40
YDL206W	YDL206W	SLC24A4	Q8NFF2
YDL206W	YDL206W	SLC24A3	Q9HC58
YDL206W	YDL206W	SLC24A5	Q71RS6
YDL206W	YDL206W	SLC24A1	O60721
YDL206W	YDL206W	OR8G5	Q8NG78
YLR455W	YLR455W	GLYR1	Q49A26
YPT32	YGL210W	RAB11B	Q15907
YPT32	YGL210W	RAB11A	P62491

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
YPT32	YGL210W	RAB25	P57735
YPT32	YGL210W	RAB14	P61106
YPT32	YGL210W	RAB13	P51153
YPT32	YGL210W	RAB2A	P61019
YPT32	YGL210W	RAB2B	Q8WUD1
YPT32	YGL210W	RAB4B	P61018
YPT32	YGL210W	RAB4A	P20338
YPT32	YGL210W	RAB43	Q86YS6
YPT32	YGL210W	RAB35	Q15286
YPT32	YGL210W	RAB30	Q15771
YPT32	YGL210W	RAB15	P59190
YPT32	YGL210W	RAB3D	O95716
YPT32	YGL210W	RAB3B	P20337
YPT32	YGL210W	RAB19	A4D1S5
YPT32	YGL210W	RAB3C	Q96E17
YPT32	YGL210W	RAB18	Q9NP72
YPT32	YGL210W	RAB22A	Q9UL26
YPT32	YGL210W	RAB39B	Q96DA2
ATG20	YDL113C	SNX7	Q9UNH6
ATG20	YDL113C	SNX18	Q96RF0
ATG20	YDL113C	SNX8	Q9Y5X2
ATG20	YDL113C	SNX2	O60749
ATG20	YDL113C	SNX1	Q13596
ATG20	YDL113C	SNX33	Q8WV41
ATG20	YDL113C	SNX5	Q9Y5X3
CDC42	YLR229C	RHOC	P08134
CDC42	YLR229C	RHOA	P61586
CDC42	YLR229C	RHOB	P62745
CDC42	YLR229C	RND3	P61587
CDC42	YLR229C	RHOH	Q15669
CDC42	YLR229C	RND2	P52198
CDC42	YLR229C	RND1	Q92730
CDC42	YLR229C	RHOBTB2	Q9BYZ6
CDC42	YLR229C	RHOBTB1	O94844
ERG11	YHR007C	CYP26A1	O43174
ERG11	YHR007C	CYP39A1	Q9NYL5
ERG11	YHR007C	CYP7A1	P22680
ERG11	YHR007C	CYP4F2	P78329
ERG11	YHR007C	CYP4F3	Q08477

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
ERG11	YHR007C	CYP26B1	Q9NR63
ERG11	YHR007C	CYP4F22	Q6NT55
ERG11	YHR007C	CYP4F8	P98187
ERG11	YHR007C	CYP4F12	Q9HCS2
ERG11	YHR007C	CYP4F11	Q9HBI6
ERG11	YHR007C	CYP3A43	Q9HB55
ERG11	YHR007C	CYP46A1	Q9Y6A2
ERG11	YHR007C	CYP4Z1	Q86W10
ERG11	YHR007C	CYP4A22	Q5TCH4
ERG11	YHR007C	CYP4A11	Q02928
ERG11	YHR007C	CYP4X1	Q8N118
ERG11	YHR007C	CYP3A7	P24462
ERG11	YHR007C	CYP27C1	Q4G0S4
ERG11	YHR007C	CYP3A4	P08684
FPS1	YLL043W	AQP7	O14520
FPS1	YLL043W	AQP4	P55087
FPS1	YLL043W	AQP6	Q13520
FPS1	YLL043W	AQP5	P55064
FPS1	YLL043W	AQP1	P29972
FPS1	YLL043W	AQP2	P41181
FPS1	YLL043W	AQP8	O94778
FPS1	YLL043W	MIP	P30301
GCD2	YGR083C	EIF2B1	Q14232
GCD2	YGR083C	EIF2B2	P49770
GNT1	YOR320C	GYG2	O15488
GNT1	YOR320C	GYG1	P46976
GPI8	YDR331W	LGMN	Q99538
GUD1	YDL238C	AMDHD1	Q96NU7
GUD1	YDL238C	AMDHD2	Q9Y303
GYP5	YPL249C	TBC1D10B	Q4KMP7
GYP5	YPL249C	TBC1D10A	Q9BXI6
GYP5	YPL249C	GRTP1	Q5TC63
GYP5	YPL249C	TBC1D14	Q9P2M4
GYP5	YPL249C	TBC1D10C	Q8IV04
GYP5	YPL249C	SGSM3	Q96HU1
GYP5	YPL249C	TBCK	Q8TEA7
GYP5	YPL249C	TBC1D2B	Q9UPU7
GYP5	YPL249C	TBC1D2	Q9BYX2
GYP5	YPL249C	TBC1D3F	A6NER0

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
GYP5	YPL249C	TBC1D3	Q8IZP1
GYP5	YPL249C	TBC1D3C	Q6IPX1
GYP5	YPL249C	TBC1D23	Q9NUY8
GYP5	YPL249C	TBC1D24	Q9ULP9
HXT17	YNR072W	SLC2A13	Q96QE2
HXT17	YNR072W	SLC2A7	Q6PXP3
HXT17	YNR072W	SLC2A5	P22732
HXT17	YNR072W	SLC2A12	Q8TD20
HXT17	YNR072W	SV2B	Q7L1I2
HXT17	YNR072W	SLC22A4	Q9H015
HXT17	YNR072W	SV2C	Q496J9
HXT17	YNR072W	SLC22A13	Q9Y226
HXT17	YNR072W	SLC2A10	O95528
HXT17	YNR072W	SLC22A1	O15245
HXT17	YNR072W	SLC22A6	Q4U2R8
INP52	YNL106C	SACM1L	Q9NTJ5
INP52	YNL106C	INPP5F	Q9Y2H2
KEL3	YPL263C	HCFC2	Q9Y5Z7
KEL3	YPL263C	LZTR1	Q8N653
KEL3	YPL263C	MKLN1	Q9UL63
KEL3	YPL263C	ATRNL1	Q5VV63
KEL3	YPL263C	ATRNL	O75882
MAD1	YGL086W	MAD1L1	Q9Y6D9
MBP1	YDL056W	CASKIN1	Q8WXD9
MBP1	YDL056W	ANKRD17	O75179
MBP1	YDL056W	ANKHD1	Q8IWZ3
MBP1	YDL056W	ANKRD30A	Q9BXX3
MBP1	YDL056W	UACA	Q9BZF9
ORC3	YLL004W	ORC3	Q9UBD5
OSH2	YDL019C	OSBPL8	Q9BZF1
OSH2	YDL019C	OSBPL5	Q9H0X9
OSH2	YDL019C	OSBPL9	Q96SU4
OSH2	YDL019C	OSBPL10	Q9BXB5
OSH2	YDL019C	OSBPL11	Q9BXB4
OSH3	YHR073W	OSBP2	Q969R2
OSH3	YHR073W	OSBP	P22059
OSH3	YHR073W	OSBPL8	Q9BZF1
OSH3	YHR073W	OSBPL5	Q9H0X9
OSH3	YHR073W	OSBPL9	Q96SU4

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
OSH3	YHR073W	OSBPL10	Q9BXB5
OSH3	YHR073W	OSBPL11	Q9BXB4
PCL2	YDL127W	CCNY	Q8ND76
PUP2	YGR253C	PSMA7	O14818
PUP2	YGR253C	PSMA4	P25789
PUP2	YGR253C	PSMA8	Q8TAA3
PUP2	YGR253C	PSMA3	P25788
PUP2	YGR253C	PSMA1	P25786
PUP2	YGR253C	PSMA2	P25787
PUP2	YGR253C	PSMA6	P60900
PUP2	YGR253C	PSMB6	P28072
RPT4	YOR259C	PSMC1	P62191
RPT4	YOR259C	PSMC5	P62195
RPT4	YOR259C	PSMC4	P43686
RPT4	YOR259C	PSMC2	P35998
RPT4	YOR259C	PSMC3	P17980
RPT4	YOR259C	ATAD3B	Q5T9A4
RPT4	YOR259C	ATAD3A	Q9NVI7
RRM3	YHR031C	HELB	Q8NG08
RVS167	YDR388W	SH3GL2	Q99962
RVS167	YDR388W	SH3GL1	Q99961
RVS167	YDR388W	SH3GL3	Q99963
RVS167	YDR388W	ARHGEF37	A1IGU5
RVS167	YDR388W	DNMBP	Q6XZF7
RVS167	YDR388W	BIN3	Q9NQY0
RVS167	YDR388W	BIN2	Q9UBW5
RVS167	YDR388W	SH3GLB1	Q9Y371
RVS167	YDR388W	BIN1	O00499
SLA1	YBL007C	SH3D19	Q5HYK7
SLA1	YBL007C	SH3KBP1	Q96B97
SLA1	YBL007C	NCF2	P19878
SLA1	YBL007C	SORBS3	O60504
SLA1	YBL007C	SH3PXD2A	Q5TCZ1
SLA1	YBL007C	STAC	Q99469
SLA1	YBL007C	GRAP	Q13588
SLA1	YBL007C	CRKL	P46109
SLA1	YBL007C	CD2AP	Q9Y5K6
SLA1	YBL007C	DNMBP	Q6XZF7
SLA1	YBL007C	SH3RF2	Q8TEC5

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
SLA1	YBL007C	SH3PXD2B	A1X283
SMD2	YLR275W	LSM3	P62310
SMD2	YLR275W	LSM5	Q9Y4Y9
TAD2	YJL035C	ADAT3	Q96EY9
UBC9	YDL064W	UBE2A	P49459
UBC9	YDL064W	UBE2B	P63146
UBC9	YDL064W	UBE2D1	P51668
UBC9	YDL064W	UBE2D4	Q9Y2X8
UBC9	YDL064W	UBE2D2	P62837
UBC9	YDL064W	UBE2D3	P61077
UBC9	YDL064W	UBE2G2	P60604
UBC9	YDL064W	UBE2E1	P51965
UBC9	YDL064W	UBE2E2	Q96LR5
UBC9	YDL064W	UBE2E3	Q969T4
UBC9	YDL064W	UBE2G1	P62253
UBC9	YDL064W	UBE2R2	Q712K3
UBC9	YDL064W	UBE2N	P61088
UBC9	YDL064W	CDC34	P49427
UBC9	YDL064W	UBE2S	Q16763
UBC9	YDL064W	UBE2U	Q5VVX9
UBC9	YDL064W	UBE2C	O00762
UBC9	YDL064W	UBE2T	Q9NPD8
UBC9	YDL064W	UBE2M	P61081
VPS9	YML097C	RIN3	Q8TB24
VPS9	YML097C	RINL	Q6ZS11
YPT32	YGL210W	RAB8B	Q92930
YPT32	YGL210W	RAB1B	Q9H0U4
YPT32	YGL210W	RAB8A	P61006
YPT32	YGL210W	RAB10	P61026
YPT32	YGL210W	RAB1A	P62820
YPT32	YGL210W	RAB5A	P20339
ALG1	YBR110W	ALG1L	Q6GMV1
ERG11	YHR007C	CYP26C1	Q6V0L0
UBP15	YMR304W	USP40	Q9NVE5
YDL206W	YDL206W	SLC8A2	Q9UPR5
YDL206W	YDL206W	SLC8A3	P57103
YDL206W	YDL206W	SLC8A1	P32418

10

20

30

40

【 0 1 0 6 】

(表1D) 表1Bに列記されている酵母遺伝子のヒト相同体

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
AIR1	YIL079C	P63145	P63145
AIR1	YIL079C	P62683	P62683
AIR1	YIL079C	P63126	P63126
AIR1	YIL079C	ERVK6	Q9Y6I0
AIR1	YIL079C	P62685	P62685
AIR1	YIL079C	P63130	P63130
AIR1	YIL079C	P87889	P87889
AIR1	YIL079C	P62684	P62684
AIR1	YIL079C	Q9YNA8	Q9YNA8
AIR1	YIL079C	P63128	P63128
AIR1	YIL079C	ERVK-5	Q9HDB9
AIR1	YIL079C	TRAF6	Q9Y4K3
ANB1	YJR047C	EIF5AL1	Q6IS14
APE2	YKL157W	NPEPPSL1	A6NEC2
AXL2	YIL140W	COBL	O75128
CTS1	YLR286C	SON	P18583
CTS1	YLR286C	RNF111	Q6ZNA4
FLO8	YER109C	ANKRD36	A6QL64
FLO8	YER109C	TNRC6A	Q8NDV7
GIC2	YDR309C	EXPH5	Q8NEV8
GIC2	YDR309C	PWWP2A	Q96N64
MUK1	YPL070W	ARHGEF26	Q96DR7
NHP6A	YPR052C	P0C6E5	P0C6E5
NHP6A	YPR052C	HMGB1P1	B2RPK0
PTP2	YOR208W	PTPRQ	Q9UMZ3
RPC53	YDL150W	KIAA1704	Q8IXQ4
RPP0	YLR340W	RPLP0P6	Q8NHW5
SIR4	YDR227W	ANKRD36	A6QL64
SIR4	YDR227W	ALS2CR11	Q53TS8
SIR4	YDR227W	BRCA2	P51587
SIR4	YDR227W	LRIF1	Q5T3J3
SPT7	YBR081C	CECR2	Q9BXF3
SPT7	YBR081C	ANGPT2	O15123
SPT7	YBR081C	CCDC144B	Q3MJ40
SPT7	YBR081C	SCEL	O95171
SPT7	YBR081C	FAM21B	Q5SNT6
SPT7	YBR081C	FAM21A	Q641Q2
SPT7	YBR081C	AGGF1	Q8N302

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
TIP20	YGL145W	CLEC4M	Q9H2X3
VRP1	YLR337C	MUC1	P15941
VRP1	YLR337C	MAGEE1	Q9HC15
VRP1	YLR337C	PRAM1	Q96QH2
VRP1	YLR337C	CEL	P19835
YGR250C	YGR250C	RBMY1C	P0DJD4
YGR250C	YGR250C	RBFOX3	A6NFN3
YNR064C	YNR064C	SERHL	Q9NQF3
ADE3	YGR204W	MTHFD2L	Q9H903
VRP1	YLR337C	WIPF3	A6NGB9
TIP20	YGL145W	LRRC45	Q96CN5
HSE1	YHL002W	ITSN1	Q15811
SPT7	YBR081C	PBRM1	Q86U86
SPT7	YBR081C	BRD2	P25440
HSE1	YHL002W	SH3D19	Q5HYK7
SPT7	YBR081C	BAZ1A	Q9NRL2
HSE1	YHL002W	GRAP2	O75791
SPT7	YBR081C	BAZ1B	Q9UIG0
HSE1	YHL002W	GRB2	P62993
SPT7	YBR081C	TRIM33	Q9UPN9
SPT7	YBR081C	BPTF	Q12830
SPT7	YBR081C	BRD7	Q9NPI1
PCF11	YDR228C	SCAF8	Q9UPN6
SPT7	YBR081C	BAZ2B	Q9UIF8
SPT7	YBR081C	BAZ2A	Q9UIF9
SPT7	YBR081C	BRD8	Q9H0E9
MUK1	YPL070W	RIN3	Q8TB24
YGR250C	YGR250C	CSTF2T	Q9H0L4
YGR250C	YGR250C	CSTF2	P33240
YGR250C	YGR250C	SLTM	Q9NWH9
YGR250C	YGR250C	SAFB	Q15424
NHP6A	YPR052C	CIC	Q96RK0
YGR250C	YGR250C	SAFB2	Q14151
ADE3	YGR204W	MTHFD2	P13995
SPS18	YNL204C	AGFG2	O95081
YGR250C	YGR250C	RBMY1B	A6NDE4
YGR250C	YGR250C	RBMY1E	A6NEQ0
YGR250C	YGR250C	RBMY1D	P0C7P1
YGR250C	YGR250C	RBMY1A1	P0DJD3

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
YGR250C	YGR250C	RBMY1F	Q15415
YGR250C	YGR250C	RBM18	Q96H35
YGR250C	YGR250C	DAZL	Q92904
AIR1	YIL079C	ZCCHC3	Q9NUD5
YGR250C	YGR250C	DAZ4	Q86SG3
NHP6A	YPR052C	SOX5	P35711
SPS18	YNL204C	AGFG1	P52594
RIX7	YLL034C	FIGNL1	Q6PIW4
RIX7	YLL034C	KATNAL1	Q9BW62
NHP6A	YPR052C	HMGB3	O15347
RIX7	YLL034C	FIGN	Q5HY92
NHP6A	YPR052C	SOX13	Q9UN79
PRP5	YBR237W	DDX18	Q9NVP1
CYS4	YGR155W	SDSL	Q96GA7
PRP5	YBR237W	DDX55	Q8NHQ9
HRP1	YOL123W	ELAVL3	Q14576
ALT1	YLR089C	CCBL2	Q6YP21
PRP5	YBR237W	DDX10	Q13206
CYS4	YGR155W	SRR	Q9GZT4
AIR1	YIL079C	CNBP	P62633
RIX7	YLL034C	ATAD2	Q6PL18
NHP6A	YPR052C	HMGB2	P26583
HSE1	YHL002W	HGS	O14964
ALT1	YLR089C	ACCS	Q96QU6
NHP6A	YPR052C	SOX3	P41225
NHP6A	YPR052C	SOX17	Q9H6I2
NHP6A	YPR052C	HMGB4	Q8WW32
ALT1	YLR089C	ACCSL	Q4AC99
NHP6A	YPR052C	HMGB1	P09429
PRP5	YBR237W	DDX39B	Q13838
PRP5	YBR237W	DDX6	P26196
PRE10	YOR362C	PSMB1	P20618
PRP5	YBR237W	DDX39A	O00148
NHP6A	YPR052C	SOX4	Q06945
PRP5	YBR237W	DDX4	Q9NQI0
PRP5	YBR237W	DDX49	Q9Y6V7
HRP1	YOL123W	ELAVL2	Q12926
RIX7	YLL034C	NSF	P46459
RRI1	YDL216C	PSMD14	O00487

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
YER152C	YER152C	GPT	P24298
ALT1	YLR089C	TAT	P17735
AIR1	YIL079C	ZCCHC13	Q8WW36
RPP0	YLR340W	MRT04	Q9UKD2
XRN1	YGL173C	XRN2	Q9H0D6
NHP6A	YPR052C	TOX4	O94842
NHP6A	YPR052C	SOX11	P35716
PRP5	YBR237W	DDX27	Q96GQ7
NHP6A	YPR052C	SOX7	Q9BT81
NHP6A	YPR052C	SOX1	O00570
PRP5	YBR237W	DDX5	P17844
STE6	YKL209C	ABCA12	Q86UK0
PRP5	YBR237W	DDX52	Q9Y2R4
NHP6A	YPR052C	SRY	Q05066
NGL3	YML118W	CNOT6	Q9ULM6
PRP5	YBR237W	DDX17	Q92841
AIR1	YIL079C	ZCCHC9	Q8N567
STE6	YKL209C	ABCA7	Q8IZY2
NHP6A	YPR052C	SOX21	Q9Y651
STE6	YKL209C	ABCA5	Q8WWZ7
HRP1	YOL123W	RBM15B	Q8NDT2
RRI1	YDL216C	STAMBPL1	Q96FJ0
HRP1	YOL123W	PUF60	Q9UHX1
STE6	YKL209C	ABCC6	O95255
STE6	YKL209C	ABCC2	Q92887
PRP5	YBR237W	DDX21	Q9NR30
PRP5	YBR237W	DDX23	Q9BUQ8
STE6	YKL209C	ABCA3	Q99758
STE6	YKL209C	ABCC1	P33527
PRP5	YBR237W	DDX59	Q5T1V6
PRP5	YBR237W	DDX43	Q9NXZ2
DUS1	YML080W	DUS2L	Q9NX74
STE6	YKL209C	ABCC3	O15438
NHP6A	YPR052C	SOX18	P35713
HRP1	YOL123W	RBMXL1	Q96E39
APL6	YGR261C	AP1B1	Q10567
NHP6A	YPR052C	SOX14	O95416
RVS161	YCR009C	BIN1	O00499
RSM10	YDR041W	RPS20	P60866

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
STE6	YKL209C	ABCC10	Q5T3U5
NHP6A	YPR052C	SOX15	O60248
STE6	YKL209C	ABCC9	O60706
HRP1	YOL123W	RBMXL2	O75526
PRP5	YBR237W	DDX53	Q86TM3
PRP5	YBR237W	DDX41	Q9UJV9
APL6	YGR261C	AP2B1	P63010
HRP1	YOL123W	RBMX	P38159
STE6	YKL209C	ABCC12	Q96J65
NGL3	YML118W	CCRN4L	Q9UK39
MRP4	YHL004W	RPSA	P08865
DUS1	YML080W	DUS4L	O95620
STE6	YKL209C	ABCC5	O15440
RIX7	YLL034C	PEX1	O43933
STE6	YKL209C	ABCC8	Q09428
HRP1	YOL123W	RBM15	Q96T37
ADK2	YER170W	AK1	P00568
STE6	YKL209C	ABCC11	Q96J66
NHP6A	YPR052C	SOX2	P48431
RRI1	YDL216C	MPND	Q8N594
NHP6A	YPR052C	HMGXB4	Q9UGU5
STE6	YKL209C	CFTR	P13569
MUK1	YPL070W	RABGEF1	Q9UJ41
STE6	YKL209C	ABCC4	O15439
SOR1	YJR159W	TP53I3	Q53FA7
VRP1	YLR337C	WIPF1	O43516
NTG2	YOL043C	MUTYH	Q9UIF7
RVS161	YCR009C	AMPH	P49418
SOR1	YJR159W	ZADH2	Q8N4Q0
CEX1	YOR112W	SCYL2	Q6P3W7
APL6	YGR261C	AP4B1	Q9Y6B7
RIX7	YLL034C	PEX6	Q13608
ADK1	YDR226W	AK7	Q96M32
STE6	YKL209C	ABCB5	Q2M3G0
SOR1	YJR159W	RTN4IP1	Q8WWV3
ADK2	YER170W	CMPK1	P30085
YGR250C	YGR250C	ELAVL2	Q12926
MAK32	YCR019W	ADK	P55263
PTP2	YOR208W	PTPN20A	Q4JDL3

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
ADK1	YDR226W	AK1	P00568
PTP2	YOR208W	PTPN18	Q99952
SOR1	YJR159W	VAT1L	Q9HCJ6
RIX7	YLL034C	VCP	P55072
RRI1	YDL216C	BRCC3	P46736
PTP2	YOR208W	PTPN3	P26045
PTP2	YOR208W	PTPN13	Q12923
CEX1	YOR112W	SCYL3	Q8IZE3
PTP2	YOR208W	PTPRA	P18433
SOR1	YJR159W	CRYZ	Q08257
ADK1	YDR226W	CMPK1	P30085
YGR250C	YGR250C	ELAVL4	P26378
MES1	YGR264C	MARS2	Q96GW9
PTP2	YOR208W	PTPN22	Q9Y2R2
PTP2	YOR208W	PTPRE	P23469
PRP5	YBR237W	DDX42	Q86XP3
PTP2	YOR208W	PTPN6	P29350
YER152C	YER152C	CCBL2	Q6YP21
PTP2	YOR208W	PTPN21	Q16825
ADK2	YER170W	AK5	Q9Y6K8
MAK32	YCR019W	RBKS	Q9H477
RIX7	YLL034C	SPATA5L1	Q9BVQ7
PTP2	YOR208W	PTPN14	Q15678
PTP2	YOR208W	PTPN12	Q05209
SOR1	YJR159W	MECR	Q9BV79
LSC2	YGR244C	ACLY	P53396
NGL3	YML118W	PDE12	Q6L8Q7
YNR064C	YNR064C	EPHX1	P07099
PRE10	YOR362C	PSMA5	P28066
PRE10	YOR362C	PSMA7	O14818
YNR064C	YNR064C	BPHL	Q86WA6
YGR250C	YGR250C	CELF1	Q92879
NHP6A	YPR052C	HMG20A	Q9NP66
YGR250C	YGR250C	CELF6	Q96J87
YER152C	YER152C	ACCS	Q96QU6
PRE10	YOR362C	PSMA2	P25787
PTP2	YOR208W	PTPRM	P28827
RIX7	YLL034C	SPATA5	Q8NB90
SOR1	YJR159W	ADH5	P11766

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
PTP2	YOR208W	PTPRG	P23470
SOR1	YJR159W	ADH1C	P00326
PTP2	YOR208W	PTPRK	Q15262
YGR250C	YGR250C	CELF2	O95319
PTP2	YOR208W	PTPRJ	Q12913
SOR1	YJR159W	ADH1B	P00325
SOR1	YJR159W	ADH1A	P07327
PTP2	YOR208W	PTPRS	Q13332
SOR1	YJR159W	ADH6	P28332
PRE10	YOR362C	PSMA8	Q8TAA3
PRE10	YOR362C	PSMA4	P25789
YER152C	YER152C	ACCSL	Q4AC99
PRE10	YOR362C	PSMA6	P60900
ADK1	YDR226W	AK5	Q9Y6K8
YNR064C	YNR064C	ABHD8	Q96I13
PTP2	YOR208W	PTPRC	P08575
PTP2	YOR208W	PTPRD	P23468
PTP2	YOR208W	PTPRF	P10586
SOR1	YJR159W	ADH4	P08319
FLO8	YER109C	SSBP2	P81877
NHP6A	YPR052C	SMARCE1	Q969G3
YER152C	YER152C	AADAT	Q8N5Z0
SOR1	YJR159W	ADH7	P40394
YNR064C	YNR064C	SERHL2	Q9H4I8
NHP6A	YPR052C	HMG20B	Q9P0W2
RRI1	YDL216C	COPS5	Q92905
PTP2	YOR208W	PTPRZ1	P23471
HRP1	YOL123W	HNRNPD	Q14103
RSM26	YJR101W	SOD2	P04179
ANB1	YJR047C	EIF5A2	Q9GZV4
PRE10	YOR362C	PSMA1	P25786
PDC6	YGR087C	HACL1	Q9UJ83
RVS161	YCR009C	BIN2	Q9UBW5
HRP1	YOL123W	SF3B4	Q15427
PDC6	YGR087C	ILVBL	A1L0T0
HRP1	YOL123W	TARDBP	Q13148
YNR064C	YNR064C	MEST	Q5EB52
HRP1	YOL123W	HNRNPA1	P09651
ALT1	YLR089C	GPT	P24298

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
HRP1	YOL123W	HNRNPA3	P51991
ADK2	YER170W	AK2	P54819
ANB1	YJR047C	EIF5A	P63241
HSE1	YHL002W	STAM	Q92783
YNR064C	YNR064C	ABHD6	Q9BV23
HRP1	YOL123W	HNRNPA0	Q13151
HRP1	YOL123W	MSI2	Q96DH6
HRP1	YOL123W	HNRNPA1L2	Q32P51
LSC2	YGR244C	SUCLG2	Q96I99
HRP1	YOL123W	HNRNPA2B1	P22626
HRP1	YOL123W	MSI1	O43347
DIB1	YPR082C	TXNL4A	P83876
HRP1	YOL123W	HNRNPAB	Q99729
NHP6A	YPR052C	TOX	O94900
APE2	YKL157W	NPEPPS	P55786
STE6	YKL209C	ABCB1	P08183
SAH1	YER043C	AHCY	P23526
STE6	YKL209C	ABCB4	P21439
ADE3	YGR204W	MTHFD1L	Q6UB35
APE2	YKL157W	ERAP1	Q9NZ08
HRP1	YOL123W	DAZAP1	Q96EP5
APE2	YKL157W	ERAP2	Q6P179
APE2	YKL157W	AQPEP	Q6Q4G3
APL6	YGR261C	AP3B2	Q13367
ADK2	YER170W	AK8	Q96MA6
SOR1	YJR159W	SORD	Q00796
RIX7	YLL034C	NVL	O15381
SUR1	YPL057C	A4GNT	Q9UNA3
SUR1	YPL057C	A4GALT	Q9NPC4
YNR064C	YNR064C	EPHX4	Q8IUS5
SAH1	YER043C	AHCYL1	O43865
YNR064C	YNR064C	EPHX3	Q9H6B9
NGL3	YML118W	ANGEL2	Q5VTE6
HSE1	YHL002W	STAM2	O75886
ADK1	YDR226W	AK2	P54819
ADK1	YDR226W	AK8	Q96MA6
APE2	YKL157W	TRHDE	Q9UKU6
ADK2	YER170W	AK4	P27144
ADK2	YER170W	AK3	Q9UIJ7

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
ADK1	YDR226W	AKD1	Q5TCS8
RRD2	YPL152W	PPP2R4	Q15257
RAD23	YEL037C	RAD23A	P54725
APE2	YKL157W	ANPEP	P15144
ADE3	YGR204W	MTHFD1	P11586
ADK1	YDR226W	AK4	P27144
FBP1	YLR377C	FBP1	P09467
ADK2	YER170W	AKD1	Q5TCS8
APE2	YKL157W	LNPEP	Q9UIQ6
ADK1	YDR226W	AK3	Q9UIJ7
AIR1	YIL079C	ZCCHC7	Q8N3Z6
ALT1	YLR089C	GPT2	Q8TD30
APE2	YKL157W	ENPEP	Q07075
APL6	YGR261C	AP3B1	O00203
AXL2	YIL140W	DAG1	Q14118
CDD1	YLR245C	CDA	P32320
CEX1	YOR112W	SCYL1	Q96KG9
COQ3	YOL096C	COQ3	Q9NZJ6
COX8	YLR395C	COX7C	P15954
CYS4	YGR155W	CBS	P35520
DIB1	YPR082C	TXNL4B	Q9NX01
DUS1	YML080W	DUS1L	Q6P1R4
ECM2	YBR065C	RBM22	Q9NW64
FBP1	YLR377C	FBP2	O00757
HRP1	YOL123W	HNRPDL	O14979
LSC2	YGR244C	SUCLA2	Q9P2R7
MES1	YGR264C	MARS	P56192
MRP4	YHL004W	MRPS2	Q9Y399
MRPL24	YMR193W	MRPL28	Q13084
NGL3	YML118W	ANGEL1	Q9UNK9
NTG2	YOL043C	NTHL1	P78549
OMA1	YKR087C	OMA1	Q96E52
PCF11	YDR228C	PCF11	O94913
PRE10	YOR362C	PSMA3	P25788
PRP5	YBR237W	DDX46	Q7L014
PTC7	YHR076W	PPTC7	Q8NI37
RAD23	YEL037C	RAD23B	P54727
RPA43	YOR340C	TWISTNB	Q3B726
RPC53	YDL150W	POLR3D	P05423

10

20

30

40

酵母遺伝子名	酵母 Systematic Name	ヒト遺伝子名	ヒトUniprot アクセッション番号
RPP0	YLR340W	RPLP0	P05388
RPS31	YLR167W	RPS27A	P62979
RPS6A	YPL090C	RPS6	P62753
RSM10	YDR041W	MRPS10	P82664
RVS161	YCR009C	BIN3	Q9NQY0
SAH1	YER043C	AHCYL2	Q96HN2
SPS18	YNL204C	ARFGAP1	Q8N6T3
STE14	YDR410C	ICMT	O60725
STE6	YKL209C	ABCB11	O95342
TIP20	YGL145W	RINT1	Q6NUQ1
TRS130	YMR218C	TRAPPC10	P48553
XRN1	YGL173C	XRN1	Q8IZH2
YJR008W	YJR008W	MEMO1	Q9Y316
YNR064C	YNR064C	EPHX2	P34913
FLO8	YER109C	SSBP3	Q9BWW4
SPT7	YBR081C	SUPT7L	O94864
VRP1	YLR337C	WIPF2	Q8TF74

10

20

【 0 1 0 7 】

(表 2 A) A p o E 2 媒介性毒性の修飾遺伝子

ApoE2 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ヒト相同体 ENTREZ 遺伝子ID
VTH2	2.2	0.015	SORL1	6653	SORT1	6272
RVS161	2.2	0.001	BIN1	274	BIN3	55909
SNA3	2.1	0.000				
PFS1	2.0	0.006				
MBP1	1.8	0.003			SDCCAG3	646891
ECM7	1.8	0.014				
YFR032C-B	1.8	0.012				
MRP4	1.7	0.001			MRPS2	51116
YHR131C	1.7	0.006			VPS72	6944
RAD30	1.7	0.024			POLH	5429
KEL3	1.7	0.034			KLHDC4	54758
RPL14A	1.7	0.030			RPL14	9045
UPF3	1.7	0.017			UPF3B	65109
STE24	1.6	0.000			ZMPSTE24	10269
SED4	1.6	0.004			FAM221B	
YFR018C	1.5	0.004			QPCT	25797
YER034W	1.5	0.001			SNPH	9751
YKL068W-A	1.4	0.004				
HAP4	1.4	0.002			TSKS	60385
HXT17	1.3	0.002			SLC2A2	6514
YHL026C	1.2	0.004				
SKS1	0.7	0.002			NEK1	4750
YFL052W	0.5	0.004				
NCL1	0.5	0.004				
XRN1	0.5	0.003			XRN1	54464

10

20

30

40

ApoE2 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ヒト相同体 ENTREZ 遺伝子ID
YOR394C-A	0.5	0.003				
TPS2	0.5	0.004				
RSM26	0.5	0.003			SOD2	6648
NEO1	0.5	0.005			ATP9B	374868
HRP1	0.4	0.001	CELF1	10658	MSI1	4440
VPS53	0.3	0.001			VPS53	55275
VPS9	0.3	0.001	RIN3	79890	RABGEF1	27342
ECM27	0.3	0.001	SLC24A4	123041	SLC24A6	80024
YPT32	0.3	0.001			RAB11B	9230
YNL050C	0.3	0.001				
PBP4	0.3	0.001			ZC3H4	23211
YGR250c	0.3	0.001	CELF1	10658	CSTF2	1478
PIN3	0.3	0.001	CASS4	57091	GRB2	2885
YKL100C	0.3	0.001	PSEN1	5663	HM13	81502

10

20

30

* 1.0 超の効果サイズは、過剰発現された場合に遺伝子が ApoE2 媒介性毒性の抑制因子であることを示す。1.0 未満の効果サイズは、過剰発現された場合に遺伝子が ApoE4 媒介性毒性の増強因子であることを示す。

【0108】

(表2B) ApoE3 媒介性毒性の修飾遺伝子

ApoE3 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ヒト相同体 ENTREZ 遺伝子ID
VTH2	2.9	0.008	SORL1	6653	SORT1	6272
OSH2	2.4	0.025			OSBP2	23762
EXO70	2.3	0.001				
GPI17	2.3	0.002			PIGS	94005
VRP1	2.2	0.002			MUC1	4582
SPO14	2.2	0.001	PLD3	23646	PLD2	5338
PGS1	2.2	0.003	PLD3	23646	PGS1	9489
YPT31	2.2	0.003				
YPT6	2.1	0.001				
SMP3	2.0	0.024			PIGZ	80235
PER1	1.9	0.020			PGAP3	93210
RVS161	1.9	0.002	BIN1	274	BIN3	55909
GPI8	1.9	0.004			PIGK	10026
SLX1	1.8	0.016			SLX1A	548593
PCD1	1.8	0.006			NUDT7	283927
MST1	1.7	0.006			TARS2	80222
OSH3	1.7	0.013	FERMT2	10979	OSBPL6	114880
PCD1	1.7	0.007			NUDT7	283927
YER175W-A	1.7	0.001				
MHR1	1.6	0.001				
RVS167	1.5	0.003	BIN1	274	ABI2	10152
LDB16	1.4	0.000				
YOL057W	1.4	0.000			DPP3	10072
RIM1	1.4	0.001	MEF2C	4208	SSBP1	6742
YKR011C	1.3	0.000				
ORC3	1.3	0.001			ORC3	23595

10

20

30

40

ApoE3 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ヒト相同体 ENTREZ 遺伝子ID
CDC42	1.3	0.000			CDC42	643336
UBC9	1.3	0.002			UBE2I	7329
ALG1	1.3	0.002			ALG1	56052
YLR177W	1.3	0.002				
YHR131C	1.3	0.003			VPS72	6944
KEL3	1.3	0.001			KLHDC4	54758
STM1	1.3	0.002				
YNL193W	1.3	0.002			POLK	51426
GCD2	1.2	0.002			EIF2B4	8890
YER034W	1.2	0.002			SNPH	9751
ALG3	1.2	0.004			ALG3	10195
BUD21	1.2	0.004			KANSL2	54934
VID22	1.2	0.004				
MRP49	1.2	0.003				
TDA4	1.2	0.003			TMEM56	148534
YPT32	0.5	0.000			RAB11B	9230
YLR455W	0.5	0.000	ZCWPW1	55063	GLYR1	84656
YKL100C	0.5	0.000	PSEN1	5663	HM13	81502
YGR250c	0.5	0.000	CELF1	10658	CSTF2	1478
VPS9	0.5	0.000	RIN3	9890	RABGEF1	27342
VPS53	0.5	0.000			VPS53	55275
TPS2	0.0	0.000				
SED4	0.5	0.000			FAM221B	392307
PIN3	0.5	0.000	CASS4	57091	GRB2	2885
PBP4	0.4	0.000			ZC3H4	23211
LDB19	0.5	0.000			ARRB1	408
HRP1	0.0	0.000	CELF1	10658	MSI1	4440
ECM27	0.5	0.000	SLC24A4	123041	SLC24A6	80024

10

20

30

40

* 1.0 超の効果サイズは、過剰発現された場合に遺伝子が ApoE3 媒介性毒性の抑制因子であることを示す。1.0 未満の効果サイズは、過剰発現された場合に遺伝子が ApoE4 媒介性毒性の増強因子であることを示す。

【 0 1 0 9 】

50

(表2C) ApoE4 媒介性毒性の修飾遺伝子

ApoE4 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ENTREZ 遺伝子ID
VTH2	3.0	0.011	SORL1	6653	SORT1	6272
PRS2	2.7	0.003			PRPS2	5634
ERG11	2.5	0.019			CYP51A1	1595
AHA1	2.5	0.010			AHSA1	10598
DCP2	2.4	0.000			DCP2	167227
YML007C-A	2.4	0.000				
STE14	2.3	0.005			ICMT	23463
PER1	2.3	0.025			PGAP3	93210
BRE5	2.3	0.011			ZNF804A	91752
YFR018C	2.2	0.000			QPCT	25797
MRPL10	2.2	0.001			MRPL15	29088
CGI121	2.2	0.001			TPRKB	51002
YBR096W	2.1	0.001			THEM6	
ILM1	2.1	0.001				
YLR413W	2.1	0.000				

10

20

30

ApoE4 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ENTREZ 遺伝子ID
RRM3	2.1	0.000			PIF1	80119
YDL144C	2.1	0.001				
URA4	2.1	0.000				
MAD1	2.1	0.000			ANKRD26	22852
YTA12	2.1	0.006			AFG3L2	10939
YBR139W	2.0	0.000			CTSA	5476
GUD1	2.0	0.001			GDA	9615
EXO70	2.0	0.042				
MHR1	2.0	0.014				
MDH3	2.0	0.011			MDH2	4191
SPS4	2.0	0.000				
PRP3	2.0	0.000			PRPF3	9129
GYP5	1.9	0.002			RABGAP1	23637
HMS2	1.9	0.018			HSF2	3298
MAK32	1.9	0.001			ADK	132
DCG1	1.9	0.001				
PCL2	1.9	0.000			CCNYL2	414194
YAP1802	1.9	0.038	PICALM	8301	PICALM	8301
YFR032C-B	1.9	0.008				
GPI8	1.9	0.063			PIGK	10026
RPT4	1.9	0.001			PSMC6	5706
SEC62	1.8	0.001			SEC62	7095
RPL34A	1.8	0.002			RPL34	6164
SMD2	1.8	0.001			SNRPD2	119358
YHR131C	1.8	0.011			VPS72	6944
GNT1	1.8	0.002			KIAA1383	54627
YOR385W	1.8	0.000				

10

20

30

40

ApoE4 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ENTREZ 遺伝子ID
RPL35A	1.8	0.007			RPL35	11224
CYS4	1.8	0.000			CBS	875
COQ3	1.8	0.000			COQ3	51805
YDL199C	1.8	0.009			SLC2A13	114134
SLA1	1.8	0.094	CD2AP	23607	EPS8L3	79574
SRB5	1.7	0.005				
PUP2	1.8	0.000			PSMA5	5686
ATG20	1.8	0.000			PXK	54899
SUR1	1.8	0.000			A4GNT	51146
YLR149C	1.8	0.001				
CDC73	1.7	0.000			CDC73	79577
RRI2	1.8	0.000				
PGI1	1.7	0.003			GPI	2821
DUS1	1.7	0.001			DUS1L	64118
MRP4	1.7	0.005			MRPS2	51116
PML1	1.7	0.001			SNIP1	79753
KRE11	1.7	0.000				
RPS26B	1.7	0.004			RPS26P11	441502
IES6	1.7	0.021			INO80C	125476
TRM112	1.7	0.018			TRMT112	391358
MBP1	1.6	0.000			SDCCAG3	646891
YCL042W	1.6	0.002				
RAD14	1.6	0.004			XPA	7507
MGT1	1.6	0.000			MGMT	4255
RPP0	1.6	0.002			RPLP0	122589
CWC24	1.6	0.000			RNF113A	7737
OMA1	1.6	0.000			OMA1	115209

10

20

30

40

ApoE4 修飾因子の 遺伝子名	効果 サイズ*	P値	既知の AD危険因子 である ヒト相同体	AD危険因子 の ENTREZ 遺伝子ID	ヒト相同体	ENTREZ 遺伝子ID
YNR064C	1.6	0.001			EPHX4	253152
POR1	1.6	0.004			VDAC3	7419
FBP1	1.6	0.000			FBP1	2203
PTC7	1.5	0.000			PPTC7	160760
YDL012C	1.5	0.000			MAGEC1	9947
PRM2	1.5	0.000				
MUK1	1.5	0.003	RIN3	79890	RIN3	79890
RVS161	1.5	0.001	BIN1	55909	BIN3	55909
ADK1	1.5	0.001			AK2	204
GLK1	1.5	0.000			HKDC1	80201
ATP11	1.4	0.000			ATPAF1	64756
FPS1	1.3	0.000			AQP9	366
SIC1	1.3	0.000			SIPA1L3	23094
TAD2	1.2	0.001			ADAT2	134637
RPL38	0.5	0.001			RPL38	6169
PPH21	0.5	0.001			PPP2CB	5516
NAR1	0.5	0.000			NARFL	64428

10

20

30

* 1.0 超の効果サイズは、過剰発現された場合に遺伝子が ApoE4 媒介性毒性の抑制因子であることを示す。1.0 未満の効果サイズは、過剰発現された場合に遺伝子が ApoE4 媒介性毒性の増強因子であることを示す。

【 0 1 1 0 】

(表 3) 再検証された ApoE4 毒性の修飾遺伝子の一覧 (実施例 7 参照)

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
PGI1	PhosphoGlucosylomerase	解糖酵素ホスホグルコースイソメラーゼ；グルコース-6-ホスフェート及びフルクトース-6-ホスフェートの相互変換を触媒する；細胞周期進行及び胞子形成の糖新生事象の完了に必要とされる
SLX1	Synthetic Lethal of unknown (X) function	DNA組換え及び修復に関与するエンドヌクレアーゼ；複合体のサブユニット
PGS1	Phosphatidyl Glycerolphosphate Synthase	ホスファチジルグリセロールリン酸シンターゼ；カルジオリピン生成の第1の関与及び速度制限段階においてCDP-ジアシルグリセロール及びsn-グリセロール3-ホスフェートからのホスファチジルグリセロールリン酸の合成を触媒する
LDB16	Low Dye Binding	機能未知のタンパク質；ヌル変異体は、減少した正味の細胞表面負電荷を有する；GFP融合タンパク質発現は、DNA傷害剤MMSに応答して誘導される；天然タンパク質は、精製されたミトコンドリア内で検出される
GLK1	GLucoKinase	グルコキナーゼ；グルコース代謝の第1の不可逆ステップにおいてC6におけるグルコースのリン酸化を触媒する；3つのグルコースリン酸化酵素のうちの1つ；非発酵性炭素源によって発現が制御される；GLK1はパラログを有する
RVS161	Reduced Viability on Starvation	アンファイアイン様脂質ラフトタンパク質；Rvs167pと相互作用し、アクチン細胞骨格の極性化を制御する
MAK32	MAintenance of Killer	L-A d s RNA含有粒子の安定性に必要なタンパク質
PER1	Protein Processing in the ER	小胞体のタンパク質；脂質ラフトとのGPIアンカー型タンパク質の会合のための必要条件としてGPIアンカーをリモデリングするGPI-ホスホリパーゼA2活性に必要とされる；ヒトオルソログPERLD1によって機能的に補完される
SED4	Suppressor of Erd2 Deletion	Sar1p GTPアーゼ活性を刺激する内在性ER膜タンパク質；膜からリポソーム上へのコートタンパク質の解離を介してCOPII小胞出芽に関与する；Sec16pに結合する；SED4はパラログを有する
IES6	Ino Eighty Subunit	INO80クロマチンリモデリング複合体の構成要素；INO80機能に非常に重要；染色体分離の制御及び正常な動原体クロマチン構造の維持に関与する；ヒトオルソログINO80CはヒトINO80複合体のメンバーである；RAD52上位遺伝子との遺伝子相互作用に基づくDNA修復に関係する

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
PRS2	Phospho Ribosylpyrophosphate Synthetase	5-ホスホーリボシル-1 (アルファ) - ピロリン酸シンテンターゼ
RPS26B	Ribosomal Protein of the Small subunit	小 (40S) リボソームサブユニットのタンパク質成分； 哺乳動物リボソームタンパク質 S26 と相同
UBP3	UBiquitin-specific Protease	輸送及び浸透圧応答に関するユビキチン特異的プロテアーゼ；Bre5p と相互作用して ER とゴルジとの間の順行性及び逆行性の輸送を同時制御する；Hog1p による Ser695 におけるリン酸化を介する浸透圧ストレス (osmotic stress) に応答する 転写延長に関する；遺伝子サイレンシングの阻害因子；ユビキチン融合物を切断するが ポリユビキチンは切断しない；mRNA 結合活性も有する；DNA 複製ストレスに タンパク質存在量が増加する；リボファアジール (ribophagy) に関与
MRP4	Mitochondrial Ribosomal Protein	小サブユニットのミトコンドリアリボソームタンパク質
RRM3	rDNA Recombination Mutation	rDNA 複製及び Ty1 転位に関する DNA へリカーゼ；インピボで G4 モチーフに 結合し DNA 損傷を抑制する；テロメア領域における複製フォーク休止を解除する； Pif1p に構造的かつ機能的に関連する
OSH3	OxySterol binding protein Homolog	オキシステロール結合タンパク質ファミリーのメンバー；このファミリーは S.セレビシエに おいて 7 つのメンバーを有する；ファミリーメンバーは重複を有する
PTC7	Phosphatase type Two C	2C 型セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼ (PP2C)；選択的にスプライシング されて 2 つの mRNA アイソフォームを生み出す；スプライス型のタンパク質はミトコンドリア に局在化し、未スプライシング型ものは核膜に局在化する；デメトキシ-Q6 ヒドロキシラーゼ Coq7p の脱リン酸化によって補酵素 Q6 生合成を活性化する
PFS1	Prosopore Formation at Spindles	前胞子膜形成に必要とされる胞子形成タンパク質；選択された紡錘極における前胞子膜形成に 必要とされる；第二減数分裂中の 4 つ全ての紡錘極体の機能性を確保にする； 減数分裂組換えまたは減数分裂染色体分離には必要とされない
PRM2	Pheromone-Regulated Membrane protein	フェロモン制御されるタンパク質；4 つの膜貫通セグメント及び 1 つのコイルドコイルドメイン を有すると予測される；Ste12p によって制御される；効率的な核融合に必要とされる
UBP7	UBiquitin-specific Protease	ユビキチンタンパク質融合物を切断するユビキチン特異的プロテアーゼ； UBP7 はパラログを有する
DCG1	Dal180p-Controlled Gene	機能未知のタンパク質；発現は窒素異化産物抑制に対して感応性であり、 Dal180p によって制御される；膜貫通ドメインを含有する

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
RPL14A	Ribosomal Protein of the Large subunit	リボソーム60Sサブユニットタンパク質L14A；N末端がアセチル化されている；哺乳動物リボソームタンパク質L14と相同
UFD4	Ubiquitin Fusion Degradation protein	ユビキチンタンパク質リガーゼ (E3)；R p t 4 p 及びR p t 6 p と相互作用する
HCS1	dna HeliCaSe	六量体DNAポリメラーゼα結合性DNAヘリカーゼA；ラギング鎖DNA合成に関与する；一本鎖DNA刺激したATPアーゼ及びd ATPアーゼ活性を含む；複製タンパク質Aはヘリカーゼ及びATPアーゼ活性を刺激する
YPF1	Yeast Presenilin-like Family 1	核周囲型ER膜の膜内アスパルチルプロテアーゼ；ミスフォールドタンパク質ではなく機能性タンパク質を分解するER関連分解 (ERAD) の分岐点で作用する；飢餓応答中の高親和性細胞膜トランスポーターの存在量を制御する；プレセニン折り畳み構造を有する；膜内プロテアーゼのG x G D フォアミリーのメンバー；最も近いヒト相団体はシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) である
MST1	Mitochondrial aminoacyl-tRNA Synthetase	スレオニン-tRNAリガーゼMST1
OMA1	Overlapping activity with M-AAA protease	ミトコンドリア内膜のメタロエンドペプチダーゼ；様々な恒常性損傷原因に対する適応応答及び損傷誘発条件下での正常なミトコンドリア機能の保存のために重要；膜包埋タンパク質の代謝回転に関与する；c o a 2 変異体細胞内でC o x 1 p の分解を媒介する；原核生物及び高等真核生物における予測される膜結合メタロペプチダーゼのフォアミリーメンバー
RPL34A	Ribosomal Protein of the Large subunit	リボソーム60Sサブユニットタンパク質L34A；哺乳動物リボソームタンパク質L34と相同
APC11	Anaphase Promoting Complex	触媒コアサブユニット
OSH2	OxySterol binding protein Homolog	S. セレビスエにおける7つのメンバーを有するオキシステロール結合タンパク質ファミリーのメンバー；
PBP4	Pbp1p Binding Protein	P b p 1 p 結合タンパク質；酵母ツウハイブリッド系においてP a b 1 p 結合タンパク質1 (P b p 1 p) と強力に相互作用する；同時精製アッセイにおいてL s m 1 2 p とも相互作用する；DNA複製ストレスを受けると核に対する相対分布が増加する

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
MBP1	Mlul-box Binding Protein	転写因子；G1期からS期への細胞周期進行の制御に関与する
MDH3	Malate DeHydrogenase	ペルオキシソームリンゴ酸デヒドロゲナーゼ；リンゴ酸とオキサロ酢酸との相互変換を触媒する；グリオキシシル酸回路に関与する
ATG20	AuTophagy related	オートファゴソーム形成に関与する；細胞質から液胞へのターゲティング(Cvt)経路及びオートファゴソーム形成に必要とされる；ホスファチジルイノシトール3-リン酸に結合するPhox相同性ドメインを有する；Snx4pと相互作用する；潜在的なCdc28p基質サイクリン
PCL2	Pho85 CycLin	タンパク質ホスファターゼ2A (PP2A) の触媒サブユニット；Pph22pと機能的に重複；C末端でメチル化されている；いくつかの制御性サブユニットと代替複合体を形成する；シグナル伝達及び有糸分裂の制御に関与する；DNA複製ストレスを受けると核内フォークス形成する；PPH21はパラログを有する
RPL35A	Ribosomal Protein of the Large subunit	リボソーム60Sサブユニットタンパク質L35A；哺乳動物リボソームタンパク質L35及び細菌性L29と相同；RPL35Aはパラログを有する
MGT1	O-6-MethylGuanine-DNA methyltransferase	DNA修復メチルトランスフェラーゼ (6-O-メチルグアニン-DNAメチラーゼ)；DNAアルキル化損傷からの保護に関与する
GUD1	GUanine Deaminase	グアニンデアミナーゼ；グアニンからキサンチン及びアデニンを生成する グアニン再利用経路の異化酵素；活性は対数増殖期の培養物では低い、発現はジオキシー後および定常期の培養物では上昇する
TPS2	Trehalose-6-phosphate PhoSphatase	トレハロース6-Pシンターゼ/ホスファターゼ複合体のホスファターゼサブユニット；貯蔵炭水化物トレハロースの合成に関与する；発現はストレス条件によって誘導され、DNA複製ストレスにตอบสนองしてタンパク質存在量が増加する
AHA1	Activator of Heat shock protein 90 ATPase	Hsp82pに結合し、そのATPアーゼ活性を活性化するコシヤペロン；プロトンバリアントの決定に関与する；Hch1pに類似；熱ショックなどのストレスによって発現が制御される；DNA複製ストレスにตอบสนองしてタンパク質存在量が増加する
ADK1	ADenylate Kinase	アデニル酸キナーゼ
MHR1	Mitochondrial Homologous Recombination	ミトコンドリア内の相同組換えに関与するタンパク質；組換え依存性mtDNA分配に必要とされる；酸化ストレスにตอบสนองするミトコンドリアDNA複製の刺激に関与する

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
GPI8	Glycosyl Phosphatidylinositol anchor biosynthesis	GPIトランスアミダーゼ複合体のER膜糖タンパク質サブユニット； 新しく合成されたタンパク質にグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーを 付加する；ヒトPIG-Kタンパク質は機能的相同体である
RVS167	Reduced Viability on Starvation	エンドサイトーシス及びエキソサイトーシスに関与するアクチン結合タンパク質； Rvs161pと相互作用してアクチン細胞骨格を制御する
STE14	STERile	ファルネシルシステイン-カルボキシルメチルトランスフェラーゼ；小胞体におけるa因子及び RASタンパク質のC末端CAAAXモチーフプロセシング中のカルボキシルメチル化ステップを媒介する
RAD30	RADiation sensitive	DNAポリメラーゼη；複製後修復中の損傷乗り越え合成に関与する；シクロブタン型 ピリミジン二量体及び他の損傷に反するDNAの合成を触媒する；複製後の損傷に誘導される ゲノム全体の接着の形成に関与する；ミトコンドリア変異誘発からの保護にも関与し得る； ヒトpol ηにおける変異はXPVの原因となる
PRP3	Pre-mRNA Processing	スプライシング因子；U4/U6-U5 snRNP複合体の構成要素
MAD1	Mitotic Arrest-Deficient	紡錘体形成チェックポイントに関与するコイルドコイルタンパク質；紡錘体形成チェック ポイント停止の際のカリオオフェリン/インボーチンPse1p (別称Kap121p) の阻害に 必要とされる；後期促進複合体活性の阻害につながるチエックポイント活性化の際に Mps1pによってリン酸化される；Mad2pと複合体を形成する；MAD1とMAD2との 間の遺伝子量不均衡は染色体不安定性につながる
YPT32	Yeast Protein Two	エキソサイトーシス経路に関与するRabファミリー-GTPアーゼ；ゴルジ体間輸送または トランスゴルジからのゴルジ後小胞の出芽を媒介する；DNA複製ストレスに応答して タンパク質存在量が増加する；YPT32はパラログを有する
UPF3	UP Frameshift	Nam7p及びNmd2pと共にナンセンス変異依存mRNA分解機構 (NMD) 経路の構成要素； ナンセンスコドンを含有するmRNAの分解に関与する； テロメア維持に関与する
SRB5	Suppressor of RNA polymerase B	RNAポリメラーゼIIメダイエーター複合体のサブユニット；コアポリメラーゼサブユニット と会合してRNAポリメラーゼIIホロ酵素を形成する；転写制御に必須； 一部の遺伝子の適切な転写終結に必要とされる；テロメア維持に関与する
CYS4	CYSThionine beta- synthase	シスタチオンベーターシンターゼ； セリン及びホモシステインからのシスタチオニンの合成を触媒する

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
TRS65	TRapp Subunit	輸送タンパク質粒子 (TRAPP) 複合体 I I の構成要素; TRAPPI I は、GTPアーゼ Y p t 1 p の多量体グアニヌクレオチド交換因子である
CRM1	Chromosome Region Maintenance	主要なカリオフェリン; タンパク質の搬出に関与する
YAP1802	Yeast Assembly Polypeptide	A P 1 8 0 フアミリーのタンパク質
PUP2	PUtative Proteasome subunit	2 0 S プロテアソームのアルファ 5 サブユニット; ユビキチン依存性異化に関与する; ヒト相合体はサブユニットゼータである
VPS53	Vacuolar Protein Sorting	G A R P (ゴルジ関連逆行性タンパク質) 複合体の構成要素; G A R P は、エンドソームから後期ゴルジへのタンパク質のリサイクリングに必要とされる
SNA3	Sensitivity to NA+	液胞へのタンパク質の効率的な M V B 選別に関与するタンパク質; M V B カーゴのための R S P 5 アダプタンパク質として機能し得る; 液胞型腔内小胞に局在化する内在性膜タンパク質
ECM27	ExtraCellular Mutant	機能未知の推定タンパク質; 細胞壁生合成に関与し得る
STE24	STErile	高度に保存された亜鉛メタプロテアーゼ; a 因子成熟化の 2 つのステップで機能する
ILM1	Increased Loss of Mitochondrial DNA	機能未知のタンパク質; ミトコンドリア DNA 維持に関与し得る; 減速した DNA 合成誘導性線維状増殖に必要とされる
HMS2	High-copy Mep Suppressor	熱ショック転写因子との類似性を有するタンパク質; 過剰発現は、二倍体 m e p 1 m e p 2 ホモ接合性ヌル変異体の仮性菌糸線維化不全を抑制する; H M S 2 はパラログを有する
PML1	Pre-mRNA Leakage	R E S 複合体のサブユニット; R E S 複合体は、未スプライシング型プレ m R N A の核内繫留に必要とされる; P m 1 3 9 p 及び M 1 p 1 p と同じ経路で作用する
PCD1	Peroxisomal Coenzyme A Diphosphatase	8-オキソ-dGTP ジホスファターゼ; 酸化プリンヌクレオシド三リン酸の衛生化を介して自発的変異誘発を防止する; 補酵素 A 及び C o A 誘導体に対する特異性を有するペルオキシソームピロホスファターゼとしても作用することができる
SMD2		コア S m タンパク質 S m D 2 ; (S m b 1 p を含む) ヘテロ七量体複合体の一部
CWC24	Complexed With Cef1p	共通スプライシング因子; 一次転写産物への安定な U 2 s n R N P 結合に必要とされる; スプライシングの第 1 のステップに必須; C e f 1 p を含有する前触媒的 (p r e - c a t a l y t i c) スプライソーム複合体の構成要素; S . ポンベ C w f 2 4 p に類似

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
RPL38	Ribosomal Protein of the Large subunit	リボソーム60Sサブユニットタンパク質L38；哺乳動物リボソームタンパク質L38と相同
RPP0	Ribosomal Protein P0	リボソームストークの保存されたリボソームタンパク質P0；翻訳延長因子とリボソームとの間の相互作用に関与する；セリン302でリン酸化されている；哺乳動物リボソームタンパク質LP0及び細菌性L10と相同
FBP1	Fructose-1	フルクトース1
CDC73	Cell Division Cycle	Paf1p複合体の構成要素；RNAポリメラーゼI及びIIに結合し、その活性を調節する；ある特定の遺伝子の発現に必要とされる
URA4	URAcil requiring	ジヒドロオトターゼ；ピリミジンの新規合成における第3の酵素的ステップを触媒する
ECM7	ExtraCellular Mutant	カルシウム取り込みに関与する推定内在性膜タンパク質；非必須タンパク質；変異体は細胞壁欠陥及びCa ⁺ 取り込み不全を有する；転写は亜鉛欠乏の条件下で誘導される
CGI121		EKC/KEOPS複合体の構成要素；EKC/KEOPS複合体は、t6A tRNA修飾及びテロメアTG1-3組換えに必要とされる；転写に関与し得る；Cgi121pはtRNA修飾に不要である；他の複合体メンバーはBud32pである
DUS1	DihydroUridine Synthase	ジヒドロウリジンシンターゼ；Smm1pを含む保存されたタンパク質の広範なファミリーメンバー
VPS9	Vacuolar Protein Sorting	グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)；小胞媒介性液胞輸送に関与する
YTA12	Yeast Tat-binding Analog	ミトコンドリア内膜m-AAAプロテアーゼ構成要素；ミスフォルドタンパク質または未構築タンパク質の分解を媒介する；ミトコンドリア酵素複合体の正しい構築にも必要とされる
RAD14	RADIation sensitive	NER中に損傷したDNAを認識しそれに結合するタンパク質；ヌクレオチド除去修復因子1 (NEF1) のサブユニット；亜鉛フィンガーモチーフを含有する；ヒトXPAタンパク質の相同体；NERはヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair) を表す
POR1	PORin	ミトコンドリアポリン (電位依存性アニオンチャネル)；ミトコンドリアの浸透圧安定性及びミトコンドリアの膜透過性の維持に必要とされる外膜タンパク質；膜間腔 (IMS) のグルタチオンプールとサイトゾルとを結合させる；外膜内でOm45及びOm14と相互作用する；リン酸化されている；DNA複製ストレスに応答してタンパク質存在量が増加する

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
NAR1	Nuclear Architecture Related	サイトゾル鉄-硫黄 (FeS) タンパク質構築機構のサブユニット；サイトゾルタンパク質及び核FeSタンパク質の成熟化ならびに酸化ストレスに対する正常な耐性に必要とされる；欠乏は、寿命の短縮及びパラコートに対する感応性をもたらす；ヒトNarfと相同
MRPL10	Mitochondrial Ribosomal Protein	MRPL18ミトコンドリア54Sリボソームタンパク質YmL10/YmL18 YmL18 YmL10
TRM112	TRna Methyltransferase	tRNAのメチル化に関与するタンパク質
BRE5	BREfeldin A sensitivity	ユビキチンプロテアーゼ補因子；小胞体とゴルジ体領域との間の順行性及び逆行性の輸送を同時制御するUbp3pとの脱ユビキチン化複合体を形成する；スルはブレフェルジンAに対して感応性である
		エポキシドヒドロラーゼ；アルファ/ベータタヒドロラーゼファミリーのメンバー；エポキシドの解毒に関与し得る
COQ3	COenzyme Q	O-メチルトランスフェラーゼ；ユビキノン (補酵素Q) 生合成において2つの異なるO-メチル化ステップを触媒する；ミトコンドリアユビキノン合成複合体の構成要素；リン酸化タンパク質
RR12		COP9シグナソーム (CSN) 複合体のサブユニット；この複合体は、SCFユビキチンリガーゼからユビキチン様タンパク質Nedd8を切断する；交尾フェロモン応答に関与する
HRP1	Heterogenous nuclear RibonucleoProtein	切断因子Iのサブユニット；切断因子Iは、プレmRNA 3'末端の切断及びポリアデニル化に必要とされる5サブユニット複合体である；RRMを含有する異核RNA結合タンパク質、及びポリ (A) シグナル配列に結合するhnRNP A/Bファミリーメンバー；ゲノム安定性に必要とされる
RTS1	Rox Three Suppressor	タンパク質ホスファターゼ2A (PP2A) のB型制御性サブユニット；Rts1p及びCdc55pは、PP2A触媒サブユニットの代替的な制御性サブユニットである
SMP3		アルファ1
SPS4	SPorulation Specific transcript	孢子形成中に発現が誘導されるタンパク質；孢子形成には必要とされない；大腸菌 (E. coli) 内での異種発現は、DNA損傷を感知するSOS応答を誘導する
GNT1	GlcNAc Transferase	N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ；ゴルジ体内のN結合型グリカンの修飾が可能
LDB19	Low Dye Binding	ユビキチン依存性エンドサイトーシスに関与するαアレスチン；ユビキチンリガーゼRsp5pをその標的に動員することによって細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスを制御する；α因子受容体Ste2pの基礎的な内部移行及びターゲティングに関与する；ユビキチンリガーゼRsp5pをSte2pにその2つのPPXYモチーフを介して動員する；Npr1p媒介性リン酸化によって阻害される

遺伝子名	遺伝子名 詳細	説明
SUR1	SUPpressor of Rvs161 and rvs167 mutations	マンノシルイノシトールホスホリルセラミド (MIPC) シンターゼ触媒サブユニット；制御性サブユニット C s g 2 p と複合体を形成する；スフィンゴ脂質合成における機能は C s h 1 p の機能と重複する；SUR1 はパラログを有する
MUK1	coMpUtationally-linked to Kap95	グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) ；小胞媒介性液胞輸送に関与する
SEC62	SECretory	S e c 6 3 複合体の必須サブユニット；S e c 6 1 複合体を含む
GYP5	Gtpase-activating protein for Ypt Proteins	酵母 R a b フアミリーメンバーの GTPアーゼ活性化タンパク質 (GAP) ；ER からゴルジへの輸送に関与する；G y 1 1 p によって刺激される Y p t 1 p に対する GAP 活性を示す
KEL3	KELch	機能未知の細胞質タンパク質
PIN3	Psi+ INDucibility	アクチン核形成促進因子活性の負の制御因子；L a s 1 7 p と相互作用する

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

表 1 C、1 D、2 A、2 B、及び 2 C のいずれか 1 つ以上に列記されているヒト遺伝子のヌクレオチド及びタンパク質配列、ならびにそれらのコードされたタンパク質は、これらの遺伝子の発現またはコードされる遺伝子産物の活性を調節する化合物（核酸、ペプチド、抗体、及び小分子を含むがこれらに限定されない）を生成及び/または同定するため

に使用することができる。例えば、以下にさらに記載されているように、遺伝子の発現を阻害するRNAi薬剤を、mRNA配列に基づいて設計することができる。これらのタンパク質は、組換えDNA法を用いて産生され、免疫原または親和性試薬として、抗体もしくはアプタマーの産生または選択のために、あるいはこのタンパク質に結合するかもしくはその活性を調節する化合物を同定するための小分子ライブラリのスクリーニングにおいて使用することができる。上述のように、遺伝コードの縮重に起因して、所与のアミノ酸配列が多種多様な核酸配列のいずれによってコードされてもよいことは、当業者であれば理解するであろう。任意のかかる核酸配列は、例えば、任意の目的のためのタンパク質を発現する目的で、タンパク質をコードするために使用され得る。

【0112】

ApoE媒介性毒性の修飾因子である酵母遺伝子の相同体であるヒト遺伝子のうちの特定のものは、例えば、スプライス変異または代替的な開始コドンの使用の結果として、同じゲノム配列に由来する特定のタンパク質の1つを超えるアイソフォームをコードしてもよい。本明細書における方法及び組成物のある特定の実施形態は、特定のアイソフォーム、例えば、NCBI RefSeqデータベースにおける参照配列(RefSeq)を有するか、もしくはUniProtデータベースにおけるアクセッション番号を有する、任意のアイソフォームを対象とするか、またはそれを使用してもよい。いくつかの実施形態では、アイソフォームは、成人ヒト脳において(例えば、海馬及び/または大脳皮質などの、ADを有する個体において典型的に影響を受ける1つ以上の領域において)通常は発現される。いくつかの実施形態では、アイソフォームは、UniProtデータベースにおいて特定される標準的(canonical)アイソフォームである。ApoE媒介性毒性の修飾因子である酵母遺伝子の相同体であるヒト遺伝子のうちの特定のものは、複数の異なる対立遺伝子を有してもよい。本明細書における方法及び組成物のある特定の実施形態は、任意のかかる対立遺伝子を対象とするか、またはそれを使用してもよい。いくつかの実施形態では、対立遺伝子は、ApoE媒介性疾患、例えば、アルツハイマー病に関連する。

【0113】

ApoE媒介性毒性の修飾因子として同定された酵母遺伝子及びコードされるタンパク質のうち少なくとも一部の対応物は、多様な非ヒト多細胞生物、例えば、蠕虫、ハエ、マウス、ラット、及び/または非ヒト霊長類に存在する。いくつかの実施形態では、かかる遺伝子またはそれらのコードされた遺伝子産物は、多様な目的のために使用され得る。例えば、これらの遺伝子は、例えば、それらが由来する生物の細胞において、過剰発現、阻害、または無効化され(例えば、突然変異または少なくとも部分的な欠失によって)、それによって、かかる細胞内のApoE媒介性毒性を調節するために使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、ApoE媒介性毒性を調節する化合物を同定するため、または他の系で同定された化合物を特性化するため、スクリーニングに使用される。いくつかの実施形態では、その動物種に天然である対応物が過剰発現、阻害、または無効化されている非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、ショウジョウバエ(Drosophila)、線虫(Celegans))が生成されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる動物は、ApoE媒介性毒性を調節する化合物をスクリーニングまたは特性化するために使用される。

【0114】

本明細書においてApoE媒介性毒性の調節因子として同定された遺伝子は、後続の節(例えば、スクリーニングアッセイに関する節)においては「標的遺伝子」と称される場合があり、それらによりコードされるタンパク質は「標的タンパク質」と称される場合がある。かかる用語が、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上における酵母遺伝子、ならびに他の生物(例えば、ヒト)におけるそれらの対応物を指すことが理解されよう。本明細書において提供される遺伝子の名称は、別段の記載がある場合または文脈から明白である場合を除き、その遺伝子及びそのコードされた遺伝子産物、例えば、タンパク質への言及を包含するものと理解されるべきである。例えば、

10

20

30

40

50

遺伝子の発現を調節すること（例えば、阻害することまたは上昇させること）に言及する場合、そのような言及は、mRNA及び/またはタンパク質のレベルでその遺伝子の発現を調節すること（例えば、mRNAのレベルを調節すること及び/またはタンパク質のレベルを調節すること）を包含するものと理解されるべきである。例えば、遺伝子を過剰発現することは、その遺伝子によってコードされるタンパク質を過剰発現することを包含し、このタンパク質は、細胞または細胞の祖先に導入されている核酸（例えば、発現構築物）によってコードされてもよい。いくつかの実施形態では、遺伝子または遺伝子産物の発現または活性は、少なくともまたは約25%、50%、または100%上昇する。いくつかの実施形態では、遺伝子または遺伝子産物の発現または活性は、少なくともまたは約2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、もしくはそれ以上上昇する。遺伝子を阻害または無効化することは、細胞もしくは生物のゲノム内の遺伝子を阻害または無効化すること、あるいは遺伝子の発現産物、例えば、その遺伝子によってコードされるmRNAまたはタンパク質を阻害または無効化することを包含する。遺伝子の活性を調節することは、その遺伝子によってコードされる産物、例えば、タンパク質の活性を調節することを包含する。いくつかの実施形態では、遺伝子または遺伝子産物の発現または活性は、少なくともまたは約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、もしくはそれ以上低減する。いくつかの実施形態では、発現または活性は、検出不可能にされる。

10

【0115】

表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されている酵母遺伝子、もしくは表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているヒト相同体の発現を調節すること、ならびに/またはこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を調節することは、例えば、ApoE発現細胞におけるApoE媒介性毒性の調節をもたらすと予想される。例えば、酵母内で過剰発現されると毒性を抑制することが分かったそれらの遺伝子については、概して、これらの遺伝子もしくはそれらのヒト対応物の発現を増強すること、及び/またはこれらの遺伝子もしくはそれらのヒト対応物によってコードされるタンパク質の活性を増強することが、例えば、ApoE発現細胞におけるApoE媒介性毒性の抑制をもたらすと予想される。しかしながら、いくつかの実施形態では、ApoE媒介性毒性の酵母抑制因子またはそれらのヒト対応物のうちの特定のものの発現または活性の阻害が、ApoE媒介性毒性を抑制し得る。酵母内で過剰発現されると毒性を抑制することが分かったそれらの遺伝子については、概して、これらの遺伝子の発現及び/またはこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を阻害することが、例えば、ApoE発現細胞におけるApoE媒介性毒性の増強をもたらすと予想される。しかしながら、いくつかの実施形態では、ApoE媒介性毒性の酵母抑制因子またはそれらのヒト対応物のうちの特定のものの発現または活性の増強が、ApoE媒介性毒性を増強し得る。

20

30

【0116】

酵母内で過剰発現されると毒性を増強することが分かったそれらの遺伝子については、概して、これらの遺伝子もしくはそれらのヒト対応物の発現を阻害すること、及び/またはこれらの遺伝子またはそれらのヒト対応物によってコードされるタンパク質の活性を阻害することが、例えば、ApoE発現細胞におけるApoE媒介性毒性の抑制をもたらすと予想される。しかしながら、いくつかの実施形態では、ApoE媒介性毒性の酵母増強因子またはそれらのヒト対応物のうちの特定のものの発現または活性の阻害が、ApoE媒介性毒性を抑制し得る。酵母内で過剰発現されると毒性を増強することが分かったそれらの遺伝子については、いくつかの実施形態では、これらの遺伝子の発現の増強及び/またはこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質の活性の増強が、例えば、ApoE発現細胞におけるApoE媒介性毒性の増強をもたらすと予想される。しかしながら、いくつかの実施形態では、ApoE媒介性毒性の酵母増強因子またはそれらのヒト対応物のうちの特定のものの発現または活性の増強が、ApoE媒介性毒性を抑制し得る。

40

【0117】

50

いくつかの実施形態では、ApoE関連毒性の酵母抑制因子もしくは増強因子またはそのヒト相同体の発現または活性を増強または阻害することの効果は、少なくとも部分的にアイソフォーム特異的であり得る。例えば、酵母抑制因子が、3つのApoEアイソフォームのうち1つまたは2つの毒性を抑制するがその他の毒性を抑制しない場合、その発現または活性またはそのヒト相同体の発現または活性の調節は、この酵母抑制因子が毒性を抑制する特定のアイソフォームのうち1つ以上によって媒介される毒性にのみ著しく影響する場合がある。いくつかの実施形態では、抑制因子は、ApoE2により誘導される毒性のみを抑制する。いくつかの実施形態では、抑制因子は、ApoE3のみにより誘導される毒性のみを抑制する。いくつかの実施形態では、抑制因子は、ApoE4により誘導される毒性のみを抑制する。いくつかの実施形態では、抑制因子は、2つ以上のアイソフォーム、例えば、ApoE4及び少なくとも1つの他のアイソフォームにより誘導される毒性を抑制する。いくつかの実施形態では、増強因子は、ApoE2により誘導される毒性のみを増強する。いくつかの実施形態では、増強因子は、ApoE3のみにより誘導される毒性のみを増強する。いくつかの実施形態では、増強因子は、ApoE4により誘導される毒性のみを増強する。いくつかの実施形態では、増強因子は、2つ以上のアイソフォーム、例えば、ApoE4及び少なくとも1つの他のアイソフォームにより誘導される毒性を増強する。いくつかの実施形態では、ApoE関連毒性の酵母抑制因子もしくは増強因子またはそのヒト相同体の発現または活性を増強または阻害することの効果は、アイソフォーム特異的でない場合がある。換言すると、ApoE関連毒性の酵母抑制因子もしくは増強因子またはそのヒト相同体の発現または活性の調節は、いずれのApoEアイソフォームによって媒介される毒性にも著しく影響することになる。いくつかの実施形態では、抑制因子または増強因子は、第1のアイソフォームを発現する酵母菌株において同定され、異なるアイソフォームを発現する菌株において、この異なるアイソフォームにより誘導される毒性を抑制または増強する能力について試験されてもよい。いくつかの実施形態では、任意の1つ以上のApoEアイソフォームにより誘導される毒性を調節する（例えば、阻害する）抑制因子または増強因子が同定されてもよい。

【0118】

いくつかの態様では、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする第1の核酸に機能的に連結された第1のプロモーターを含む第1の発現構築物を含む細胞が本明細書に記載され、(a)当該細胞は、表1A、1B、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されているApoE媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそれらの哺乳動物（例えば、ヒト）相同体によってコードされるポリペプチドをコードする第2の核酸に機能的に連結された第2のプロモーターを含む第2の発現構築物をさらに含むか、あるいは(b)当該細胞において、表1A、1B、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されているApoE媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子またはそれらの哺乳動物（例えば、ヒト）相同体によってコードされるタンパク質の発現または活性が低減または欠如している。いくつかの実施形態では、第1の発現構築物、第2の発現構築物、またはその両方が、細胞のゲノムに組み込まれている。いくつかの実施形態では、第2の核酸によってコードされるポリペプチドは、ApoE媒介性毒性の抑制遺伝子または増強遺伝子によってコードされるタンパク質と、異種ポリペプチド、例えば、検出タンパク質（例えば、蛍光タンパク質、酵素、またはエピトープタグ）などの第2のタンパク質の少なくとも一部分とを含む、キメラタンパク質または融合タンパク質である。したがって、第2の核酸によってコードされるポリペプチドは、ApoE媒介性毒性の抑制遺伝子もしくは増強遺伝子によってコードされるタンパク質を含むか、またはそれからなってもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、酵母細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、脊椎動物細胞、例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）である。いくつかの実施形態では、かかる細胞、例えば、酵母細胞または哺乳動物（例えば、ヒト）細胞は、ApoE媒介性毒性を調節する（例えば、阻害する）化合物を同定するためのスクリーニングにおいて使用され得る。いくつかの実施形態では、酵母遺伝子は、ApoE媒介性疾患、例えば、ADの既知の遺伝的危険因子であるヒト相同体を有する。いくつか

の実施形態では、酵母遺伝子は、A p o E 媒介性疾患、例えば、A D の既知の遺伝的危険因子であるヒト相同体を有しない。本明細書で使用される場合、A p o E 媒介性疾患の遺伝的危険因子に関する「既知の」は、その遺伝子またはその1つ以上のバリエーションが、本出願の出願日時点でA p o E 媒介性疾患の遺伝的危険因子として同定されていることを意味する。

【0119】

いくつかの態様では、ヒトA p o E を発現し、かつ、A p o E 媒介性毒性の修飾遺伝子である酵母遺伝子（例えば、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されている酵母遺伝子）を過剰発現するか、またはその発現が低減もしくは欠如している、酵母細胞が本明細書に記載され、かかる酵母遺伝子のヒト相同体は、A p o E 媒介性疾患、例えば、A D の遺伝的危険因子である。いくつかの実施形態では、かかる酵母細胞は、遺伝的危険因子を保有する罹患対象を治療するのに特に役立つ候補薬剤（例えば、小分子）を同定するための個別化されたモデルとして機能し得る。いくつかの実施形態では、かかる細胞においてスクリーニングを行って、かかる化合物を同定する。例えば、いくつかの実施形態では、酵母遺伝子が過剰発現時にA p o E 媒介性毒性の抑制因子である場合、A p o E を発現し、かつその酵母遺伝子の発現が低減または欠如している酵母細胞は、その酵母遺伝子のヒト相同体の危険対立遺伝子を有する対象のためのモデルとして機能し得る。いくつかの実施形態では、酵母遺伝子が過剰発現時にA p o E 媒介性毒性の増強因子である場合、A p o E を発現し、かつその酵母遺伝子を過剰発現する酵母細胞は、その酵母遺伝子のヒト相同体の危険対立遺伝子を有する対象のためのモデルとして機能し得る。

10

20

【0120】

いくつかの実施形態では、A p o E を発現する酵母は、A p o E によって攪乱される生物学的経路を同定するため、及び/またはA p o E 媒介性毒性と相関する表現型を同定するために使用される。そのような生物学的経路またはプロセスにおいて作用する遺伝子及びそれらのコードされたタンパク質は、A p o E 媒介性毒性を調節する、例えば、抑制するための、有用な標的であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書において（例えば、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上において）特定される酵母遺伝子またはヒト対応物と同じ生物学的経路もしくはプロセスにおいて作用するか、あるいはかかる酵母遺伝子またはヒト対応物の発現または活性の内因性阻害因子または活性化因子として作用する遺伝子（及びそれらのコードされたタンパク質）は、A p o E 媒介性毒性を調節する、例えば、抑制するための、有用な標的であり得る。かかる遺伝子の発現または活性を調節する化合物は、本明細書に記載されているスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。いくつかの実施形態では、目的の酵母遺伝子またはヒト対応物と同じ生物学的経路もしくはプロセスにおいて作用する遺伝子（及びそれらのコードされたタンパク質）は、Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>)にてワールドワイドウェブ(WWW)上で利用可能、The Gene Ontology Consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. Nat Genet; 25(1): 25-9 (2000)、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)または<http://www.kegg.jp/>にてWWW上で利用可能、Kanehisa, M. and Goto, S.; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Res. 28, 27-30 (2000)、Kanehisa, M., et al. Nucleic Acids Res. 42, D199-D205 (2014)、MetaCyc (<http://metacyc.org/>)にてWWW上で利用可能、Caspi et al., Nucleic Acids Research 42: D459-D471 (2014)、Reactome (<http://www.reactome.org/>)にてWWW上で利用可能、Croft D, et al. Nucleic Acids Res. 42 (Database issue): D

30

40

50

472-7, (2014)), STKE (<http://stke.sciencemag.org>にてWWW上で利用可能)、及びBioCarta (<http://www.biocarta.com>にてWWW上で利用可能)などの知識基盤を使用して決定され得る。

【0121】

例えば、本明細書においてApoE媒介性毒性の修飾因子として同定されたいくつかの遺伝子は、エンドサイトーシスにおいて機能する。実施例6に記載されているように、ApoEを発現する酵母は、攪乱されたエンドサイトーシスを示し、したがって、エンドサイトーシス及びエンドサイトーシス経路に關与する遺伝子が、ApoE媒介性毒性を緩和する化合物の同定のための標的として同定される。いくつかの実施形態では、エンドサイトーシスに關与するApoE媒介性毒性の調節因子は、RVS161、OSH2、RVS167、YAP1802、OSH3、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体である。

10

【0122】

本明細書においてApoE媒介性毒性の修飾因子として同定されたいくつかの遺伝子は、小胞輸送において機能する。いくつかの実施形態では、小胞輸送に關与するApoE媒介性毒性の調節因子は、ATG20、UBP3、TRS65、BRE5、MUK1、GYP5、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体である。

【0123】

本明細書においてApoE媒介性毒性の修飾因子として同定されたいくつかの遺伝子は、ユビキチン化/脱ユビキチン化において機能する。いくつかの実施形態では、ユビキチン化/脱ユビキチン化に關与するApoE媒介性毒性の調節因子は、APC11、UBP3、UBP7、CDC73、BRE5、RRI2、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体である。

20

【0124】

本明細書においてApoE媒介性毒性の修飾因子として同定されたいくつかの遺伝子は、脂質代謝において機能する。いくつかの実施形態では、脂質代謝に關与するApoE媒介性毒性の調節因子は、PER1、MDH3、GPI8、SMP3、SUR1、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体である。

【0125】

本明細書においてApoE媒介性毒性の調節因子として同定されたいくつかの遺伝子は、DNA修復において機能する。いくつかの実施形態では、DNA修復に關与するApoE媒介性毒性の調節因子は、MGT1、PCD1、CDC73、RAD14、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体である。

30

【0126】

本明細書においてApoE媒介性毒性の調節因子として同定されたいくつかの遺伝子は、ミトコンドリア機構において機能する。いくつかの実施形態では、ミトコンドリア機構に關与するApoE媒介性毒性の調節因子は、ATG20、MHR1、MRP4、RRM3、ILM1、MST1、YTA12、POR1、MRPL10、またはそれらの哺乳動物(例えば、ヒト)相同体である。

40

【0127】

スクリーニングアッセイ

本開示のある特定の態様は、ApoE誘導性毒性を調節する(例えば、阻害する)候補薬剤または遺伝因子についてスクリーニングする方法を提供する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されているスクリーニング法は、ApoEタンパク質を発現するように遺伝子操作された酵母細胞を使用する。いくつかの実施形態では、ApoE媒介性疾患を治療するための化合物についてスクリーニングする方法は、(a) ApoEタンパク質を含むポリペプチドを発現するように遺伝子操作された酵母細胞を提供する工程、(b) 酵母細胞を候補化合物と接触させる工程、及び(c) 酵母細胞を生存能力について評価することを含み、候補化合物の不在下での酵母細胞の生存能力と比較したときの酵母細胞の

50

生存能力の上昇は、候補化合物が候補治療薬であることを示す。核酸、ポリペプチド、小分子化合物、及びペプチド模倣物を含む様々な種類の候補薬剤（「候補化合物」、「被験薬剤」、または「被験化合物」とも称される）が、本明細書に記載されている方法を使用してスクリーニングされ得る。いくつかの実施形態では、酵母細胞を候補薬剤と接触させることによって、候補薬剤をスクリーニングすることができる。例えば、酵母細胞は、候補薬剤を含有する液体培地中で培養されてもよい。いくつかの実施形態では、酵母細胞を、遺伝子産物をコードする核酸構築物と接触させることによって、遺伝子薬剤をスクリーニングすることができる。例えば、ApoE誘導性毒性を調節する遺伝子を同定するために、多様な遺伝子産物を発現するcDNAライブラリをスクリーニングしてもよい。

【0128】

いくつかの実施形態では、例えば化学的スクリーニングのために、膜排出ポンプに影響するように、または薬物の透過性を上昇させるように設計された、1つ以上の突然変異を保有する酵母菌株を使用することができる。例えば、ERG6遺伝子、PDR1遺伝子、PDR3遺伝子、及び/またはPDR5遺伝子内に突然変異を有する酵母菌株が用いられることが想定される。例えば、膜排出ポンプをコードする1個以上の遺伝子または膜排出ポンプをコードする遺伝子（*erg6*、*pdr1*、*pdr3*、及び/または*pdr5*）の発現を指示する転写因子内に突然変異を有する酵母菌株が、多くのスクリーニングに使用されて、増殖制御因子の同定に成功している（Jensen - Pergakes KL, et al., 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1160 - 7）。酵母は、膜排出ポンプをコードするいずれか1個以上の遺伝子または膜排出ポンプの発現を制御する転写因子の突然変異を保有するように遺伝子操作されていてもよい。いくつかの態様では、ApoEタンパク質を発現するように遺伝子操作されており、かつ、膜排出ポンプをコードするいずれか1個以上の遺伝子または膜排出ポンプをコードする遺伝子の発現を指示する転写因子内に突然変異を有する酵母細胞が、本明細書に記載されている。

【0129】

酵母の魅力的な一態様は、毒性を緩和する潜在性を有する小分子、遺伝子、ペプチド、及び他の化合物を同定し得る高スループットスクリーニングを行うことの可能性である。毒性スクリーニングは、ApoEと相互作用する化合物を選択する能力のみならず、未だ同定されていない標的を含め、それら自体は細胞毒性ではない上流標的または下流標的と相互作用し得る化合物を選択する能力をも有するという利点を有する。したがって、厳密な作用機序に関わらず、本明細書に記載されているスクリーニング法によって同定される薬剤は、ApoE媒介性疾患、例えば、アルツハイマー病における治療利益をもたらすことが期待される。

【0130】

本明細書に記載されている方法のいずれかを使用してスクリーニングまたは同定される化合物は、様々な化学的分類を含むことができるが、典型的には、50~2,500ダルトンの範囲内の分子量を有する有機小分子が使用され得る。いくつかの実施形態では、この小分子は、質量において約2キログルトン（kDa）未満である。いくつかの実施形態では、この小分子は、約1.5kDa未満、または約1kDa未満である。いくつかの実施形態では、この小分子は、約800ダルトン（Da）、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、または100Da未満である。いくつかの実施形態では、小分子は、非ポリマー性である。いくつかの実施形態では、小分子は、アミノ酸ではない。いくつかの実施形態では、小分子は、ヌクレオチドではない。いくつかの実施形態では、小分子は、糖類ではない。いくつかの実施形態では、小分子は、複数の炭素-炭素結合を含有し、1つ以上のヘテロ原子及び/またはタンパク質との構造的相互作用（例えば、水素結合）に重要な1つ以上の官能基、例えば、アミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基、そしていくつかの実施形態では少なくとも2つの官能基を含むことができる。小分子は、上記の官能基のうちの1つ以上で任意に置換される、1つ以上の環状炭素もしくは複素環式構造及び/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含む場合

10

20

30

40

50

が多い。

【0131】

いくつかの実施形態では、化合物には、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物（例えば、ペプトイド）、アミノ酸、アミノ酸類似体、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体または構造類似体、ポリヌクレオチド、核酸アプタマー、及びポリヌクレオチド類似体を含むがこれらに限定されない、生体分子が含まれ得る。

【0132】

化合物は、化合物ライブラリ、天然物ライブラリ、及び、ランダムペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機分子から構成されるコンビナトリアルライブラリを含む、いくつかの潜在源から同定することができる。化合物ライブラリは多様な化学構造物からなり、その一部は、既知の化合物の類似体、あるいは他の創薬スクリーニングで「ヒット」もしくは「リード」として同定された類似体または化合物であり、その他は天然物から得られ、さらに他のものは、非指向性合成有機化学から発生する。天然物ライブラリは、微生物、動物、植物、または海洋生物のコレクションであり、これらは、(1) 土壌、植物、もしくは海洋微生物からのプロスの発酵及び抽出、または(2) 植物もしくは海洋生物の抽出によって、スクリーニング用の混合物を生成するために使用される。天然物ライブラリは、ポリペプチド、非リボソームペプチド、及びそれらのバリエーション（非天然）を含む。概要については、*Science* 282: 63-68 (1998) を参照されたい。コンビナトリアルライブラリは、多数のペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機化合物から混合物として構成される。これらのライブラリは、従来の自動合成法、PCR、クローニング、または独自の合成法によって、比較的容易に調製される。関心対象の化合物ライブラリには、非ペプチドコンビナトリアルライブラリ、ペプチド、タンパク質、ペプチド模倣物、多重並行合成物コレクション、組換え体、及びポリペプチドライブラリが含まれる。コンビナトリアルケミストリー及びそれから生成されるライブラリの概要については、*Myers, Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 701-707 (1997) を参照されたい。

【0133】

ある特定の実施形態では、スクリーニングされる候補薬剤は、天然の化合物であっても人工化合物であってもよい。ある特定の実施形態では、候補薬剤は、合成または天然化合物の大きなライブラリからスクリーニングすることができる。一例は、ヒトが使用することができるFDA認可化合物のライブラリである。加えて、化合物ライブラリは、Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, NJ)、Microsource (New Milford, CT)、Aldrich (Milwaukee, WI)、AKos Consulting and Solutions GmbH (Basel, Switzerland)、Ambinter (Paris, France)、Asinex (Moscow, Russia)、Aurora (Graz, Austria)、BioFocus DPI, Switzerland、Bionet (Camelford, UK)、ChemBridge, (San Diego, CA)、ChemDiv, (San Diego, CA)、Chemical Block Lt, (Moscow, Russia)、ChemStar (Moscow, Russia)、Exclusive Chemistry, Ltd (Obninsk, Russia)、Enamine (Kiev, Ukraine)、Evotec (Hamburg, Germany)、Indofine (Hillsborough, NJ)、Interbioscreen (Moscow, Russia)、Interchim (Montlucon, France)、Life Chemicals, Inc. (Orange, CT)、Microchemistry Ltd. (Moscow, Russia)、Otava, (Toronto, ON)、PharmEx Ltd. (Moscow, Russia)、Princeton Biomolecular (Monmouth Junction, NJ)、Scientific Exchange (Center Ossipee, NH)、Spec

10

20

30

40

50

s (Delft, Netherlands)、TimTec (Newark, DE)、Toronto Research Corp. (North York ON)、UkrOrgSynthesis (Kiev, Ukraine)、Vitas-M, (Moscow, Russia)、Zelinsky Institute, (Moscow, Russia)、及びBicoll (Shanghai, China)を含むがこれらに限定されない、いくつかの企業から市販されている。コンビナトリアルライブラリも利用可能であり、調製することができる。細菌、真菌、植物、及び動物の抽出物、発酵プロス（例えば、土壌、細菌、または真菌の発酵プロス）の形態の天然化合物のライブラリは、市販されており、または当該技術分野において周知の方法によって容易に調製することができる。いくつかの実施形態では、ライブラリは、例えば、少なくとも100種、少なくとも1,000種、少なくとも10,000種、少なくとも100,000種、少なくとも250,000種の化合物、少なくとも500,000種以上の化合物、例えば、最大100万~200万種、またはそれよりも多くの化合物を含んでもよい。化合物は、マルチウェルプレート内に配されてもよい。それらは、溶媒（例えば、DMSO）中に溶解されても、乾燥形態で、例えば、粉体または固体として提供されてもよい。

【0134】

例えば、本明細書におけるものなどのライブラリの使用による、被験化合物の同定によって、その後被験化合物「ヒット」または「リード」を修飾して、「ヒット」または「リード」がApoE媒介性毒性を予防もしくは抑制し、かつ/またはアミロイド媒介性毒性を予防もしくは抑制する能力を最適化することが可能となる。そのような最適化は、本開示の一態様である。例えば、スクリーニングにおいてヒットとして同定された化合物の類似体を得ること（例えば、合成すること）が可能である。いくつかの実施形態では、あるヒットの複数の類似体が、例えば、そのヒットと比べて1つ以上の変更された特性（例えば、物理化学特性、薬物動態特性、及び/または薬力特性）、例えば、1つ以上の改善された特性を有する類似体を同定するために試験される。特性の改善は、例えば、効力の上昇、標的タンパク質に対する結合親和性の上昇、オフターゲット効果の低減、非標的分子に対する親和性の低下、毒性の低減、半減期の増加、生体利用能の上昇（例えば、経口生体利用能の上昇）、安定性の上昇（インビトロ及び/またはインビボ）、溶解性の上昇（例えば、水溶性の上昇）、血液脳関門を横断する能力の上昇（例えば、そのような通過が神経変性疾患の治療に有用な場合）、血漿タンパク質結合性の上昇または低下（ある特定の実施形態ではこれらのいずれかが望ましい場合がある）などであり得る。最適化は、ヒット構造の経験的修飾（例えば、関連する構造を有する化合物を合成し、それらを、細胞不含もしくは細胞ベースのアッセイにおいて、または非ヒト動物において試験すること）によって、医薬品化学の確立された原理を使用して、計算的手法を使用して、またはそれらの組み合わせによって、達成することができる。いくつかの実施形態では、ヒット化合物の構造を検査してファルマコフォアを同定し、これを使用して、さらなる化合物を設計することができる。

【0135】

いくつかの実施形態では、ApoE関連毒性に対する化合物の作用は、少なくとも部分的にアイソフォーム特異的であり得る。例えば、化合物は、3つのApoEアイソフォームのうちの一つまたは二つの毒性を調節（例えば、阻害）するが、その他の毒性は調節（例えば、阻害）しない。いくつかの実施形態では、化合物は、ApoE2により誘導される毒性のみを阻害する。いくつかの実施形態では、化合物は、ApoE3により誘導される毒性のみを阻害する。いくつかの実施形態では、化合物は、ApoE4により誘導される毒性のみを阻害する。いくつかの実施形態では、化合物は、2つ以上のアイソフォーム、例えば、ApoE4及び少なくとも一つ他のアイソフォームにより誘導される毒性を阻害する。いくつかの実施形態では、ApoE関連毒性に対する化合物の作用は、アイソフォーム特異的でない場合がある。換言すると、その化合物は、いずれのApoEアイソフォームによって媒介される毒性にも著しく影響する（例えば、それを阻害する）。いくつかの実施形態では、化合物は、第1のアイソフォームを発現する酵母菌株において、A

10

20

30

40

50

p o E 媒介性毒性の調節因子、例えば、阻害因子として同定され、異なるアイソフォームを発現する菌株において、この異なるアイソフォームにより誘導される毒性を阻害または増強する能力について試験されてもよい。いくつかの実施形態では、任意の1つ以上のA p o Eアイソフォームにより誘導される毒性を調節する（例えば、阻害する）化合物が同定されてもよい。

【0136】

実施例6に詳述されるように、酵母細胞におけるA p o Eの発現は、エンドサイトーシスの欠陥をもたらした。この生物学的所見に加えて、遺伝子スクリーニングにおいて同定されたいくつかの毒性抑制因子が、エンドサイトーシスにおいて機能するタンパク質をコードする。したがって、2つの明確に異なる手法が、エンドサイトーシスの欠陥をA p o E媒介性毒性の細胞内影響として同定する。酵母細胞におけるエンドサイトーシスを測定するための例示的なアッセイが、実施例6に記載されている。このアッセイでは、正常に細胞内に取り込まれる（例えば、適切な条件下における）野生型タンパク質（例えばメチオントランスポーターMUP1など）のエンドサイトーシスをモニタリングする。本明細書に詳述されるように、A p o Eの発現は、MUP1のエンドサイトーシスを阻害する。スクリーニング法を行って（例えば、本明細書に記載されている候補薬剤を使用して）、A p o Eを発現する細胞においてエンドサイトーシスを調節する（増加または減少させる）化合物を同定することができる。エンドサイトーシスを増加させる化合物は、A p o E媒介性毒性の低減及びA p o E媒介性疾患の治療のための候補治療薬となることが予想される。エンドサイトーシスを測定するために（本明細書に記載されているスクリーニング法で）使用され得るさらなるアッセイは、当該技術分野で既知である。

10

20

【0137】

本明細書に記載されているように試験または同定される化合物は、任意の化学的または生物学的方法によって合成することができる。本明細書に記載されているように試験または同定される化合物は、純粋であってもよく、または1つ以上のさらなる成分を含有する組成物中に存在してもよい。化合物は、アッセイで、生理学的に、または薬学的に許容される希釈剤もしくは担体（以下参照）中で調製することができる。

【0138】

本開示のある特定の実施形態は、遺伝子スクリーニングに関する。例えば、ゲノムライブラリ、読み取り枠ライブラリ、及び破壊ライブラリをスクリーニングして、A p o E誘導性毒性の遺伝子外抑制因子または増強因子を見出すことができる。過剰発現または破壊される特定の遺伝子を決定することができる。いくつかの実施形態では、増殖する能力が低減または増強している個別の形質転換体が単離され、形質転換体内で過剰発現または破壊される特定の遺伝子が決定される。

30

【0139】

いくつかの実施形態では、例えば、実施例に記載されているように、プールスクリーニングが行われ得る。ある特定の実施形態では、プールスクリーニングは、プロモーターの制御下の個別の読み取り枠を各々が含むベクターのプールで形質転換されている酵母細胞を同時培養する工程を含む。適切なレベル（すなわち、A p o E媒介性毒性の抑制因子の不在下で毒性を検出可能に誘導するのに十分であろうレベル）でA p o Eが発現される条件下にて、好適な期間にわたって細胞を培養した後、DNAを採取し、高スループット配列決定を行って、A p o E発現が誘導されなかった対照培養物中でのORFの提示と比較して、培養物中で過剰提示された、または提示不足のORFを同定する。ある特定の実施形態では、プールスクリーニングは、個別のORFの破壊を保有する酵母細胞を同時培養する工程を含む。この破壊は、破壊されたORFの同定を可能にする分子バーコードとして機能する、明確に異なるDNAセグメントの挿入を含んでもよい。

40

【0140】

スクリーニング（例えば、化合物についての及び/または抑制因子もしくは増強因子についての）は、多様な異なる条件下で行うことができる。所望の場合、化合物は、多様な増殖条件下で、かつ多様な遺伝的背景においてスクリーニングすることができる。例えば

50

、多様な異なる培養培地を使用することができる。培養培地は、異なる炭素源、例えば、グルコース、グリセロール、ガラクトース、ラフィノースなどの異なる糖を含有することができる。いくつかの実施形態では、2つ、3つ、またはそれよりも多くの異なる培養条件（例えば、異なる炭素源を含有する培養培地）を使用して、複数のスクリーニングが行われ、少なくとも2つの異なる培養条件下で「ヒット」として同定された化合物または遺伝子が同定される。

【0141】

ある特定の実施形態は、酵母系で同定された候補薬剤（例えば、小分子）を1つ以上の他のモデル系で試験することを含む方法を提供する。かかるモデル系としては、細胞ベースのモデル、例えば、哺乳動物細胞、ならびに蠕虫、ハエ、及び非ヒト哺乳動物モデルなどのインビボ動物モデルが挙げられるが、これらに限定されない。非哺乳動物細胞または生物は、ヒトApoEを含むポリペプチドを発現するように遺伝子操作されていてもよい。非ヒト哺乳動物細胞または生物は、任意のヒトApoEアイソフォームを含むポリペプチドを発現するように、またはその生物において天然である内因性ApoE対応物を含むポリペプチドを過剰発現するように、遺伝子操作されていてもよい。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、成熟ヒトApoE2（SEQ ID NO: 1）、成熟ヒトApoE3（SEQ ID NO: 2）、または成熟ヒトApoE4（SEQ ID NO: 3）に融合された、ヒトApoEシグナル配列（SEQ ID NO: 5）を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、成熟ヒトApoE2（SEQ ID NO: 1）、成熟ヒトApoE3（SEQ ID NO: 2）、または成熟ヒトApoE4（SEQ ID NO: 3）に融合された、ヒトインスリン前タンパク質シグナル配列（SEQ ID NO: 11）を含む。いくつかの実施形態では、非ヒト生物に天然であるタンパク質由来のシグナル配列が使用され得る。例えば、マウスまたはラットなどの非ヒト哺乳動物由来のシグナル配列が使用され得る。いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物由来のシグナル配列は、その生物に天然であるApoEまたはインスリン分泌シグナル配列である。マウスApoE遺伝子は、NCBI遺伝子ID 11816を有する。ラットApoE遺伝子は、NCBI遺伝子ID 25728を有する。

【0142】

ヒト細胞は、いずれのApoE遺伝子型のものであってもよい。いくつかの実施形態では、それらは、任意のヒトApoEアイソフォームを過剰発現し、かつ/または任意のApoE突然変異を誘導するように遺伝子操作されていてもよい。細胞は、神経前駆細胞、神経細胞、グリア前駆細胞、グリア細胞、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、ApoE媒介性疾患、例えば、ADを患う対象から得られてもよい。いくつかの実施形態では、ヒト細胞は、多能性幹細胞（例えば、ES細胞またはiPS細胞）からのリプログラミングによって、または分化転換によって得られてもよい。以下にさらに記載されているヒト細胞を得る方法または遺伝子操作する方法を使用して、その細胞を得るかまたは遺伝子操作してもよい。

【0143】

ある特定の実施形態は、酵母においてApoE媒介性毒性の修飾遺伝子として同定されている遺伝子及びタンパク質、例えば、他のモデル系で本明細書において特定された遺伝子及びタンパク質（及び/またはそれらの対応物）を試験することを含む方法を提供する。例えば、ApoE誘導性毒性の修飾遺伝子として同定された酵母遺伝子の蠕虫、ハエ、齧歯動物（例えば、マウスまたはラット）対応物が、それぞれ、蠕虫、ハエ、齧歯動物、または、そのような種類の生物から得られる細胞（例えば、初代細胞または細胞株、例えば、不死化細胞株）において過剰発現または阻害もしくは無効化されることができ、あるいは、対応物であるヒト遺伝子が、非ヒト細胞または非ヒト動物において過剰発現されることができる。いくつかの態様では、本発明は、かかる非ヒト動物及び細胞を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は、単離された細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、動物から単離された初代細胞である。いくつかの実施形態では、細胞株が使用される。細胞は、任意のアイソフォームのヒトApoEを発現するように遺伝子操作されてい

10

20

30

40

50

てもよい。

【0144】

いくつかの実施形態では、ヒト細胞は、ApoE 媒介性毒性の修飾遺伝子である酵母遺伝子のヒト相同体を発現もしくは過剰発現するように、または当該ヒト相同体の発現が低減するもしくは当該発現を欠くように、遺伝子操作されていてもよい。ヒト細胞は、様々な実施形態において任意のAPOE 遺伝子型を有し得る。それらは、任意のAPOE 対立遺伝子に対してホモ接合性であってもヘテロ接合性であってもよい。

【0145】

「遺伝子操作された細胞」及び「遺伝子改変された細胞」という用語には、遺伝子改変をもたらす手段に供される細胞、ならびにその修飾を受け継ぐそれらの子孫が含まれることは理解されよう。同様に、「遺伝子操作された生物」及び「遺伝子改変された生物」には、遺伝子改変をもたらす手段に供される生物、ならびにその修飾を受け継ぐそれらの子孫が含まれる。

10

【0146】

いくつかの態様では、選択された標的遺伝子またはそれらのタンパク質産物の発現または活性を調節する（すなわち、上昇または低下させる）化合物を同定するための方法（本明細書において「標的遺伝子スクリーニングアッセイ」とも称される）が、本明細書に記載されている。かかる化合物としては、例えば、ポリペプチド、ペプチド、抗体、ペプチド模倣物、ペプトイド、無機小分子、非核酸有機小分子、核酸（例えば、アンチセンス核酸、siRNA、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド）、炭水化物、あるいは、標的タンパク質に結合するか、または例えば、標的遺伝子の発現もしくは標的タンパク質の活性に対して刺激作用もしくは阻害作用を有する、他の薬剤が挙げられる。上述の被験化合物及び/または化合物ライブラリのいずれも、標的遺伝子スクリーニングアッセイに使用され得る。こうして同定された化合物は、治療プロトコルにおいて、かつ/またはさらなるスクリーニング法において、標的遺伝子または標的タンパク質の発現または活性を調節するために使用することができる。

20

【0147】

いくつかの実施形態では、本発明の標的遺伝子スクリーニングアッセイは、被験試料（すなわち、標的核酸または標的タンパク質を含有する試料）中の標的核酸または標的タンパク質の発現または活性に対する被験化合物の作用をアッセイすることを伴う。被験化合物の存在下での発現または活性は、対照試料（すなわち、同じ条件下だが被験化合物を用いずにインキュベートされている標的タンパク質を含有する試料）における発現または活性と比較され得る。対照と比較した被験試料中での標的核酸または標的タンパク質の発現または活性の変化は、その被験化合物が標的核酸または標的タンパク質の発現または活性を調節し、候補薬剤であることを示す。化合物は、本明細書に記載されている標的タンパク質によって媒介される1つ以上の活性を調節するそれらの能力について試験され得る。例えば、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されている遺伝子の発現またはタンパク質の活性を調節する化合物は、ApoEを発現する細胞において毒性を調節するそれらの能力について試験され得る。そのような活性について化合物をアッセイする方法は、当該技術分野で既知である。場合により、化合物は、標的遺伝子の発現もしくは標的タンパク質への結合に直接影響するその能力（例えば、細胞内の標的RNAの量を低下させること、または細胞内の標的タンパク質の量を低下させることによる）について試験され、かつ/または代謝作用もしくは標的タンパク質に関連する表現型を調節するその能力について試験される。

30

40

【0148】

いくつかの実施形態では、細胞内の標的タンパク質またはその生物活性部分の基質である候補または被験分子をスクリーニングするためのアッセイが提供される。いくつかの実施形態では、アッセイは、標的タンパク質に結合するか、または標的タンパク質もしくはその生物活性部分の活性を調節する、候補または被験化合物をスクリーニングするためのものである。かかる化合物には、標的タンパク質とそのリガンドまたは受容体との間の相

50

相互作用を妨害するものが含まれる。いくつかの実施形態では、アッセイは、かかる化合物を同定するためのスクリーニングを含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、細胞ベースアッセイが用いられ、このアッセイでは、標的タンパク質またはその生物活性部分を発現する細胞を、被験化合物と接触させる。その後、標的タンパク質の発現または活性を調節する被験化合物の能力が判定される。この細胞は、例えば、酵母細胞または哺乳動物起源の細胞、例えば、ラット、マウス、またはヒト細胞であってもよい。

【0150】

被験化合物が標的タンパク質に結合する能力、または化合物（例えば、標的タンパク質基質）に対する標的タンパク質の結合を調節する能力を評価することもできる。これは、例えば、標的タンパク質に対する化合物（例えば基質）の結合性が、複合体内で標識された化合物（例えば基質）を検出することによって判定され得るように、化合物（例えば基質）を、放射性同位体または酵素標識とカップリングすることによって、達成することができる。あるいは、標的タンパク質を放射性同位体または酵素標識とカップリングして、複合体内の標的タンパク質基質に対する標的タンパク質の結合性を調節する被験化合物の能力をモニタリングすることもできる。例えば、化合物（例えば、標的タンパク質基質）は、直接的か間接的かを問わず、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で標識することができ、放射性同位体は、放射線放出（radioemission）の直接計測によって、またはシンチレーション計測によって検出される。あるいは、化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素標識することができ、酵素標識は、適切な基質の産物への変換率の決定によって検出される。

10

20

【0151】

いくつかの実施形態では、化合物が細胞内または細胞表面で標的タンパク質と相互作用する能力は、相互作用物のいずれをも標識することなく評価され得る。例えば、様々なイオンの細胞内濃度、代謝物、pH、または他のパラメータの変化が、好適な指示薬（例えば、イオン感受性またはpH感受性のタンパク質もしくは小分子）を使用して検出され得る。

【0152】

いくつかの実施形態では、細胞不含アッセイが提供され、このアッセイでは、標的タンパク質またはその生物活性部分を被験化合物と接触させて、標的タンパク質またはその生物活性部分に結合する被験化合物の能力を評価する。概して、本明細書に記載されているアッセイで使用される標的タンパク質の生物活性部分には、他の分子との相互作用に關与する断片、例えば、高い表面確率スコアを有する断片が含まれる。いくつかの実施形態では、細胞不含アッセイは、標的タンパク質と被験化合物との反応混合物を、この2つの成分が相互作用及び結合し、その結果、除去及び/または検出され得る複合体を形成することを可能にする条件下で、かつそれに十分な時間で、調製することを伴う。2つの分子間の相互作用は、蛍光エネルギー移動（FET）を使用して検出することもできる（例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号；Stavrianoopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照されたい）。第1の「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、その放出された蛍光エネルギーが第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、次にそれが、吸収されたエネルギーに起因して蛍光を発することができるように、選択される。代替的に、「ドナー」タンパク質分子は、トリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを使用してもよい。「アクセプター」分子標識が「ドナー」のものから区別され得るように、異なる波長の光を発する標識が選択される。標識間のエネルギー移動の効率は分子を隔てる距離に關連するため、分子間の空間的關係を評定することができる。分子間で結合が起こる状況では、このアッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光発光は最大となるはずである。FET結合事象は、当該技術分野において周知である標準的な蛍光定量的検出手段（例えば、蛍光光度計の使用）によって簡便に測定することができる。

30

40

50

【0153】

別の実施形態では、標的タンパク質が標的分子に結合する能力は、リアルタイム生体分子相互作用解析 (BIA) を使用して判定することができる (例えば、Sjoland et al., Anal. Chem., 63: 2338-2345, 1991、及び Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 5: 699-705, 1995)。「表面プラズモン共鳴法」または「BIA」は、相互作用物のいずれをも標識することなく、生体特異的相互作用を実時間で検出する (例えば、BIAcore)。結合表面における質量の変化 (結合事象の兆候) は、表面付近の光の屈折率の変化 (表面プラズモン共鳴法 (SPR) の光学現象) をもたらし、生体分子間の実時間の反応の指標として使用することができる検出可能シグナルがもたらされる。

10

【0154】

これらのうち様々なアッセイにおいて、標的タンパク質または被験物質は、固相上に固着される。固相上に固着された標的タンパク質 / 被験化合物複合体は、反応の最後に検出され得る。概して、標的タンパク質は固体表面上に固着され、被験化合物 (これは固着されない) は、直接的か間接的かを問わず、本明細書において考察される検出可能な標識で標識することができる。標的タンパク質、抗標的タンパク質抗体、またはその標的分子のいずれかを固定化して、タンパク質の一方または両方の複合形態から非複合形態への分離を促進すること、ならびにアッセイの自動化に順応することが望ましい場合がある。標的タンパク質に対する被験化合物の結合、または被験化合物の存在下及び不在下における標的分子との標的タンパク質の相互作用は、反応物質を収容するのに好適な任意の反応槽内で達成することができる。そのような反応槽の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、及び微小遠心管が挙げられる。一実施形態において、タンパク質の一方または両方がマトリクスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ / 標的タンパク質の融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ / 標的融合タンパク質は、グルタチオン Sepharose (商標) ビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸収させることができ、これらはその後、被験化合物または被験化合物、及びいずれかの吸収されていない標的タンパク質と組み合わせられる。次いでこの混合物は、複合体形成に貢献する条件下で (例えば、塩及び pH の生理条件で) インキュベートされる。インキュベーション後、このビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄してあらゆる未結合の成分を除去し、ビーズの場合はマトリクスが固定化され、例えば上述のように複合体が直接的か間接的かを問わず決定される。あるいは、複合体は、マトリクスから解離することができ、標準的技法の使用により標的タンパク質の結合または活性のレベルが判定される。標的タンパク質をマトリクス上に固定化するための他の技法には、ビオチンとストレプトアビジンとの抱合が含まれる。ビオチン化された標的タンパク質は、当該技術分野で既知の技法の使用によりビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-サクシニミド) から調製され、ストレプトアビジンで被覆した 96 ウェルプレートのウェル内に固定化され得る。このアッセイを行うためには、固定化されていない成分を、固着された成分を含有する被覆表面に添加する。反応が完了した後、形成されたあらゆる複合体が固体表面上に固定化されたまま残るような条件下で、未反応の成分を (例えば、洗浄により) 除去する。固体表面上に固着された複合体は、いくつかの方法で検出することができる。それまでに固定化されていない成分が事前標識されている場合、表面上に固定化された標識の存在は、複合体が形成されたことを示す。それまでに固定化されていない成分が事前標識されていない場合、間接標識を使用して、例えば、固定化された成分に特異的な標識抗体を使用することで、表面上に固着された複合体を検出することができる (抗体は次に、例えば、標識抗 Ig 抗体で直接的に標識するか、または間接的に標識することができる)。

20

30

40

【0155】

場合により、このアッセイは、標的タンパク質と反応性であるが、標的タンパク質がその標的分子に結合することに干渉しない抗体を用いて行われる。そのような抗体は、プレ

50

ートのウェルに誘導体化することができ、未結合の標的タンパク質が、抗体抱合によってウェル内に捕捉される。GST固定化複合体に関して上述したものに加えて、かかる複合体を検出するための方法には、標的タンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用した複合体の免疫検出、ならびに標的タンパク質に関連する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが含まれる。

【0156】

あるいは、細胞不含アッセイを液相で行うことができる。そのようなアッセイでは、反応産物は、分画遠心法（例えば、Rivas and Minton, Trends Biochem. Sci., 18:284-7, 1993を参照されたい）、クロマトグラフィ（ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ）、電気泳動（例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York.）、及び免疫沈降（例えば、Ausubel et al., eds., 1999, Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley: New Yorkを参照されたい）を含むがこれらに限定されない、いくつかの標準的技法のいずれかによって、未反応の成分から分離される。そのような樹脂及びクロマトグラフィ技法は、当業者に既知である（例えば、Heegaard, J. Mol. Recognit, 11:141-148, 1998、Hage et al., J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 699:499-525, 1997）。さらに、蛍光エネルギー移動もまた、溶液から複合体をさらに精製することなく結合を検出するために、本明細書に記載されているように簡便に用いられ得る。

10

20

【0157】

このアッセイには、標的タンパク質またはその生物活性部分を標的タンパク質に結合する既知の化合物と接触させてアッセイ混合物を形成させる工程、アッセイ混合物を被験化合物と接触させる工程、及び被験化合物が標的タンパク質と相互作用する能力を判定する工程が含まれ得、被験化合物が標的タンパク質と相互作用する能力を判定する工程には、被験化合物が、既知の化合物と比較して、標的タンパク質もしくはその生物活性部分に優先的に結合する能力、または標的分子の活性を調節する能力を判定する工程が含まれる。

【0158】

標的タンパク質は、インピボで、1つ以上の細胞巨大分子または細胞外巨大分子、例えばタンパク質などと相互作用することができる。この考察の目的では、そのような細胞巨大分子及び細胞外巨大分子は、本明細書において「結合パートナー」と称される。そのような相互作用を妨害する化合物は、標的タンパク質の活性を制御するのに有用である。かかる化合物としては、抗体、ペプチド、及び小分子などの分子を挙げることができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、相互作用を妨害する薬剤の同定に使用するための標的タンパク質は、本明細書において特定される標的タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明は、標的タンパク質または標的タンパク質と同じ生物学的経路もしくはプロセスで機能する別のタンパク質の下流エフェクターの活性の調節によって標的タンパク質の活性を調節する、被験化合物の能力を判定するための方法を提供する。例えば、適切な標的におけるエフェクター分子の活性、または適切な標的に対するエフェクターの結合は、本明細書に記載されているように判定することができる。標的タンパク質とその結合パートナー（複数下）との間の相互作用に干渉する化合物を同定するためには、標的タンパク質及び結合パートナーを含有する反応混合物を、この2つの産物が複合体を形成することを可能にする条件下で、かつそれに十分な時間で調製する。阻害性薬剤を試験するためには、被験化合物の存在下での反応混合物（被験試料）及びその不在下での反応混合物（対照試料）を準備する。被験化合物は、初めに反応混合物中に含めることもでき、または、標的遺伝子及びその細胞性もしくは細胞外結合パートナーを後に添加する時に添加することもできる。対照反応混合物は、被験化合物を伴わずに、または対照化合物と共にインキュベートする。次いで、標的タンパク質と細胞性または細胞外結合パートナーとの複合体の形成を検出する。対照反応物における複合体の形成、及び被験化合物

30

40

50

を含有する反応混合物においてより少ない複合体の形成は、その化合物が、標的タンパク質と相互作用的な結合パートナーとの相互作用に干渉することを示す。かかる化合物は、発現または活性または標的タンパク質を阻害するための候補化合物である。付加的に、被験化合物及び正常な標的タンパク質を含有する反応混合物における複合体形成を、被験化合物及び変異体の標的遺伝子産物を含有する反応混合物における複合体形成と比較することもできる。この比較は、変異体の相互作用を妨害するが正常な標的タンパク質の相互作用は妨害しない化合物を同定することが望ましい場合に重要となり得る。

【0159】

結合アッセイは、液相で行うことも異種形式で行うこともできる。異種アッセイ系の一種では、標的タンパク質または相互作用的な細胞性もしくは細胞外結合パートナーのいずれかが、固体表面（例えば、マイクロタイタープレート）上に固着され、一方で、固着されない種は、直接的か間接的かを問わず標識される。固着された種は、非共有結合または共有結合によって固定化することができる。あるいは、固着させる種に特異的な固定化抗体を使用して、その種を固体表面に固着させることもできる。このアッセイを行うためには、固定化される種のパートナーを、被験化合物の存在下または非存在下で被覆表面に曝露する。反応が完了した後、未反応の成分は（例えば、洗浄により）除去され、形成されたあらゆる複合体が、固体表面に固定化されたまま残る。固定化されていない種が事前標識されている場合、表面上に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。固定化されていない種が事前標識されていない場合、間接標識を使用して、例えば、初めは固定化されない種に特異的な標識抗体を使用することで、表面上に固着された複合体を検出することができる（抗体は次に、例えば、標識抗Ig抗体で直接的に標識するか、または間接的に標識することができる）。反応成分の添加の順序に応じて、複合体形成を阻害するか、または予め形成された複合体を破壊する被験化合物を検出することができる。

10

20

30

40

【0160】

別の実施形態では、標的発現の調節因子（RNAまたはタンパク質）が同定される。例えば、細胞または細胞不含混合物を被験化合物と接触させて、標的mRNAまたはタンパク質の発現を、被験化合物の不在下での標的mRNAまたはタンパク質の発現レベルと相対的に評価する。標的mRNAまたはタンパク質の発現が被験化合物の不在下よりもその存在下で多い場合、この被験化合物は、標的mRNAまたはタンパク質の発現の刺激因子（候補化合物）として同定される。あるいは、標的mRNAまたはタンパク質の発現が被験化合物の不在下よりもその存在下で少ない（統計的に有意に少ない）場合、この被験化合物は、標的mRNAまたはタンパク質の発現の阻害因子として同定される。標的mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、本明細書に記載されている方法及び当該技術分野で既知の方法、例えば、それぞれ、標的mRNAを検出するためのノーザンプロット、マイクロアレイハイブリダイゼーション、逆転写（RT-PCR）、もしくはRNA配列決定（RNA-Seq）、または標的タンパク質を検出するためのウェスタンプロットもしくはイムノアッセイ（例えば、ELISAアッセイ、蛍光標識抗体、SPR）などによって判定することができる。

【0161】

別の態様では、本明細書に記載されている方法は、本明細書に記載されているアッセイの2つ以上の組み合わせに関連する。例えば、調節剤は、細胞ベースまたは細胞不含のアッセイを使用して同定ことができ、この薬剤が標的タンパク質の活性を調節する能力は、インビボで、例えば、動物において確認することができる。動物は、例えば、正常な動物であっても、ApoE媒介性疾患、例えば、アルツハイマー病の動物モデルであってもよい。

【0162】

本発明の態様はさらに、本明細書に記載されているスクリーニングアッセイによって同定された薬剤に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているように同定された薬剤（化合物）（例えば、標的タンパク質調節剤、siRNA、標的タンパク質

50

特異性抗体、または標的タンパク質結合パートナー)は、かかる薬剤を用いた治療の有効性、毒性、副作用、または作用機序を判定するために適切な動物モデルにおいて試験される。さらに、上述のスクリーニングアッセイによって同定された薬剤は、本明細書に記載されているように治療に使用することができる。標的タンパク質の発現または活性を調節する化合物(標的タンパク質調節因子)は、その標的タンパク質(例えば、標的タンパク質の発現または活性の低下)と関連する生物学的または生化学的作用に影響する能力について、当該技術分野で既知の方法及び本明細書に記載されている方法の使用により試験することができる。例えば、化合物がApoE媒介性毒性を調節する能力は、アルツハイマー病のインビトロまたはインビボモデルを使用して試験することができる。

【0163】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナー

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法が、本明細書に開示される。前出の酵母細胞もしくは哺乳動物(例えば、ヒト)細胞のいずれか、または本明細書に記載されている任意の酵母細胞もしくは哺乳動物(例えば、ヒト)細胞が、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法において使用され得る。ヒトApoEタンパク質の結合パートナーは、内因性ポリペプチドであってもよい。本明細書で使用される場合、「内因性タンパク質」は、生物、組織、または細胞内に起源をもつタンパク質である。典型的には、内因性タンパク質は、例えば、生物の野生型ゲノムによってコードされる、天然のタンパク質である。他の実施形態では、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーは、内因性脂質であってもよい。本明細書で使用される場合、「内因性脂質」は、生物、組織、または細胞内に起源をもつ脂質である。典型的には、内因性脂質は、天然の脂質である。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーは、本明細書に記載されている標的タンパク質と見なされてもよい。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーは、治療標的候補であってもよい。

【0164】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法であって、本明細書に記載されている細胞を提供する工程；ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸を発現させる工程；及びポリペプチドに結合する内因性ポリペプチドまたは内因性脂質を同定する工程であって、それによってヒトApoEタンパク質結合パートナーが同定される、工程；を含む方法が、本明細書に開示される。

【0165】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法であって、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む酵母細胞を提供する工程；核酸の発現を可能にする条件下にて酵母細胞を培養する工程；及びポリペプチドに結合する内因性酵母ポリペプチドを同定する工程であって、それによってヒトApoEタンパク質結合パートナーが同定される、工程；を含む方法も、本明細書に開示される。

【0166】

ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法であって、ヒトApoEタンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸を、当該核酸の発現を可能にする条件下にて酵母細胞において発現させる工程；及びポリペプチドに結合する内因性脂質または内因性ポリペプチドを同定する工程；を含む方法も、本明細書に開示され、該同定する工程は、(i)ヒトApoEタンパク質複合体を単離する工程；及び(ii)ヒトApoEタンパク質複体内に存在する内因性脂質または内因性ポリペプチドを質量分析によって同定する工程であって、それによって内因性脂質または内因性ポリペプチドがヒトApoEタンパク質の結合パートナーとして同定される、工程を含む。

【0167】

ヒトApoEタンパク質は、ApoE2、ApoE3、及びApoE4から選択され得る。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質は、ApoE2である。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質は、ApoE3である。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、ヒトApoEタンパク質は、ApoE4である。本明細書に記載されているかまたは当該技術分野で既知であるヒトApoEタンパク質もしくはそのバリエーションのうちいずれも、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法において使用され得る。

【0168】

いくつかの実施形態では、ヒトApoE結合タンパク質を含むポリペプチドは、検出可能なマーカーを含む。いくつかの実施形態では、検出可能なマーカーは、蛍光タンパク質またはエピトプタグである。いくつかの実施形態では、検出可能なマーカーは、蛍光タンパク質である。本明細書に記載され、かつ/または当該技術分野で既知である蛍光タンパク質のうちいずれも、本発明の方法において使用され得る。他の実施形態では、検出可能なマーカーは、エピトプタグである。いくつかの実施形態では、エピトプタグは、タンデムアフィニティー精製タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ、V5タグ、ポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質タグ、キチン結合タンパク質タグ、カルモジュリンタグ、Eタグ、SPBタグ、Streptタグ、VSVタグ、Fc、ヘマグルチニンタグ、mycタグ、及びFLAGタグからなる群より選択される。しかしながら、他の好適なエピトプタグが当該技術分野で知られており、本発明の方法において使用され得る。

10

【0169】

いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法は、細胞を溶解して抽出物を生成することを伴い得る。任意の好適な細胞溶解方法が、本発明の方法において使用され得る。当業者は、異なる細胞が異なる好適な細胞溶解方法を有することを認識している。酵母細胞の溶解は、例えば、機械的溶解（例えば、ビーズ叩解（bead beating）または乳鉢及び乳棒を用いた凍結酵母細胞の粉砕）、液体均質化（例えば、フレンチプレス）、超音波処理、酵素消化（例えば、ザイモリアーゼもしくはリチカーゼによる、またはアルカリ（例えば、NaOH）溶解などを伴い得る。哺乳動物細胞の溶解は、例えば、洗剤ベースの細胞溶解、機械的溶解（例えば、Waringブレンダー）、液体均質化（例えば、フレンチプレス、ダウンス型ホモジナイザー）、超音波処理、凍結融解などを伴い得る。

20

【0170】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、抽出物からヒトApoEタンパク質を単離してヒトApoE複合体を形成させることを伴う。タンパク質を単離する任意の好適な方法が、本発明の方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、ヒトApoEタンパク質を単離する工程は、共免疫沈降、同時精製、アフィニティークロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、またはイオン交換クロマトグラフィを含む。いくつかの実施形態では、検出可能なマーカーが、抽出物からヒトApoEタンパク質を単離する際に使用される。他の実施形態では、ヒトApoEタンパク質に特異的に結合する抗体が、例えば、免疫沈降またはアフィニティークロマトグラフィによるヒトApoEタンパク質の単離に使用される。

30

【0171】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、ヒトApoEタンパク質複体内に存在する内因性ポリペプチドを同定する工程を伴う。例えば、ウェスタンブロット、質量分析、エドマン分解など、内因性ポリペプチドを同定するための任意の好適な方法が、本発明の方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、ApoEタンパク質複体内に存在する内因性ポリペプチドを同定する工程は、質量分析またはエドマン分解を含む。質量分析（MS）の任意の好適な方法、例えば、マトリクス支援レーザー脱離/イオン化（MALDI）質量分析（例えば、MALDI-TOF質量分析）、及び液体クロマトグラフィ（LC）-MS、例えば、LC/MS/MSを使用して、内因性ポリペプチドを同定してもよい。

40

【0172】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、ヒトApoEタンパク質複体内に存在する内因性脂質を同定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、内因性脂質を同定

50

する工程は、質量分析を含む。他の実施形態では、内因性脂質を同定する工程は、代謝標識及び薄層クロマトグラフィを含む。エレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）、MALDI-MS、大気圧化学イオン化（APCI）質量分析、及びガスクロマトグラフィ-質量分析（GC-MS）を含む、質量分析の任意の好適な方法を使用して、内因性脂質を同定してもよい。

【0173】

本発明の方法によって同定されるヒト ApoE タンパク質の結合パートナーは、ApoE 関連疾患の治療のための治療標的候補であってもよい。いくつかの実施形態では、ApoE 関連疾患は、ApoE4 関連神経変性疾患である。いくつかの実施形態では、ApoE4 関連疾患は、アルツハイマー病、血管性認知障害、脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、または多発性硬化症である。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、ApoE 媒介性毒性に關与する生物学的プロセスまたは生物学的経路を、本発明の工程によって同定された結合パートナーの同一性に基づいて同定する工程をさらに含んでもよい。

10

【0174】

標的遺伝子またはタンパク質の発現または活性の調節因子

標的遺伝子またはタンパク質の発現または活性を調節する方法は、多様な化合物を使用して達成することができる。標的タンパク質の発現または活性を阻害または増強するために有用であり得る化合物には、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、非核酸有機小分子、無機小分子、抗体またはその断片、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、及びリボザイムが含まれる。かかる化合物を同定及び/または産生する例示的な方法は、本明細書に記載されている。

20

【0175】

核酸

標的 RNA を標的化する分子、例えば、核酸は、本明細書に記載されている方法のうちの特定のもの、例えば、標的タンパク質発現の阻害に関して、例えば、アルツハイマー病などの ApoE 媒介性疾患を治療するために有用である。かかる核酸の例としては、低分子干渉 RNA (siRNA) または RNA 干渉 (RNAi) により遺伝子発現を阻害する低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) などの二本鎖 RNA が挙げられる。本明細書に記載されている有用な核酸分子または構築物としては、例えば、各鎖内に 15 ~ 30 個のヌクレオチド、例えば、各鎖内に 15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、または 30 個のヌクレオチド（例えば、19 ~ 21 個のヌクレオチド）を含む、siRNA 分子が挙げられ、その鎖のうちの 1 本は、標的 mRNA 内の標的領域に対して実質的に相補的、例えば、少なくとも 80%（またはそれ以上、例えば、85%、90%、95%、または 100%）相補的であり、例えば、3 個、2 個、1 個、または 0 個のミスマッチ（すなわち、非相補的）ヌクレオチドを有し、他方の鎖は、第 1 の鎖に対して実質的に相補的である。いくつかの実施形態では、siRNA は、少なくとも 15 個のヌクレオチドの長さ、例えば、15 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの、二本鎖部分を含む。いくつかの実施形態では、siRNA は、一方または両方の鎖上に 3' オーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、3' オーバーハングは、1 ~ 5 個のヌクレオチド、例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、または 5 個のヌクレオチドの長さであり、この長さは、2 本の鎖上で同じであっても異なってもよい。当該技術分野で既知であるように、shRNA は同様の二本鎖部分を含むが、鎖はループ構造で接続されている。

30

40

【0176】

dsRNA 分子（例えば、siRNA）は、当該技術分野で既知の方法を使用して生成することができる。例えば、それらは、化学合成することができ、DNA 鋳型からインビトロまたはインビボで転写することができる。dsRNA 分子は、当該技術分野で既知の方法を使用して設計することができる。多様な異なるコンピュータプログラムが、siRNA 設計を支援するために利用可能である。例えば、Muhonen P & Holt h o f e r H (2010) Methods Mol Biol . 2010 ; 623 : 9

50

3 - 107を、多数の*siRNA*設計ツールの概説及びウェブサイトへのリンクについて参照されたい。*siRNA*の配列は、「オフターゲット」効果の可能性を低減させるように選択され得る。例えば、ゲノムに特有の（例えば、ヒトゲノムに特有の）配列を、*siRNA*設計のための標的配列として選択することができる。所望の場合、陰性対照*siRNA*（「スクランブル型」）を使用して、標的遺伝子発現に対する*siRNA*の効果を確認し、かつ/またはアミロイド 媒介性毒性に対する*siRNA*の効果を確認することができる。かかる*siRNA*は概して、選択された*siRNA*と同じヌクレオチド組成を有するが、適切なゲノムに対する著しい配列相補性を有しない。そのような陰性対照は、選択された*siRNA*のヌクレオチド配列をランダムにスクランブルすることによって設計することができ、この陰性対照が適切なゲノムにおいていずれの他の遺伝子に対する相同性も欠いていることを確実にするために、相同性検索を行うことができる。対照は、選択された*siRNA*配列に適切な数の塩基ミスマッチを導入することによって設計することもできる。

10

20

30

40

50

【0177】

本明細書に記載されている方法のうちの特定のものに有用である核酸組成物には、*siRNA*と架橋*siRNA*誘導体との両方が含まれる。架橋は、組成物の薬物動態を変更するため、例えば、体内での半減期を減少させるために使用することができる。したがって、本発明は、2本の鎖が架橋されるように実質的に相補的な2本の核酸鎖を有する*siRNA*を含む、*siRNA*誘導体を含む。例えば、鎖のうちの1本の3'OH末端を修飾することができ、または2本の鎖を架橋し、3'OH末端において修飾することができる。*siRNA*誘導体は、単一の架橋（例えば、ソラレン架橋）を含有することができる。場合により、*siRNA*または*siRNA*誘導体は、例えば、その3'末端に、ビオチン分子（例えば、光切断可能ビオチン）、ペプチド（例えば、Tatペプチド）、ナノ粒子、ペプチド模倣物、有機化合物（例えば、蛍光色素などの色素）、または dendrimer を有する。この方法で*siRNA*もしくは*siRNA*誘導体を修飾することは、対応する未修飾の*siRNA*もしくは*siRNA*誘導体と比較して、結果として得られる*siRNA*もしくは*siRNA*誘導体の細胞取り込みを向上させること、またはその細胞標的化活性を増強することができ、細胞内の*siRNA*もしくは*siRNA*誘導体の追跡のために有用であり、あるいは、*siRNA*誘導体の安定性を対応する*siRNA*と比較して向上させることができる。

【0178】

マイクロRNA (*miRNA*) は、転写後または翻訳後レベルにおける遺伝子発現を制御することができる、およそ22個のヌクレオチドの長さの内因性非コードRNAである。多数の動物遺伝子が、時として細胞もしくは組織特異的、または発生段階特異的な様式で、*miRNA*によって制御される。*miRNA*は、およそ70個のヌクレオチド前駆体RNAステムループ（これはより長いRNA前駆体から得られる）から切除される。*miRNA*前駆体のステム配列を、標的mRNAに対して実質的に相補的な配列と置換することによって、新規の*miRNA*を発現するベクター構築物を使用して*siRNA*を産生して、哺乳動物細胞において特異的mRNA標的に対するRNAiを開始することができる。他の実施形態では、標的遺伝子の発現を阻害する天然の内因性*miRNA*が同定されるか、または人工*miRNA*が設計される。そのような*miRNA*は、過剰発現するか、または細胞もしくは対象に送達してもよく（標的遺伝子を阻害するために）、あるいは、標的遺伝子の発現を上方制御するために（例えば、*miRNA*に対してアンチセンスである「アンタゴミル」と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドを使用して）その作用を阻害してもよい。

【0179】

アンチセンス核酸は、本発明のある特定の実施形態において標的タンパク質の発現を阻害するために有用である。アンチセンス核酸分子は、ヌクレオチド配列がRNA（例えば、標的タンパク質をコードするmRNA）の全てまたは一部に対して実質的に相補的である、一本鎖分子である。アンチセンス核酸分子は、標的タンパク質をコードするヌクレオ

チド配列のコード鎖の非コード領域もしくはコード領域の全てまたは一部に対してアンチセンスであり得る。当該技術分野で既知であるように、非コード領域（「5'及び3'非翻訳領域」）は、コード領域に隣接する5'及び3'配列であり、アミノ酸に翻訳されない。本明細書に開示されるヌクレオチド配列に基づいて、当業者は、本明細書において特定される遺伝子を標的化するためのいくつかの適切なアンチセンス分子のうちのいずれかを選択し、合成することができる。例えば、核酸（例えば、標的核酸）の長さ及び15～30個のヌクレオチドの一連のオリゴヌクレオチドを調製し、続いて、遺伝子の発現の阻害について試験することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5個、10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、または50個のヌクレオチドの長さ、またはそれより長くてもよい。本明細書に記載されているアンチセンス核酸は、当該技術分野で既知の手段を用いる化学合成及び/または酵素的連結反応を使用して構築することができる。

【0180】

場合により、標的遺伝子の発現を調節するために、siRNAもしくはmiRNAまたはアンチセンス分子のプールが使用される。このプールは、標的遺伝子を標的とする少なくとも2個、3個、4個、5個、8個、または10個の異なる配列から構成される。

【0181】

アプタマーは、それらがタンパク質リガンドに特異的に結合することを可能にする構造を有する核酸分子であり、標的タンパク質活性を特異的に低下させる手段を提示する（例えば、Osborne, et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1: 5-9, 1997、及びPatel, Curr. Opin. Chem. Biol., 1: 32-46, 1997、Mayer G. (2009) Angew Chem Int Ed Engl. 48(15): 2672-89を参照されたい）。アプタマーは、試験管内進化法と呼ばれる技法（SELEX、Stoltenburg R, et al. Biomol Eng. (2007) 24(4): 381-403において概説されている）を使用して同定することができる。本発明は、本明細書において特定される標的タンパク質に特異的に結合し、かつそれを阻害する、アプタマーの同定を提供する。

【0182】

核酸（例えば、siRNA、アプタマー）は、標準的ヌクレオチド（A、G、C、T、U）、非標準的ヌクレオチド（これは、天然のヌクレオチドであってもそうでなくてもよい）、または、例えば、分子の生物学的安定性を上昇させるように、もしくは相補性核酸間に形成される二本鎖の物理的安定性を上昇させるように設計された、様々な修飾されたヌクレオチドを含むことができる。核酸は、修飾塩基、修飾骨格（例えば、修飾された糖、及び/または修飾されたヌクレオチド間結合（DNA及びRNA内に見出される塩基、糖、及びリン酸ジエステル骨格と比較して）を含むヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、核酸修飾は、核酸を安定化するように（例えば、ヌクレアーゼに対するその感応性を低減させるように）、または別様に体内でのその半減期を減少させるように選択される。修飾されたヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、S-カルボキシメチルアミノメチル-Z-チオイリジリ-e (thioiridiri-e)、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、D-ガラクトシルケオシン (galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル (thiour-acil)、D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、ワイブトキシソシン (wybutoxosine)、シュードウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メ

10

20

30

40

50

チル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、及び2, 6 - ジアミノプリンが挙げられる。修飾された糖としては、例えば、2' - Oアルキル誘導体が挙げられる。修飾されたヌクレオチド間結合には、例えば、ホスホロチオエート誘導体、ペプチド核酸、モルホリノ及びロックド核酸、ならびにグリコール核酸及びトレース核酸構造の使用が含まれる。本発明の様々な実施形態で使用するための例示的な核酸修飾、例えば、siRNAの考察については、例えば、Deleavey, G, et al., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry 16.3.1 - 16.3.22, 2009を参照されたい。修飾は、一方または両方の鎖内に存在してよく、様々な実施形態において、鎖全体に位置しても特定の位置に位置してもよい。複数の異なる修飾を組み合わせることができる。

10

【0183】

核酸(例えば、siRNA、miRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸)の例示的な投与経路としては、組織部位における、例えば注射による、直接投与が挙げられる。例えば、それらは、脳に直接投与されてもよい。あるいは、核酸分子は、選択された細胞または組織を標的とするように任意に修飾され、全身投与されてもよい。例えば、全身投与の場合、例えば、細胞表面受容体もしくは抗原に結合するペプチド、小分子、または抗体と核酸分子を結合させることによって、選択された細胞表面上に発現される受容体または抗原に分子が特異的に結合するように、分子を修飾することができる。

20

【0184】

核酸、例えば、siRNAは、多様な手段、例えば、カチオン性リポソームトランスフェクション及び電気穿孔によって、細胞内に送達することができる。配列の安定性または細胞取り込みを向上させるように修飾されている配列を使用することができる。そのような安定化分子は、標的タンパク質発現を低下させるための対象への投与などのインビボ法に特に有用である。化合物、例えば、核酸、例えば、siRNAは、それらの標的を細胞または組織、例えば、脳に定める多様な部分に抱合され得る。例えば、ビタミンE(トコフェロール)をsiRNAに抱合させることができ、抱合されたsiRNAは、任意にHDLと共に送達される。いくつかの実施形態では、化合物は、神経細胞によって発現される受容体に結合する部分に抱合される。発現は、細胞にsiRNA分子(または他の核酸)を発現させるベクター(例えば、ウイルスベクター)を、細胞、例えば、神経細胞に送達することによって達成することができる。このベクターは、低分子ヘアピン型RNAもしくはmiRNA前駆体をコードする配列またはアンチセンスRNAをコードする配列が、目的の細胞型における発現を指示するプロモーター(例えば、Pol IIまたはPol IIIプロモーター)に機能的に連結されている、組換え核酸を含むことができる。

30

【0185】

ウイルス媒介性送達機序は、例えば、組換えアデノウイルス、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスを含み、そのようなウイルスから得られるゲノムの少なくとも一部を含むベクターも、例えば、研究目的または治療目的で、細胞においてshRNA及び/またはmiRNA前駆体を発現させるために用いられる。

40

【0186】

ナノ粒子及びリポソームを使用して、核酸、例えば、オリゴヌクレオチド、例えば、siRNAを、細胞または生物(例えば、非ヒト動物またはヒト)に送達することもできる。同様に、いくつかの実施形態では、ウイルス遺伝子送達、直接注射、ナノ粒子粒子媒介性注射、またはリポソーム注射を使用して、siRNAを発現するか、またはそれを細胞または非ヒト動物もしくはヒトに導入してもよい。

【0187】

いくつかの実施形態では、siRNAまたは標的タンパク質の発現または活性を阻害す

50

る他の化合物は、標的RNAレベルが少なくとも25%、50%、75%、90%、または95%低減されるとき、ApoEの望ましくない効果を緩和するのに有効である。場合により、標的RNAレベルは、10%、25%、50%、または75%以上低減されないことが望ましい。標的遺伝子発現（またはその低減）のレベルを判定する方法は、当該技術分野で既知である。例えば、標的RNAのレベルは、細胞（例えば、細胞株の）または対象由来の試料に、例えば、ノーザンブロット、マイクロアレイ、RT-PCR、またはRNA-SEQを用いることによって判定することができる。標的タンパク質のレベルは、例えば、ウェスタンブロット、イムノアッセイ法などを使用して測定することもできる。そのような方法は、例えば、標的mRNAまたはタンパク質に対する、小分子、ペプチド、抗体、核酸、または他の化合物の作用を評定するために使用することができる。

10

【0188】

ポリペプチド

単離された標的タンパク質、その断片、及びそのバリエーションが、本明細書において提供される。これらのポリペプチドは、例えば、抗体を産生するための免疫原として、スクリーニング法において、または、例えば、標的タンパク質の投与によって対象を治療する方法において使用することができる。「単離された」もしくは「精製された」ポリペプチドまたはその生物活性部分は、タンパク質が得られる細胞源もしくは組織源に由来する細胞性物質または他の混入タンパク質を実質的に含まないか、あるいは、化学合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。「細胞性物質を実質的に含まない」という言い回しには、目的のポリペプチドが、それが単離されるかまたは組換え産生される細胞の細胞構成要素から単離される、ポリペプチドの調製物が含まれる。したがって、細胞性物質を実質的に含まないポリペプチドには、約30%、20%、10%、または5%未満（乾燥重量による）の異種タンパク質（本明細書において「混入タンパク質」とも称される）を有するポリペプチドの調製物が含まれる。概して、ポリペプチドまたはその生物活性部分が組換え産生されるとき、それは培養培地も実質的に含まず、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の体積の約20%、10%、または5%未満に相当する。概して、ポリペプチドが化学合成によって産生されるとき、それは化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、すなわち、それは、ポリペプチドの合成に關与する化学的前駆体または他の化学物質から分離される。したがって、ポリペプチドのそのような調製物は、目的のポリペプチド以外の化学的前駆体または化合物を約30%、20%、10%

20

30

【0189】

本明細書で使用される場合、標的タンパク質の「生物活性部分」は、完全長タンパク質の少なくとも1つの生物学的機能を保持する標的タンパク質の一部を含む。生物活性部分は、完全長タンパク質の活性とは規模が異なる活性を有してもよい。例えば、生物活性部分は、活性完全長部分の20%~100%の活性を有してもよい。いくつかの実施形態では、生物活性部分は、完全長部分と比べて上昇した活性を有してもよい（例えば、完全長部分に存在する阻害性ドメインを生物活性部分が欠いている場合）。いくつかの実施形態では、生物活性部分は、第2の分子、例えば、異なるタンパク質との相互作用に關与する能力を保持してもよい。標的タンパク質の生物活性部分には、完全長標的タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、標的タンパク質の少なくとも1つの活性を示すポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、生物活性部分は、標的タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。いくつかの実施形態では、その活性は、アミロイド 媒介性毒性を抑制または増強する能力である。いくつかの実施形態では、その活性は、酵素活性である。

40

【0190】

50

標的タンパク質の生物活性部分は、例えば、10個、25個、50個、75個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、またはそれよりも多くのアミノ酸の長さであるポリペプチドとすることができる。それは、例えば、親ポリペプチドと10%~99.9%同じ長さであってもよい。標的タンパク質の生物活性部分は、標的タンパク質媒介性活性を調節する薬剤、例えば、標的タンパク質活性を阻害する化合物を開発するための標的として使用することができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、本明細書に開示される配列（例えば、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されているアクセッション番号、遺伝子名、または遺伝子識別子の下に見出されるか、あるいは表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されているアクセッション番号、遺伝子名、または遺伝子識別子の下に見出される核酸もしくは遺伝子によってコードされる、アミノ酸）と同一の配列を有する。他の有用なポリペプチドは、任意のかかる配列と実質的に同一（例えば、少なくとも約45%、55%、65%、75%、85%、95%、96%、97%、98%、または99%同一）であり、(a)標的タンパク質の少なくとも1つの機能的活性を保持するが、天然の対立遺伝子変異もしくは変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるか、または、(b)所望の場合、変更された（例えば、ドミナントネガティブとしての）機能的活性を示す。作動薬（模倣物）として、あるいは拮抗剤として機能し得る、変更されたアミノ酸配列を有するバリエーションが、本明細書において提供される。バリエーションは、変異誘発、例えば、離散点突然変異またはトランケーションによって生成することができる。作動薬は、天然のポリペプチドの生物活性と実質的に同じ生物活性、またはその部分集合を保持することができる。ポリペプチドの拮抗剤は、天然のポリペプチドの活性のうち1つ以上を、例えば、そのポリペプチドを含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーと競合的に結合することによって阻害することができる。したがって、限定された機能のバリエーションを用いる治療によって、特異的な生物学的効果を誘発することができる。天然のポリペプチドの生物活性の部分集合を有するバリエーションを用いた対象の治療は、天然のポリペプチドを用いた治療と比べてより少ない副作用を対象に及ぼし得る。いくつかの実施形態では、バリエーション標的タンパク質は、標的タンパク質のドミナントネガティブ型である。ドミナントネガティブは、例えば、標的タンパク質作用の阻害が所望される方法において使用することができる。配列の比較及び2個の配列間の同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを使用して達成される。いくつかの実施形態では、2個のアミノ酸配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ内のGAPプログラムに組み込まれている、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 444-453, 1970)アルゴリズムを用い、Blosum62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびにギャップ重み16及び長さ重み1を使用して決定される。2個のヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ内のGAPプログラムを用い、NWsgapdna.CMPマトリクス、ギャップ重み40、及び長さ重み1を使用して決定することができる。

【0191】

概して、本明細書において言及されるアミノ酸配列間の同一性パーセントは、BLAST 2.0プログラムを使用して決定することができ、このプログラムは、インターネット上でncbi.nlm.nih.gov/BLASTにて公衆に利用可能である。いくつかの実施形態では、配列比較は、ギャップ無し(ungapped)アライメントを使用し、またデフォルトパラメータ(Blosum 62マトリクス、ギャップ存在コスト11、1残基当たりのギャップコスト1、及びラムダ比0.85)を使用して行われる。いくつかの実施形態では、デフォルトパラメータが使用される。BLASTプログラムで使用される数学アルゴリズムは、Altschulet al., Nucleic Acids Research 25: 3389-3402, 1997に記載されている。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野に

において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。したがって、標的タンパク質において予測される非必須アミノ酸残基は、概して、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基で置き換えられる。あるいは、飽和変異誘発などによって、標的タンパク質コード配列の全てまたは一部に沿って、突然変異をランダムに導入することができ、結果として生じる変異体を、標的タンパク質の生物活性についてスクリーニングして、活性を保持する変異体を同定することができる。コードされるタンパク質は、組換え発現させることができ、タンパク質の活性を判定することができる。

10

【0192】

標的タンパク質の少なくとも一部分（例えば、生物活性部分）と、検出タンパク質（例えば、蛍光タンパク質、酵素、またはエピトープタグ）などの第2のタンパク質の少なくとも一部分（例えば、生物活性部分）とを含む、キメラタンパク質または融合タンパク質がまた、本明細書において提供される。

20

【0193】

標的タンパク質（例えば、ヒト標的タンパク質）またはその断片もしくはバリエーションあるいは標的タンパク質を含むキメラタンパク質または融合タンパク質をコードする核酸が提供され、かかる核酸は、例えば、発現ベクター内のプロモーターに機能的に連結される。かかる核酸は、例えば、治療目的または研究目的でタンパク質を発現するために、例えば、タンパク質をインビボで（例えば、治療目的でヒト対象において、または動物モデルにおいて）またはインビトロで産生するために（例えば、治療、研究、または他の目的でタンパク質を産生するために）用いられる。いくつかの実施形態では、ApoEを含むポリペプチドを発現し、標的タンパク質を含むポリペプチドを発現もしくは過剰発現するか、または標的タンパク質の発現が低減もしくは欠如している細胞、例えば、酵母細胞が、細胞モデルとして、例えば、ApoE媒介性毒性を調節する化合物または修飾遺伝子を同定するために用いられる。いくつかの実施形態では、タンパク質を過剰発現するか、またはタンパク質の減少した発現を有する、単離哺乳動物細胞が、細胞モデルとして有用である。プロモーターは、目的の細胞、例えば、細菌、酵母または他の真菌、植物、無脊椎動物（例えば、昆虫、蠕虫、ハエ）、脊椎動物（例えば、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、もしくはヒト、またはトリ）においてタンパク質の発現を指示するように適切に選択されてよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは制御可能（例えば、誘導可能）である。いくつかの実施形態では、プロモーターは、例えば、神経細胞、グリア細胞、またはそれらの前駆体に対して、組織型または細胞型特異的である。当業者であれば、好適なプロモーター及び発現ベクターならびに細胞内に核酸を導入する方法を把握しているであろう。例えば、哺乳動物細胞における使用に好適な制御可能プロモーターには、テトラサイクリン応答性プロモーター、ホルモン応答性プロモーターなどの小分子によって制御可能なものが含まれる。哺乳動物系で一般的に使用される構成的プロモーターには、サルウイルス40初期プロモーター（SV40）及びサイトメガロウイルス最初期プロモーター（CMV）などのウイルスプロモーター、ヒトユビキチンCプロモーター（UBC）、ヒト延長因子1プロモーター（EF1A）、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモーター（PGK）、及びヒト-アクチンプロモーターなどの哺乳動物起源のプロモーター、ならびにCAGプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。いくつかの実施形態では、相同マウスもしくは他の非ヒト哺乳動物またはトリ遺伝子由来のプロモーターを、ある特定の実施形態におけるヒト遺伝子由来のプロモーターの代わりに使用してもよい。哺乳動物細胞において有用な制御可能プロモーターには、テトラサイクリン応答

30

40

50

要素 (T R E) プロモーター (テトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどのその誘導体を使用して誘導可能) が含まれ、その転写は、どの t e t トランス活性化因子 (テトラサイクリンもしくはその誘導体の存在下で発現を遮断する (T e t - O f f) テトラサイクリントランス活性化因子 (t T A)、またはテトラサイクリンもしくはその誘導体の存在下で発現を作動させる (T e t - O n) リバーステトラサイクリン制御トランス活性化因子 (r t T A) が使用されるかに応じて、誘導または抑圧され得る。イントロン配列及び / またはポリアデニル化シグナルがまた、例えば、発現効率を上昇させるために、発現構築物内に含まれ得ることは理解されよう。本明細書に記載されている、細胞内に核酸を導入するか、もしくは対象に核酸を投与方法、または当該技術分野で既知であるその他のものが、任意の目的の核酸を細胞または非ヒト動物に送達するために使用される。例えば、かかる方法は、例えば、A p o E 媒介性毒性の細胞または非ヒト動物モデルを生成する目的のために、A p o E をコードする核酸を細胞または非ヒト動物に送達するために使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 4 】

抗体

いくつかの態様では、本発明は、本明細書において特定される標的タンパク質、例えば、表 1 A、1 B、1 C、1 D、2 A、2 B、2 C、及び 3 のいずれか 1 つ以上に列記されているか、または本明細書に記載される方法のうち 1 つ以上において別様に用いられる標的タンパク質に結合する、抗体を提供する。本明細書で使用される「抗体」は、本発明の様々な実施形態において、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、または一本鎖抗体、ならびにそれらの F a b、F (a b ') 2、及び F a b 発現ライブラリ断片、s c F V 分子、ならびにエピトープ結合断片とすることができる。標的タンパク質またはその断片は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体調製のための標準的技法を使用して抗体を生成するために免疫原として使用することができる。完全長ポリペプチドまたはタンパク質を使用することができ、あるいは、抗原性ペプチド断片を免疫原として使用することもできる。タンパク質の抗原性ペプチドは、典型的には、標的タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも 8 個 (例えば、少なくとも 10 個、15 個、20 個、または 30 個) のアミノ酸残基を含み、ペプチドに対して産生された抗体がポリペプチドと特異的な免疫複合体を形成するような、標的タンパク質のエピトープを包含する。

【 0 1 9 5 】

免疫原は典型的に、好適な対象 (例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物) を免役することによって抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現または化学合成されたポリペプチドを含有することができる。この調製物は、フロイントの完全もしくは不完全アジュバントなどのアジュバント、または同様の免疫刺激薬をさらに含むことができる。

【 0 1 9 6 】

ポリクローナル抗体は、好適な対象を免疫原としての標的タンパク質で免疫することによって、上述のように調製することができる。免疫された対象における抗体価は、標準的技法によって、例えば、固定化されたポリペプチドを使用した酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) などで、経時的にモニタリングすることができる。所望の場合、抗体分子を哺乳動物から (例えば、血液から) 単離して、プロテイン A クロマトグラフィなどの周知の技法によってさらに精製して、I g G 画分を得ることができる。免疫後の適切な時点において、例えば、特異的抗体価が最も高いとき、抗体産生細胞を対象から得て、標準的技法、例えば、K o h l e r a n d M i l s t e i n , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 , 1 9 7 5 に最初に記載されたハイブリドーマ技法、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技法 (K o z b o r e t a l . , I m m u n o l . T o d a y , 4 : 7 2 , 1 9 8 3)、E B V ハイブリドーマ技法 (C o l e e t a l . , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y , A l a n R . L i s s , I n c . , p p . 7 7 - 9 6 , 1 9 8 5)、またはトリオーマ技法などによって、モノ

クローナル抗体を調製するために使用することができる。ハイブリドーマを産生するための技術は周知である。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISAアッセイを使用して、目的のポリペプチドに結合する抗体についてハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって、検出することができる。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する代替手段として、目的のポリペプチドを用いて組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリ（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリ）をスクリーニングすることによって、ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を同定及び単離することができる。ファージディスプレイライブラリの生成及びスクリーニングのためのキットは市販されている。付加的に、標準的な組換えDNA技法を使用して作製することができる、ヒト部分と非ヒト部分との両方を含む、キメラ及びヒト化型のモノクローナル抗体などの組換え抗体が、本明細書において提供される。そのようなキメラ及びヒト化型モノクローナル抗体は、当該技術分野で既知の組換えDNA技法によって産生することができる。完全ヒト抗体が、ヒト患者の治療的処置のために特に望ましい。そのような抗体は、例えば、内因性免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒトの重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができる、トランスジェニックマウスを使用することで、産生することができる。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えば、標的タンパク質の全てまたは一部分を用いて、通常の様式で免疫される。この抗原に対するモノクローナル抗体は、従来ハイブリドーマ技術を使用して得ることができる。トランスジェニックマウスが保有するヒト免疫グロブリン導入遺伝子はB細胞分化中に再配列し、その後、クラススイッチ及び体細胞突然変異を受ける。したがって、そのような技法を使用して、治療上有用なIgG、IgA、及びIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概説については、Lonberg and Huszar (Int. Rev. Immunol., 13: 65-93, 1995)を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術の詳細な考察、ならびにかかる抗体を産生するためのプロトコルについては、例えば、米国特許第5,625,126号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,569,825号、米国特許第5,661,016号、及び米国特許第5,545,806号を参照されたい。選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と称される技法を使用して生成することができる。この手法では、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を使用して、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導する。(Jesper et al., Biotechnology, 12: 899-903, 1994)。モノクローナル抗体、例えば、ヒトモノクローナル抗体を産生する方法には、ファージディスプレイなどのディスプレイ技法も含まれる。

【0197】

標的タンパク質に対する抗体は、ポリペプチドを（例えば、細胞溶解物または細胞上清中で）検出して、その存在量及び発現パターンを評定するために使用することができる。この抗体は、例えば、例として、所与の治療レジメンの有効性を判定するために、臨床試験手順の一部として組織内のタンパク質レベルをモニタリングするために診断に使用することもできる。抗体を検出可能物質にカップリングすることによって、検出を容易にすることができる。検出可能物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、及び放射性材料が挙げられる。好適な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられ、好適な蛍光材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが挙げられ、発光材料の一例としては、ルミノールが挙げられ、生物発光材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ、好適な放射性材料の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。抗体は、例えば、研究目

10

20

30

40

50

的または治療目的で、標的タンパク質の活性を調節するために使用することもできる。抗体は多くの場合それらの標的を阻害するが、それらが結合するエピトープによっては、それらの標的を活性化する場合があり、すなわち、標的の内因性阻害因子に結合する抗体は、標的の活性を増強することができる。

【0198】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1つ以上の特定の生化学的活性及び/または生物学的機能を有し、そのような機能を調節する化合物が同定される。例えば、標的タンパク質は、生化学反応を触媒する酵素であってもよく、酵素の制御因子（例えば、活性化因子または阻害因子）であってもよい。酵素は、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、またはリガーゼに大まかに分類することができる。（例えば、<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>にて利用可能な Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse を参照されたい）。例示的な酵素としては、例えば、キナーゼ、ホスファターゼ、及びGTPアーゼが挙げられる。例示的な酵素制御因子としては、例えば、グアニンヌクレオチド交換因子が挙げられる。

【0199】

化合物は、本明細書に記載されている標的タンパク質によって媒介される1つ以上の酵素活性または酵素制御活性を調節するそれらの能力について試験され得る。当業者であれば、かかる酵素の調節因子を同定するために好適なアッセイを把握しているであろう。例えば、多種多様な酵素アッセイ、例えば、とりわけキナーゼ、ホスファターゼ、ATPアーゼ、GTPアーゼ、及びユビキチン化活性についてのアッセイを行うためのキットが市販されている。いくつかの実施形態では、好適なアッセイは、(i) 標的タンパク質、好適な基質、及び被験化合物を適切な条件下にてインキュベートすること、ならびに(ii) その反応の1つ以上の産物の産生を検出することを伴い、被験化合物の不在下で予想されるであろう反応産物の量と比較したときの反応産物の量の増加は、この被験化合物が酵素の活性を増強することを示し、被験化合物の不在下で予想されるであろう反応産物の量と比較したときの反応産物の量の減少は、この被験化合物が酵素の活性を阻害することを示す。検出は、様々な実施形態において定性的であっても定量的であってもよい。「適切な条件」は、反応産物が検出のための合理的な時間枠（例えば、秒単位、分単位、時間単位）において検出可能な量で出現するように、標的タンパク質が（被験化合物の不在下で）反応を効果的に触媒するであろう条件下を指す。適切な条件には、例えば、適切な温度、pH、塩濃度、1つ以上の有機もしくは無機補因子の存在、及び/またはエネルギー源などが含まれ得る。多くの酵素が、ある範囲の異なる条件、例えば、ある範囲の値の温度、pH、塩濃度などを耐容可能である場合が多いことは理解されよう。いくつかの実施形態では、酵素は多サブユニットタンパク質であり、その場合、アッセイ構成要素は、少なくとも触媒サブユニット、そして任意で、酵素の1つ以上の付加的なサブユニット、例えば、自然に触媒サブユニットと複合体を形成するそれらのサブユニットを含むことができる。任意で、基質のうち少なくとも1つが、反応物もしくは反応産物の検出を容易にするために（例えば、放射標識、比色標識、蛍光標識、発光標識、もしくは酵素標識などで標識されるか、または、比色シグナル、蛍光シグナル、発光シグナルが、反応発生に際して精製される。いくつかの実施形態では、酵素反応が、非蛍光部分を蛍光部分に変換し、その後、蛍光部分を検出することができる。いくつかの実施形態では、基質は、フルオロフォア及びダーククエンチャーを含有し、ダーククエンチャーは、フルオロフォアからエネルギーを吸収し、このエネルギーを熱として消散する。基質の切断に際し、ダーククエンチャーがフルオロフォアから分離され、その結果、フルオロフォアからのエネルギーは

10

20

30

40

50

もはや吸収されず、検出することができ、それにより反応を検出する手段が提供される。

【0200】

機能的アッセイを使用して、本明細書において特定される遺伝子またはタンパク質の発現または活性の調節因子、あるいは本明細書において特定される遺伝子またはタンパク質が関与する生物学的経路もしくはプロセスを調節するものを同定することもできる。例えば、ハイコンテックスクリーニングは、タンパク質の局在化、または本明細書において特定される遺伝子もしくはタンパク質が関与するプロセスの変化を分析するための、自動撮影、細胞選別などの使用を伴い得る。

【0201】

いくつかの実施形態では、計算に基づく薬物設計及び/または仮想スクリーニングが、本明細書において特定されるタンパク質の調節因子を同定するために使用され得る。計算に基づく薬物設計及び/または仮想スクリーニングは、本明細書において特定されるタンパク質の2次元または3次元構造に基づき得る。ある特定の実施形態では、化合物の構造は、化合物に到達可能であるタンパク質の領域(例えば、「ポケット」)に結合する能力についてスクリーニングされ得る。この領域は、既知もしくは潜在的な活性部位、または化合物に到達可能なタンパク質の任意の領域、例えば、間隙の表面上の凹面領域であってもよい。多様なドッキング及びファルマコフォアベースのアルゴリズムが当該技術分野で知られており、そのようなアルゴリズムを実装するコンピュータプログラムが利用可能である。一般的に使用されるプログラムとしては、Gold、Dock、Glide、FlexX、Fred、及びLigandFitが挙げられる(それらの最新版を含む)。例えば、Ghosh, S., et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(3): 194-2-2, 2006、McInnes C., *Current Opinion in Chemical Biology*; 11(5): 494-502, 2007を参照されたい。多数の小分子構造が利用可能であり、仮想スクリーニングに使用することができる。化合物構造のコレクションは、時として「仮想ライブラリ」と称される場合がある。例えば、ZINCは、仮想スクリーニングに使用することができる数百万の市販の化合物の構造を収容する公的に利用可能なデータベースである(<http://zinc.docking.org/>、Shoichet, J. *Chem. Inf. Model.*, 45(1): 177-82, 2005)。約250,000個の小分子構造を収容するデータベースが、National Cancer Institute(U.S.)のウェブサイト(<http://129.43.27.140/ncidb2/>)にて利用可能である。いくつかの実施形態では、例えば、最大50,000個、100,000個、250,000個、500,000個、または最大100万個、200万個、500万個、1000万個、またはそれよりも多くの、複数の小分子がスクリーニングされ得る。化合物は、点数化し、任意で、標的に結合するそれらの潜在力によって格付けすることができる。仮想スクリーニングで同定された化合物は、標的タンパク質に結合するそれらの能力及び/もしくはその活性を調節する(例えば、阻害する)それらの能力を確認するため、かつ/またはApoE媒介性毒性に対するそれらの作用を評定するために、細胞不含もしくは細胞ベースのアッセイにおいて、または動物モデルにおいて試験することができる。

【0202】

標的タンパク質を調節する被験化合物の同定によって、その後被験化合物「ヒット」または「リード」を修飾して、「ヒット」または「リード」が、例えば、ApoE媒介性毒性を予防もしくは抑制し、かつ/またはアミロイド 媒介性毒性を予防もしくは抑制する能力を最適化することが可能となる。そのような最適化は、本開示の一態様であり、ApoE発現酵母細胞を使用して同定された被験化合物について上述のように行われ得る。

【0203】

計算的手法を使用して、本明細書に記載されている物理的スクリーニングまたは仮想スクリーニングのいずれかにおいて同定された化合物の1つ以上の物理化学特性、薬物動態特性、及び/または薬力特性を予測することができる。例えば、吸収、分配、代謝、及び

10

20

30

40

50

排泄 (ADME) パラメータを予測することができる。そのような情報は、例えば、さらなる試験または修飾のためのヒットを選択するために使用することができる。例えば、「薬様」分子に典型的な特徴を有する小分子を選択することができ、かつ/または1つ以上の望まれない特徴を有する小分子を回避することができる。

【0204】

いくつかの実施形態では、本明細書においてApoE媒介性毒性の酵母抑制因子または増強因子の相同体として特定されるヒトタンパク質は、非ヒト細胞、例えば、酵母細胞に導入される。いくつかの実施形態では、かかる細胞は、ヒトタンパク質の活性を調節する化合物を同定するスクリーニングを行うために使用される。例えば、ApoE媒介性毒性の抑制因子もしくは増強因子の作用と反作用するか、またはそれを増補する化合物が同定され得る。いくつかの実施形態では、該非ヒト細胞における対応物である相同タンパク質をコードする遺伝子は、無効化されるか、または欠失していてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、酵母細胞において、本明細書においてApoE媒介性毒性抑制因子または増強因子として特定される酵母遺伝子が欠失しており、対応物のヒト遺伝子が当該酵母細胞において発現される。例えば、対応物のヒト遺伝子は、任意に誘導性プロモーターの制御下で酵母ゲノムに組み込まれていてもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、毒性誘導量のApoEを発現する。

10

【0205】

いくつかの実施形態では、化合物のスクリーニング及び/またはさらなる特性化は、脊椎動物細胞もしくは組織、例えば、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、もしくはヒト）細胞もしくは組織、または非ヒト動物を使用して行われる。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載されている脊椎動物細胞のいずれであってもよい。いくつかの実施形態では、脊椎動物細胞、例えば、哺乳動物細胞は、神経系細胞、例えば、神経細胞またはグリア細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、前脳、中脳、皮質、海馬、または線条体などの脳の領域からのものである。いくつかの実施形態では、神経細胞は、皮質神経細胞を含む。いくつかの実施形態では、神経細胞は、海馬神経細胞を含む。いくつかの実施形態では、神経細胞は、錐体神経細胞を含む。いくつかの実施形態では、神経細胞は、コリン作動性神経細胞を含む。いくつかの実施形態では、神経細胞は、グルタミン酸作動性神経細胞を含む。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、またはその両方を含む。いくつかの実施形態では、神経細胞及びグリア細胞を含む混合培養物が使用される。いくつかの実施形態では、組織は、脳組織、例えば、脳切片、例えば、非ヒト動物からの海馬脳切片を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ApoE媒介性毒性に関連する少なくとも1つの表現型を示し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、ApoEに関連する少なくとも1つの表現型を示し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、ApoEを含むポリペプチドをコードする異種遺伝子、及び/またはApoE媒介性毒性の修飾遺伝子である酵母遺伝子によってコードされる酵母タンパク質の哺乳動物相同体をコードする異種遺伝子を含む。

20

30

【0206】

バイオマーカー及び予測法；キット

いくつかの態様では、ApoE媒介性疾患、例えば、ADのバイオマーカーを同定する方法が、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、ある方法は、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上において特定される酵母遺伝子の相同体であるヒト遺伝子、例えば、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上において特定されるヒト遺伝子の配列における多型性もしくは突然変異、または本明細書において特定されるヒト遺伝子の発現もしくはそのコードされるタンパク質の活性の変化を同定する工程、ならびに(b)当該多型性、突然変異、または変化が、ApoE媒介性疾患、例えば、ADの発症と相関するかどうかを判定する工程を含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法によって同定されるヒトApoEタンパク質の結合パートナーは、ApoE媒介性疾患のバイオマーカーであり得る。かかる方法は、例えば、加齢、認知、ならびにADまたは別のApoE媒介性疾患の研究、例えば、疫学的研究か

40

50

らの利用可能な遺伝子同定、臨床、及び病理データを用いてもよい。当該技術分野で既知のデータ及び試料収集ならびに方法（例えば、統計的方法）を使用して、相関性を特定及び/または確認することができる。いくつかの実施形態では、全ゲノム関連研究が行われる。いくつかの実施形態では、症例対照研究が行われる。いくつかの実施形態では、本明細書において特定される遺伝子内にある、dbSNPデータベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>）において利用可能な1つ以上のSNPまたは他のヌクレオチド変異が、ApoE媒介性疾患との関連について評価される。

【0207】

相関性が確認されたら、それは、例えば、本発明に記載されているように同定された化合物を使用する療法、またはADなどのApoE関連疾患を治療するために用いられることが当該技術分野で知られている療法から利益を受け得る対象の同定において使用され得る。例えば、そのような対象は、早期治療（症状の発症前）から利益を受け得、かつ/あるいは、遺伝子によってコードされる遺伝子産物（例えば、タンパク質）の発現または活性を調節する化合物を用いる治療、またはいくつかの実施形態では遺伝子産物自体を用いる治療から利益を受け得る。

【0208】

いくつかの態様では、ApoE関連疾患、例えば、ADを発症するリスクが上昇している対象を同定するための方法が、本発明に記載されている。本発明のうちの特定のものは、ヒト対象が、参照配列と比較して、表1A、1B、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上において特定される酵母遺伝子のヒト相同体（例えば、表2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上において特定されるヒト相同体）ならびに/または本明細書において特定される遺伝子によってコードされるタンパク質の配列、発現、もしくは活性の変化を示すかどうかを判定する工程を含み、この遺伝子またはこの遺伝子によってコードされるタンパク質の配列、発現、もしくは活性の変化は、対象が、ApoE関連疾患、例えば、ADを発症するかまたは有するリスクが上昇した状態にあることを示す。いくつかの実施形態では、この遺伝子は、ApoE関連疾患、または特定のApoE媒介性疾患、例えばADの危険因子としてこれまでに同定されていない、任意の遺伝子であってもよい。

【0209】

いくつかの実施形態では、この遺伝子は、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているヒト遺伝子から選択される。いくつかの実施形態では、この遺伝子（またはそれらのコードされるタンパク質）のうち少なくとも2つが評定される。いくつかの実施形態では、対象における、ApoE媒介性毒性の増強因子として同定されている酵母遺伝子の相同体であるヒト遺伝子の上昇した発現、及び/または、かかるヒト遺伝子によってコードされるタンパク質の上昇した活性は、その対象が、ApoE関連疾患、例えば、ADを発症するかまたは有する可能性が上昇した状態にあることを示す。いくつかの実施形態では、対象における、ApoE媒介性毒性の抑制因子として同定されている酵母遺伝子の相同体であるヒト遺伝子の低下した発現、及び/または、かかる遺伝子によってコードされるタンパク質の低下した活性は、その対象が、ApoE関連疾患、例えば、ADを発症するかまたは有する可能性が上昇した状態にあることを示す。参照配列または参照レベルは、例えば、対照群に典型的に見出される発現または活性の配列またはレベルであり得る。例えば、参照レベルは、対照群内での平均レベルまたはそのレベル周辺の範囲（例えば、対照群の少なくとも80%、90%、または95%が含まれる範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、対照群は、ApoE関連疾患を患っておらず、認知障害に関連する徴候もしくは症状またはApoE関連疾患を発症する著しい可能性を示し得る他の特徴を有しない個体である。対照群は、年齢、性別、全身的健康状態（例えば、循環器疾患の不在）などの多様な特徴について一致していてもよい。歴史的対照を使用することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、疾患の進行及び/または療法への応答をモニタリングするために使用することができる。いくつかの実施形態では、結果、例えば、参照レベルと比較したときの発現または活性のレベルの差異は、統

10

20

30

40

50

計的に有意である。例えば、結果は、様々な実施形態において0.05未満または0.01未満のP値を有し得る。

【0210】

遺伝子発現の変化は、例えば、遺伝子のコード領域もしくは非コード領域（例えば、制御領域）における突然変異または多型性、あるいはコピー数の変化（増加もしくは減少）またはエピジェネティック変化（例えば、変更されたDNAメチル化または変更されたヒストン修飾（例えば、変更されたアセチル化またはメチル化）によって引き起こされ得る。突然変異は、例えば、挿入、欠失、または置換であり得る。多型性は、単一のヌクレオチド多型性であってもよい。タンパク質の活性の変化は、遺伝子のコード領域における突然変異によって引き起こされ得、この突然変異が、コードされたタンパク質の配列を変更する。本発明は、対象から（例えば、リンパ球から）得られたDNA、mRNA、またはタンパク質を含む試料を分析して、本明細書において特定される遺伝子またはそのコードされるタンパク質の配列（例えば、1個以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の同一性を判定するため）、発現レベル、及び/または活性を評定することと、任意で、該配列、発現、及び/または活性レベルを、参照配列または発現または活性の参照レベルと比較することとを包含する。本明細書に言及される方法を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の方法を使用して、遺伝子配列、発現レベル、及び/またはタンパク質の活性を評定することができる。例えば、遺伝子同定は、DNAマイクロアレイ（例えば、Affymetrix、Illumina、Agilentから入手可能）、リアルタイムPCR、及び/または配列決定（例えば、Illumina/Solexaの技術またはSOLiD（商標）システムなどの高スループット配列決定）を使用して行うことができる。エピジェネティック変化は、例えば、亜硫酸水素塩配列決定、クロマチン免疫沈降オンチップ（ChIP-on-chip）及び/またはクロマチン免疫沈降配列決定（ChIP-Seq）を使用して検出することができる。タンパク質レベルの変化及び/または修飾は、例えば、イムノアッセイまたは質量分析を使用して検出することができる。いくつかの実施形態では、タンパク質の活性の変化は、タンパク質の翻訳後修飾の変化、例えば、リン酸化、グリコシル化、脂質化、アルキル化、ユビキチン化、SUMO化などの変化によって引き起こされ得る。したがって、いくつかの実施形態は、1つ以上のかかる修飾または変化を検出することを含む。

10

20

30

【0211】

いくつかの実施形態では、遺伝子の低下した発現及び/または本明細書において特定されるタンパク質（例えば、ApoE媒介性毒性の抑制因子である酵母遺伝子のヒト相同体）の低下した発現を示す対象は、タンパク質の発現または活性を上昇させる化合物での治療の候補として治療または選択される。いくつかの実施形態では、遺伝子の上昇した発現及び/または本明細書において特定されるタンパク質（例えば、ApoE媒介性毒性の増強因子である酵母遺伝子のヒト相同体）の上昇した発現を示す対象は、タンパク質の発現または活性を低下させる化合物での治療の候補として治療または選択される。

【0212】

さらに、本明細書において特定される遺伝子及び/または本明細書において特定される遺伝子によってコードされるタンパク質の配列、発現、もしくは活性を検出すること、ならびに/あるいは前述のいずれかの変化を検出することに有用である試薬を含むキットが提供される。かかる試薬は、例えば、遺伝子配列もしくは発現またはそれらの変化を検出するための核酸プローブまたはプライマー（任意で、チップまたはビーズなどの支持体に取り付けられる）、タンパク質のレベル、サイズ、修飾、またはそれらの変化を検出するための抗体を含むことができる。本キットは、対照または参照試料、アッセイを行うため及び/または結果を解釈するための指示書などを含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、ApoE媒介性疾患のリスクがあるかもしくはそれを患う対象を同定すること、及び/あるいはApoE媒介性疾患の危険因子である突然変異、多型性、もしくはエピジェネティック変化を潜在的に保有するものと同定されている選択された一式の遺伝子及び/またはタンパク質を評定することのために、特別に適合される。例えば、本キ

40

50

ットが複数の遺伝子またはタンパク質の評定を提供する場合、ApoE 媒介性疾患の危険因子として関係するもしくは確認されている遺伝子またはタンパク質の割合は、偶然予想されるであろう割合より大きい。いくつかの実施形態では、評定される遺伝子もしくはタンパク質の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、ApoE 媒介性疾患の危険因子として関係するか確認される。いくつかの実施形態では、キット構成要素は、例えば、本キットが、ApoE 媒介性疾患のリスクがあるかもしくはそれを患う対象を同定または評定するために有用であることを示す情報または指示書で標識されているか、あるいはそれと共に包装されている、1つ以上の容器内に封入される。

【0213】

本明細書において特定されるヒト遺伝子またはタンパク質の配列、発現、もしくは活性の変化の検出は、対象がApoE 関連疾患、例えば、ADを発症するか、またはそれを有する可能性を評定するために、付加的な情報と一緒に使用され得る。そのような情報は、遺伝情報（例えば、リスク上昇に関連する特定の対立遺伝子またはアイソフォームの存在）、撮影情報、生化学的情報（例えば、CSF中のアミロイド またはタウレベルの測定）、神経心理学的情報、及び/または臨床情報であってもよい。

【0214】

哺乳動物モデル系

いくつかの態様では、ApoE 媒介性毒性を調節する酵母遺伝子の相同体である哺乳動物遺伝子の発現または活性が調節される、例えば、その遺伝子またはその遺伝子によってコードされる遺伝子産物が過剰発現または阻害もしくは無効化される、哺乳動物細胞及び非ヒト哺乳動物が、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、ヒト遺伝子である。ヒト遺伝子は、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されている酵母遺伝子のいずれかの相同体であってもよい。例えば、ヒト遺伝子は、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているヒト遺伝子のいずれかであってもよい。特定の実施形態では、ヒト遺伝子は、表3に列記されている酵母遺伝子のいずれかの相同体であってもよい。いくつかの実施形態では、ヒト遺伝子は、既知のAD危険因子である。いくつかの実施形態では、ヒト遺伝子は、既知のAD危険因子ではない。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、表1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、及び3のいずれか1つ以上に列記されている酵母遺伝子のいずれかの相同体である非ヒト哺乳動物遺伝子である。

【0215】

いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、表1A、1B、または2Aのいずれか1つ以上に列記されているApoE 2 媒介性毒性の抑制因子である酵母遺伝子の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、表1A、1B、及び2Aのいずれか1つ以上に列記されているApoE 2 媒介性毒性の増強因子である酵母遺伝子の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、表1A、1B、及び2Bのいずれか1つ以上に列記されているApoE 3 媒介性毒性の抑制因子である酵母遺伝子の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、表1A、1B、及び2Bのいずれか1つ以上に列記されているApoE 3 媒介性毒性の増強因子である酵母遺伝子の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、表1A、1B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているApoE 4 媒介性毒性の抑制因子である酵母遺伝子の相同体である。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子は、表1A、1B、及び2Cのいずれか1つ以上に列記されているApoE 4 媒介性毒性の増強因子である酵母遺伝子の相同体である。ヒトまたは非ヒト哺乳動物細胞もしくは動物は、様々な実施形態において任意のAPOE 遺伝子型を有し得る。それらは、任意のAPOE 対立遺伝子に対してホモ接合性であってもヘテロ接合性であってもよい。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子、例えば、ヒト遺伝子は、ApoE 2 媒介性毒性の抑制因子または増強因子である酵母遺伝子の相同体であり、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）は、ApoE 2 を発現する。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子、例えば、ヒト遺伝子は、A p o E 3 媒介性毒性の抑制因子または増強因子である酵母遺伝子の相同体であり、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）は、A p o E 3 を発現する。いくつかの実施形態では、哺乳動物遺伝子、例えば、ヒト遺伝子は、A p o E 2 媒介性毒性の抑制因子または増強因子である酵母遺伝子の相同体であり、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）は、A p o E 4 を発現する。

【0216】

いくつかの実施形態では、遺伝子を細胞もしくは生物内で過剰発現することは、その遺伝子によってコードされるタンパク質を細胞もしくは生物内で発現することを含み、このタンパク質は、細胞もしくは生物に、または細胞もしくは生物の祖先に導入されている核酸（例えば、発現構築物）によってコードされる。いくつかの実施形態では、遺伝子を阻害または無効化することは、細胞もしくは生物のゲノム内の遺伝子を阻害または無効化すること、あるいは細胞もしくは生物内の遺伝子の発現産物、例えば、その遺伝子によってコードされる m R N A またはタンパク質を阻害または無効化することを含む。

10

【0217】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、神経前駆細胞、神経細胞、グリア前駆細胞、またはグリア細胞である。いくつかの実施形態では、神経細胞は、皮質神経細胞または海馬神経細胞である。いくつかの実施形態では、神経細胞は、グルタミン酸作動性神経細胞である。いくつかの実施形態では、神経細胞は、コリン作動性神経細胞である。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、アストロサイトである。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、オリゴデンドロサイトである。いくつかの実施形態では、2つ以上のかかる細胞型を含む組成物、例えば、細胞培養物が提供され、この細胞は、神経細胞及びグリア細胞を含む。

20

【0218】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、多能性幹細胞、例えば、誘導多能性幹（i P S）細胞または胚性幹（E S）細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、多能性幹細胞（i P S または E S 細胞）、神経前駆細胞、またはグリア前駆細胞からの分化によってインビトロで得られる神経細胞またはグリア細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、異なる細胞型の非多能性体細胞、例えば、非神経性、非グリア性系統の細胞からの分化転換によって得られる神経細胞またはグリア細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、単離された細胞、例えば、単離されたヒト細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト A p o E タンパク質を発現する、非ヒト哺乳動物細胞、例えば、齧歯動物細胞（例えば、マウス細胞もしくはラット細胞）または非ヒト霊長類（例えば、サル）細胞である。いくつかの実施形態では、A p o E 媒介性毒性を調節する酵母遺伝子の相同体として同定されたヒト遺伝子は、その細胞の少なくとも一部においてヒト A p o E を発現する、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、マウスにおいて発現される。

30

【0219】

いくつかの実施形態では、A p o E 媒介性毒性を調節する酵母遺伝子の相同体であるヒト遺伝子は、ヒト A p o E を発現する非ヒト哺乳動物細胞において発現される。いくつかの実施形態では、A p o E 媒介性毒性を調節する酵母遺伝子の非ヒト哺乳動物相同体は、ヒト A p o E を発現する非ヒト哺乳動物細胞において発現される。例えば、A p o E 媒介性毒性を調節する酵母遺伝子のマウス相同体は、ヒト A p o E を発現するマウス細胞において発現されてもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、内因性 A p o E とヒト A p o E との両方を発現する。いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物細胞、例えば、マウス細胞の内因性 A p o E 遺伝子は、ヒト A p o E の残基 1 1 2、1 5 8、またはその両方に対応する位置におけるアルギニンをコードするか、またはそれをコードするように遺伝子改変される。いくつかの実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物は、その細胞の少なくとも一部、例えば、その神経細胞及び/またはグリア細胞の少なくとも一部において、内因性 A p o E とヒト A p o E との両方を発現する。いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物、例えば、マウスの内因性 A p o E 遺伝子の対立遺伝子のいずれかまたは両方が

40

50

、ヒト ApoE の残基 112、158、またはその両方に対応する位置におけるアルギニンを含有するか、またはそれを含有するように遺伝子改変される。

【0220】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、その修飾が細胞の子孫に受け継がれるように、多能性幹細胞、神経幹細胞、神経もしくはグリア前駆細胞、または他の分裂細胞において遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、修飾を保有する成熟した神経細胞及び/またはグリア細胞が、その細胞から得られる。哺乳動物細胞において遺伝子改変をもたらすための使用法は当該技術分野で既知であり、任意のかかる方法を適用して、遺伝子改変された哺乳動物細胞を作り出すことができる。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、ゲノムに対する遺伝性修飾、例えば、ゲノムへの外因性 DNA の挿入、天然 DNA の 1 個以上のヌクレオチドの欠失もしくは置換、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ApoE 媒介性毒性の酵母抑制因子または増強因子のヒト相同体によってコードされるタンパク質をコードする配列に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物が、哺乳動物細胞に導入される。発現構築物は、ベクター（例えば、ウイルスベクターまたはプラスミド）内で細胞に送達されてもよい。いくつかの実施形態では、shRNA、siRNA、アンチセンス、またはマイクロRNA 前駆体分子をコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーター（例えば、Pol II または Pol III プロモーター）を含む発現構築物が細胞に導入され、この shRNA、siRNA、アンチセンス、またはマイクロRNA は、RNA 干渉（RNAi）によって ApoE 媒介性毒性の酵母抑制因子または増強因子のヒト相同体の発現を阻害する。いくつかの実施形態では、shRNA、siRNA、アンチセンス、もしくはマイクロRNA 分子によって標的化される mRNA またはタンパク質の発現は、少なくとも 10%、25%、50%、70%、80%、90%、またはそれ以上低下し得る。

【0221】

いくつかの実施形態では、表 1C、1D、2A、2B、及び 2C のいずれか 1 つ以上に列記されているヒト遺伝子（または別の哺乳動物種において見出されるその対応物）によってコードされるタンパク質をコードする、外因性核酸、例えば、外因性 DNA が、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）に導入される。例えば、プロモーターに機能的に連結された、表 1C、1D、2A、2B、及び 2C のいずれか 1 つ以上に列記されているヒト遺伝子（または別の哺乳動物種において見出されるその対応物）によってコードされるタンパク質をコードする核酸を含む発現構築物が、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）に導入されてもよい。いくつかの実施形態では、表 1C、1D、2A、2B、及び 2C のいずれか 1 つ以上に列記されている遺伝子は、例えば、プロモーター、他の制御配列、またはコード配列の一部を欠失させるかまたは改変することによって、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）内で機能障害性にされる。いくつかの実施形態では、表 1C、1D、2A、2B、及び 2C のいずれか 1 つ以上において特定されるヒト遺伝子（または別の哺乳動物種において見出されるその対応物）は、例えば、それを制御可能プロモーターの制御下に置くことによって、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）において条件付きにされる。いくつかの実施形態では、遺伝子は、遺伝子の少なくとも一部分をリコンビナーゼの認識部位間に置くことによって条件付きにされる。そのような部位間に位置する DNA は、リコンビナーゼを細胞に導入すること、またはその発現を誘導することによって除去することができる。このような系を使用して、例えば、欠失を作ることができ、この欠失は、遺伝子の発現を低減させるか、または変更された（例えば、低減した）機能を有する遺伝子産物をもたらし得、あるいは、コード配列をプロモーターの制御下に置き、それによって発現を誘導し得る。好適な系は、当該技術分野で既知である。例えば、Cre/Lox リコンビナーゼ系が使用され得る。遺伝子は、Cre 媒介性組換えによって隣接した（フロックス化（floxed））遺伝子セグメントの切除を可能にする 2 つの LoxP 部位の挿入によって修飾され得る。いくつかの実施形態では、Cre の発現が制御可能プロモーターの制御下にあってもよく、または Cre 活性が小分子によって制御されてもよい。例えば、Cre は、その活性が受容体リガンドによって制御されるように、ステロイドホルモンリガ

ンド結合ドメインと融合していてもよい。Cre-ER(T)またはCre-ER(T2)リコンビナーゼを使用してもよく、これらは、ヒトエストロゲン受容体(ER)の変異リガンド結合ドメインとCreリコンビナーゼとの融合タンパク質を含み、その活性は、例えば、4-ヒドロキシ-タモキシフェンによって誘導することができる。誘導性遺伝子変異、例えば、ノックアウトを生成する、当該技術分野で既知の他の方法を使用してもよい。例えば、異なるリコンビナーゼ(例えば、DreまたはFlp/Frt系)を使用してもよく、かつ/またはリコンビナーゼ活性を制御可能にする他の手段を使用してもよい。

【0222】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞)のゲノムへの外因性DNAの組み込みは、「セーフハーバー(safe harbor)」遺伝子座において起こる。「セーフハーバー」遺伝子座は、宿主細胞に有害作用を及ぼすことなく新しく組み込まれたDNAの予測可能な発現に順応することができる、哺乳類ゲノム、例えば、ヒトゲノムの遺伝子内または遺伝子外の領域である。いくつかの実施形態では、セーフハーバー遺伝子座は、AAVS1(染色体19上の野生型AAVの天然の組み込み部位)、ROSA26、またはCCR5遺伝子座である。これらの遺伝子座の位置は、当該技術分野において周知である。AAVS1部位は、染色体19内(19q13.42位)にあり、AAVS1遺伝子座における組み込みは、遺伝子ホスファターゼ1制御性サブユニット12C(PPP1R12C)を破壊し得る。ヒトROSA26遺伝子座は、染色体3内(3p25.3位)にある。ヒトCCR5遺伝子は、染色体3上(3p21.31位)に位置する。

【0223】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、1個以上の選択されたDNA配列を標的化するヌクレアーゼを使用して、例えば、ゲノム内の目的の規定位置においてDNAを挿入する、置き換える、または除去するために、遺伝子改変されてもよい。例えば、目的の規定位置において、標的化可能なヌクレアーゼを使用して、DNAを挿入するか、置き換えるか、またはゲノムから除去する遺伝子操作は、「ゲノム編集」と称される場合がある。いくつかの実施形態では、ゲノム編集を使用して、例えば、表1C、1D、2A、2B、及び2Cのいずれか1つ以上において特定されるヒト遺伝子における改変を操作し、かつ/または哺乳動物細胞における特定のAPOE対立遺伝子を生成してもよい。いくつかの実施形態では、目的の特定の遺伝的変異を除いて同質遺伝子的である2個以上の細胞または細胞株。例えば、APOE遺伝子型に関する以外は同質遺伝子的である細胞または細胞株が生成されてもよい。ゲノム内の特定の位置を標的化する核酸を使用して、内因性ゲノム遺伝子座内の選択された部位における精確な切断を誘導してもよい。切断の位置でゲノムに挿入される配列を含む核酸(例えば、プラスミドまたは線状DNA)も、ヌクレアーゼを含有する細胞に導入される。いくつかの実施形態では、2つ以上の切断が作られ、目的の核酸が切断位置間に挿入され、任意で、内因性遺伝子が、突然変異、遺伝的変異、または遺伝子修正を組み込むバージョンで少なくとも部分的に置き換えられる。いくつかの実施形態では、核酸は、相同組換え修復(homology-directed repair)が刺激されるように、切断部位に隣接する領域と相同性の領域を含む。いくつかの実施形態では、細胞のゲノム内に存在する配列と比較して、標的部位の片側と相同であり、所望の改変を含有する配列を含む核酸が、ポリペプチドに加えて導入され、例えば、相同組換え修復がもたらされる。したがって、細胞のゲノム内の配列を変更することができる、ある特定の実施形態では、ドナー核酸内に存在する配列に変換することができる。「挿入する」、「置き換える」などの用語は、核酸配列の挿入、または1個のヌクレオチド配列を別のもので置き換えること(すなわち、情報の意味での配列の挿入または置き換え)を表し、導入される核酸のゲノムへの物理的または化学的組み込みを必ずしも必要とせず、例えば、修復は、ドナー配列の少なくとも一部分のコピーを生成することを伴い得ることは理解されよう。好適なヌクレアーゼの例としては、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TALEN、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼホーミングエンドヌクレアー

10

20

30

40

50

ぜ、及び、例えば、I I型細菌性CRISPR/Cas系から得られる、CRISPR（ク
 ラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）関連（Cas）ヌク
 レアーゼなどのRNA指向性ヌクレーゼ（例えば、Cas9）が挙げられる。ZFN
 及び/またはTALENの設計、生成、ならびに使用の方法は、例えば、WO2011097036、
 Urnov, F.D., et al., Nature Reviews Genetics (2010), 11: 636-646、Miller J.C., et al., Nat Bi
 otechnol. (2011) 29(2): 143-8、Cermak, T., et al. Nucleic Acids Research (2011) 39(12): e8
 2、Sanjana, N.E. et al. Nat Protoc 7, 171-192 (2012)、及び前述のいずれかにおける参照文献に記載されている。ヒト多能性細胞
 の遺伝子操作を行うためのZFNの使用は、米国特許公開第20110027235号及
 び/または米国特許公開第20120192301号（これはTALENの使用も記載す
 る）に記載されている。ゲノム操作のためのZFN、TALEN、及びCRISPR/C
 asベースの方法は、Gaj, T., et al., Trends Biotechnol. 2013; 31(7): 397-405に概説されている。ゲノム操作におけるCR
 ISPR/Cas系の使用は、例えば、Cong L, et al. Multiplex
 genome engineering using CRISPR/Cas sys
 tems. Science. 2013、Wang, H. et al. One-step
 generation of mice carrying mutations in
 multiple genes by CRISPR/Cas-mediated g
 enome engineering. Cell 153, 910-918 (2013)
 、Ran, F.A. et al. Cell 154, 1380-1389 (2013)、
 及び米国特許公開第20140170753号に記載されている。

【0224】

トランスジェニック非ヒト動物、例えば、マウス及びラットを生成する方法は、当該技
 術分野で既知であり、任意のかかる方法を適用して、トランスジェニック非ヒト動物を生成
 することができる。本明細書で使用される場合、「トランスジェニック動物」という用
 語は、その細胞の少なくとも一部のゲノムDNAの配列に対する修飾を有する動物を指し
 、この修飾は、人の手によって生成されたものである。この用語には、元々のトランスジ
 ェニック動物ならびに修飾を受け継いだその子孫が含まれることは理解されよう。この修
 飾は、例えば、非天然DNAの挿入、天然DNAの欠失、1個以上のヌクレオチドの置換
 、またはそれらの組み合わせを含み得る。トランスジェニック動物には、その動物に天然
 でない核酸を発現するように改変されている動物、ならびに内因性遺伝子が少なくとも部
 分的に欠失しているか、ないしは非機能性にされている「ノックアウト」動物、及び選択
 された内因性遺伝子が標的化様式で修飾されている「ノックイン」動物が含まれる。その
 動物に天然でない核酸を発現するように改変されているトランスジェニック動物には、外
 因性DNAがゲノムにランダムに挿入されている動物、外因性DNAがセーフハーバー遺
 伝子座などの規定位置で挿入されている動物、及び目的の内因性遺伝子を変更されている
 動物が含まれる。イントロン配列及び/またはポリアデニル化シグナルがまた、例えば、
 導入遺伝子の発現効率を上昇させるために、導入遺伝子内に含まれ得ることは理解されよ
 う。トランスジェニック創始動物は、そのゲノム内の導入遺伝子の存在及び/あるいは動
 物の組織もしくは細胞内の導入遺伝子によってコードされるmRNAまたはタンパク質の
 発現に基づいて同定され得る。トランスジェニック創始動物は、次に、導入遺伝子を担持
 するさらなる動物を繁殖させるために使用することができる。特定の導入遺伝子を担持す
 るトランスジェニック動物は、他の導入遺伝子を担持する他のトランスジェニック動物と
 繁殖させて、複数の遺伝子改変を有する動物を生成することができる。

【0225】

哺乳動物（例えば、ヒト）の多能性細胞（例えば、iPS細胞、ES細胞）、神経前駆
 細胞、神経細胞、グリア前駆細胞、及びグリア細胞を生成または単離するための使用法は
 当該技術分野で既知であり、任意のかかる方法を使用して、iPS細胞、ES細胞、神経

前駆細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、及び/もしくはグリア細胞を生成または単離することができる。多能性細胞は、3つの胚葉：内胚葉、中胚葉、及び外胚葉の細胞を生じさせることができる未分化細胞であり、典型的に、長期または不定の期間にわたって自己再生する能力を有する。概して、多能性細胞は、OCT4 (POU5F1としても知られる)、SOX2、及び/またはNANOGなどの、少なくとも1つの支配的な多能性転写因子、例えば、これらの因子の3つ全てに対して陽性である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、胚性幹細胞(ES細胞)である。ES細胞は、初期胚、例えば、胚盤胞から、または初期胚から単離された卵割球から得られる、多能性幹細胞である。本明細書で使用される場合、「初期胚」という用語は、第1の細胞分裂から胚盤胞期、例えば、4細胞胚、8細胞胚、桑実胚、または胚盤胞までの(及びこれらを含む)着床前胚を包含する。ES細胞は、典型的には、インビトロ受精を使用して作り出された初期胚から、またはそのような胚から単離された卵割球から、インビトロで得られる。当該技術分野で既知の多様な方法のいずれを使用して、ES細胞を得、同定し、かつ/または特性化してもよい。例えば、Turksen, K. (ed.) Human Embryonic Stem Cell Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 331 Humana Press, Inc. Totowa, NH (2006年)、Turksen, K. (ed.), Human Embryonic Stem Cell Handbook, Methods in Molecular Biology, Vol. 873 Humana Press (Springerのブランド) (2012年) (例えば、ヒトES細胞を得る方法について具体的には第1~6章)を参照されたい。また、米国特許第5,843,780号、同第6,200,806号、同第7,029,913号、米国特許公開第20090186407号、PCT/US2011/000850 (WO/2011/142832)も参照されたい。

10

20

30

40

50

【0226】

いくつかの実施形態では、多能性細胞は、誘導多能性幹細胞である。本明細書で使用される場合、誘導多能性幹(iPS)細胞は、体細胞を多能性状態にリプログラミングすることによって体細胞から得られる細胞である。iPS細胞は、細胞形態、コロニー形態、長期自己再生、多能性関連マーカーの発現、同様の全ゲノム発現プロファイル、免疫低下マウスにおける奇形腫を形成する能力、及び適切な条件下においてインビトロで複数の細胞系統の細胞を生じさせる能力を含む、ES細胞のある特定の主要な特徴を有する。「iPS細胞」という用語には、最初に得られた多能性細胞、及び多能性幹細胞特性を保持するその子孫が含まれることは理解されよう。「リプログラミング」は、本明細書で使用される場合、細胞(例えば、その細胞型)の分化状態もしくは同一性、またはそれが起こるプロセスを変更することを指す。概して、第1の細胞のリプログラミングは、第1の細胞または対応する細胞がインビボで通常は従うであろう分化プログラムから生じるであろうものとは明確に異なる分化状態もしくは同一性を有する第2の細胞を生成し、第1の細胞または対応する細胞がインビボで生じさせるであろうものとは明確に異なる1つ以上の型の細胞をもたらす。「対応する細胞」は、同じ型の細胞、または当業者が同じもしくは実質的に同じ細胞型の細胞であると合理的に見なすような十分に類似した特徴を有する細胞である。細胞型は、「神経細胞」もしくは「グリア細胞」などの細胞の分類、またはより広い分類におけるサブタイプを指す場合がある。サブタイプは、特徴的な特徴、特徴的な細胞マーカー(例えば、細胞によって産生されるか、または細胞を刺激する神経伝達物質)、そのサブタイプの細胞が見出され得る体内の特徴的な位置、機能的特性などに基づいて定義されてもよい。

【0227】

いくつかの実施形態では、リプログラミングは、体細胞から多能性細胞を生成する。いくつかの実施形態では、体細胞は、成熟分化細胞である。いくつかの実施形態では、リプログラミングは、細胞を、対応する細胞が成長してなる細胞、または通常の下においてインビボで生じさせる細胞とは異なる細胞系統のものに変更する。いくつかの実施形態では、リプログラミングは、第2の細胞系統または第1の細胞型とは異なる第1の細胞系

統または第 1 の細胞型の体細胞から、第 2 の細胞系統または第 2 の細胞型の体細胞を生成する。いくつかの実施形態では、この形質転換は、検出可能な多能性細胞を中間体として生成することなく起こり得、その場合、それは「分化転換」と称される場合がある。特定の細胞型、細胞系統、または細胞状態への細胞のリプログラミングは、1 つ以上の細胞周期の過程にわたって起こり得る。例えば、多能性幹細胞を体細胞から生成するため、または第 1 の細胞型の分化細胞を異なる細胞型の分化細胞から生成するためには、複数回の細胞分裂を要する場合がある。

【 0 2 2 8 】

概して、リプログラミングは、少なくとも 1 個の体細胞を、1 つ以上のリプログラミング剤と、細胞がリプログラミングされるのに好適な条件下にて、かつ好適な時間にわたって接触させる工程を含む方法によって、行われ得る。いくつかの実施形態では、リプログラミングは、リプログラミング因子もしくはリプログラミング因子をコードする核酸を細胞に導入する工程、または外因性核酸によってコードされるリプログラミング因子の細胞における発現を誘導する工程を含む方法によって行われる。「リプログラミング因子」という用語は、細胞のリプログラミングを引き起こすことまたはそれに寄与することができるタンパク質を包含する。有用なリプログラミング因子の多くは、生成される型もしくは状態の哺乳動物細胞によって自然に発現されるか、またはその中に存在する、転写因子である。これらのタンパク質は、遺伝子発現に影響を及ぼすことによって、細胞の同一性または状態を誘導または維持することに通常は寄与し得る。「リプログラミング剤」という用語には、リプログラミング因子、ならびに (i) リプログラミング法においてリプログラミング因子の代わりとなること、(i i) さもなければリプログラミングを阻害し得る内因性 RNA もしくはタンパク質の発現を阻害すること、及び / または (i i i) リプログラミング効率もしくは速度を、リプログラミング剤の不在下で達成されるであろう効率もしくは速度と比較して検出可能に上昇させることができる薬剤も包含される。いくつかの実施形態では、リプログラミング剤は、内因性リプログラミング因子の発現または活性化をもたらすシグナル伝達経路の刺激、リプログラミングの内因性阻害因子の発現または活性化をもたらすシグナル伝達経路の阻害、あるいは DNA もしくはヒストンアセチラーゼ、デアセチラーゼ、メチラーゼ、またはデメチラーゼなどのクロマチン構造を修飾する酵素の活性化または阻害を行い得る。いくつかの実施形態では、リプログラミングは、細胞に 1 つ以上の操作を行うこと、例えば、特定のタンパク質もしくは RNA をコードする核酸 (例えば、ベクター) を細胞に導入すること、及び / あるいは、細胞に進入するかまたは細胞表面受容体に作用してリプログラミングを誘導し、かつ / またはその効率もしくは速度を上昇させ得る、特定の化合物を含有する培地中で、それらを培養することなどを含む。使用される具体的な操作及び / またはプロトコルは、例えば、所望の細胞型または状態、リプログラミングされる細胞の型または状態などに応じて、適切に選択されてよい。概して、リプログラミングは、インビトロで行われる。いくつかの態様では、リプログラミングは、核移植もしくは細胞質移植、あるいは、例えば、卵母細胞、胚、胚細胞、または多能性細胞との細胞融合を含まない。

【 0 2 2 9 】

リプログラミング法は、多くの場合、複数の細胞を培養液中でリプログラミング剤またはその組み合わせに曝露し、所望の細胞型もしくは状態の特徴を有する 1 個以上の細胞または細胞コロニーを同定あるいは選択することを含む。1 個以上の細胞または細胞コロニーの少なくとも一部分は、単離し、培養液中で拡大させてもよく、その新しい細胞同一性または状態を維持するのに適切な条件下にて、明確に異なる細胞株として繁殖させてもよい。いくつかの実施形態では、かかる条件は、その型の細胞に典型的な培養条件である。いくつかの実施形態では、外因性リプログラミング剤のうちの少なくとも 1 つ、一部、または全てに対する継続的な曝露は、リプログラミングされた細胞の同一性または状態を維持するために必要ではない。例えば、リプログラミングされた細胞の同一性または状態は、かかる薬剤の不在下で安定である。

【 0 2 3 0 】

10

20

30

40

50

体細胞は、多様な方法によってiPS細胞にリプログラミングされ得る。いくつかの実施形態では、iPS細胞は、1つ以上のリプログラミング因子もしくはかかる因子をコードする核酸を体細胞に導入すること、及び/またはかかる因子をコードする1つ以上の外因性核酸の細胞における発現を誘導する工程を含む方法によって生成される。いくつかの実施形態では、リプログラミング因子は、OCT4、SOX2、及びKLF4(OSK因子)、そして任意にc-MYC(OSKM因子)のうちの少なくとも1つ、2つ、または全てを含む。NANOG及びLIN28などの他のリプログラミング因子も用いられる。例えば、OCT4、SOX2、NANOG、及びLIN28の組み合わせ(OSNL因子)は、多能性を誘導することができる。多くの変形形態または代替的な組み合わせが可能である。例えば、KLF4及び/もしくはc-MYCの代わりに、またはそれらに加えて、異なるKLF及び/もしくはMYCファミリーメンバーを使用してもよい。例えば、KLF2またはKLF5は、KLF4に代わることができ、N-MYCまたはL-Mycは、c-MYCに代わることができ、当業者であれば、OKSMまたはOSNL因子のうちの1つ以上に代わることができ様々なリプログラミング剤を把握しているであろう。いくつかの実施形態では、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれよりも多くのリプログラミング因子が使用される。いくつかの実施形態では、リプログラミング因子は、少なくともOCT4を含む。

10

【0231】

いくつかの実施形態では、十分な時間にわたって適切なレベルで好適な培養条件下にて導入または発現された適切な一式のリプログラミング因子は、内因性多能性遺伝子OCT4、SOX2、及びNANOGの活性化を引き起こし、これは、細胞の一部における自続的な多能性状態をもたらし得る。いくつかの実施形態では、細胞に導入された外因性DNA(例えば、リプログラミング因子をコードするDNA)は、多能性の誘導後、例えば、自続的な多能性状態が達成された後、または多能性細胞、誘導神経幹細胞、もしくは誘導神経前駆細胞が所望の細胞型に分化された後に、自然に発現停止し、かつ/あるいは、少なくとも部分的に除去されるか、または失われる。挿入DNAは、リコンビナーゼの標的部位を含んでもよく、その結果、これらの部位間の領域の除去がリコンビナーゼ媒介性切除によって行われ得る。かかる切除は、リコンビナーゼ標的部位の一部を含む短い残留配列のみを残し得る。細胞をリプログラミングするために使用されたエピソームプラスミドは、その後、失われ得る。導入された遺伝子材料を含まない、もしくは外因性遺伝子材料を本質的に含まない(例えば、残留リコンビナーゼ標的部位またはその一部のみを含有する)iPS細胞及び/または誘導神経系細胞は、かかる方法によって産生することができる。

20

30

【0232】

いくつかの実施形態では、1つ以上のリプログラミング因子が、その因子をコードする1個以上の核酸配列を導入することによって、細胞に導入される。いくつかの実施形態では、1個以上の核酸配列は、DNAを含む。いくつかの実施形態では、1個以上の核酸配列は、RNAを含む。いくつかの実施形態では、1個以上の核酸配列は、核酸構築物を含む。いくつかの実施形態では、1個以上の核酸配列は、リプログラミング因子を標的細胞(例えば、哺乳動物体細胞、例えば、ヒト線維芽細胞、ケラチノサイト、または血液細胞)に送達するためのベクターを含む。例えば、iPS細胞は、好適な一式のリプログラミング因子をコードする遺伝子を、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスによる感染によって体細胞に導入することにより、生成することができる。任意の好適なベクターが使用され得る。好適なベクターの例は、Stadtfeld及びHochedlingerにより説明されている(Genes Dev. 24: 2239-2263、2010年、参照により本明細書に組み込まれる)。他の好適なベクターは、当業者にとって明らかである。いくつかの実施形態では、2つ、3つ、4つ、またはそれよりも多くの因子が、核酸の単一カセット内でコードされる。例えば、リプログラミング因子は、単一のプロモーターからの効率的な多シストロン性発現を支持する2A「自己切断」ペプチドを使用して、単一のウイルス内で送達され得る。ある特定の実施形態では、リプログラミング因子ま

40

50

たは他のリプログラミング剤の生物活性バリエーションが使用され得る。こうした因子のうち
 の1つ以上をコードする遺伝子をゲノムに挿入することの代わりに、またはそれに加えて
 、多様な技法をiPS細胞の生成に用いることができる。かかる方法は、小分子の使用、
 一過性トランスフェクション、非組込型ウイルス（例えば、アデノウイルス、センダイウ
 イルス）もしくは環状エピソームとして染色体外で複製可能なプラスミド（例えば、EB
 NA1遺伝子及びOriP DNAなどのエプスタイン-バーウイルスの要素を含む）を
 使用した感染、タンパク質形質導入、1つ以上のリプログラミング因子をコードする翻訳
 可能なmRNAの導入、及び/または選択された遺伝子（例えば、p53-p21経路遺
 伝子）の発現を阻害するためのRNA干渉を伴い得る。TGF及び/またはMEK経路
 などの、ES細胞の自己再生及び多能性に関するシグナル伝達経路に作用する分子を使用
 してもよい。リプログラミング因子の代わりに、かつ/または1つ以上のリプログラミ
 ング因子と組み合わせて、リプログラミングを増強するために使用され得るリプログラミ
 ング剤の非限定的な例としては、とりわけ、キナーゼ阻害因子、例えば、オーロラAキナ
 ーゼ阻害因子（Li Z, Rana TM Nat Commun. 2012; 3: 10
 85）、TGF- β /アクチビン/Nodal受容体阻害因子（例えば、A-83-01
 ）などのTGF経路阻害因子、MEK阻害因子（例えば、PD0325901）、GS
 K3阻害因子（例えば、CHIR99021）、ROCK阻害因子（例えば、HA-1
 00）、Oct4活性化化合物1などのOct-4を活性化させる化合物1及びその構造
 類似体（Li, T, et al, Proc Natl Acad Sci U S A.
 2012; 109(51): 20853-8）、レチノイン酸受容体作動薬が挙げられ、
 ある特定の実施形態において使用され得る。ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害因
 子（例えば、バルプロ酸、スベロイルアニリドヒドロキサム酸、酪酸ナトリウム、トリコ
 スタチンA）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害因子（例えば、BIX-0129
 4）、及び内因性クロマチン修飾酵素の他の調節因子は、リプログラミング効率を改善す
 ることができる。これらの化合物は、リプログラミングへのエピジェネティック障壁を低
 減させることによって作用し得る。いくつかの実施形態では、リプログラミング剤は、E
 SC特異的細胞周期（ESCC）制御miRNAもしくはsiRNA、またはかかるmi
 RNAの標的遺伝子を阻害するアンチセンス分子などの、リプログラミングを増強する1
 つ以上のマイクロRNAまたはマイクロRNA前駆体を含む。いくつかの実施形態では、
 ある特定のマイクロRNA（例えば、let-7）の発現の阻害は、リプログラミングを増強する
 30
 いくつかの実施形態では、リプログラミング剤は、アンタゴミルまたはアンチ
 センス分子などの、かかるmiRNAの阻害因子を含む。いくつかの実施形態では、1個
 以上の遺伝子、例えば、p53、DOT1、4E-BPの発現の（例えば、siRNA、
 shRNA、またはアンチセンスの使用による）阻害は、リプログラミングを増強する。
 【0233】

いくつかの実施形態では、リプログラミングは、少なくとも部分的に、mRNAを細胞
 に導入することによって行われ得、この導入されたmRNAは、少なくとも1つのリプロ
 グラミング因子をコードする。mRNAは、インビトロ転写mRNAであってもよい。イン
 ビトロ転写mRNA産生の非限定的な例は、Warrenらによって説明されている（
 Cell Stem Cell 7(5): 618-30, 2010, Mandal P
 K, Rossi DJ. Nat Protoc. 2013 8(3): 568-82、及
 び/またはPCT/US2011/032679（WO/2011/130624）、こ
 れらの各々の教示は、参照により本明細書に組み込まれる）。記載されているプロトコ
 ルは、1つ以上の本明細書における目的のmRNAを産生するように適合されてもよい。い
 いくつかの実施形態では、mRNA、例えば、インビトロ転写mRNAは、該mRNAの安
 定性または翻訳可能性を上昇させる1つ以上の修飾（例えば、修飾リボヌクレオチド）を
 含む。いくつかの実施形態では、この修飾は、シチジンの5-メチルシチジン（5mC）
 での置換、ウリジンのシュードウリジン（psi）での置換、またはその両方を含む。い
 いくつかの実施形態では、シチジン、ウリジン、またはその両方の、少なくとも50%、6
 0%、70%、80%、90%、95%、または全てが、それぞれ、5mCまたはpsi
 40
 50

で置換される。いくつかの実施形態では、mRNAは、ホスファターゼ処置に供される。いくつかの実施形態では、修飾は、インターフェロンシグナル伝達を減衰させる。いくつかの実施形態では、培地には、インターフェロンシグナル伝達の阻害因子が補充される。いくつかの実施形態では、阻害因子は、インターフェロンに結合する。いくつかの実施形態では、阻害因子は、B18Rタンパク質、I型インターフェロンのワクシニアウイルスデコイ受容体などのデコイ受容体を含む。

【0234】

いくつかの実施形態では、mRNA、例えば、インビトロ転写mRNAは、5'キャップを含む。このキャップは、野生型であっても修飾されていてもよい。好適なキャップ及びかかるキャップを含有するmRNAを合成する方法の例は、当業者にとって明らかである。いくつかの実施形態では、mRNA、例えば、インビトロ転写mRNAは、読み取り枠を含み、これには、該読み取り枠の翻訳を増強する5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域、例えば、強力なKozak翻訳開始シグナルを含む5'非翻訳領域が隣接しており、かつ/または3'非翻訳領域は、-グロビン3'非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、mRNA、例えば、インビトロ転写mRNAは、ポリA尾部を含む。ポリA尾部をmRNAに付加する方法は、当該技術分野で既知である（例えば、ポリAポリメラーゼによる酵素添加、または好適なリガーゼを用いた連結）。いくつかの実施形態では、mRNAは、体細胞の細胞リプログラミングが起こるまで、該mRNAによってコードされるリプログラミング因子または他のリプログラミング剤の発現を維持するのに十分な量で、かつ十分な期間にわたり、該体細胞に導入される。この十分な期間は、例えば、用いられる体細胞及びリプログラミング因子の種類に応じて、様々であってもよい。当業者であれば、日常的な実験によって適切な期間を決定することができる。いくつかの実施形態では、mRNAは、リプログラミングの過程中、様々な間隔で体細胞に導入される。

【0235】

ある特定の実施形態で使用され得る、リプログラミング、ある特定のリプログラミング法、リプログラミングされた細胞を特性化する方法、及び/またはiPS細胞から分化細胞を生成する方法に関するさらなる考察ならびに説明は、例えば、米国特許公開第20110076678号、同第20110088107号、同第20100310525号、Lyssiotis, CA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 106(22): 8912-7, 2009、Carey BW, Proc Natl Acad Sci U S A; 106(1): 157-62, 2009、Hockemeyer D, et al., Cell Stem Cell. 2008; 3(3): 346-53、及び/またはLakshmi pathy, U. and Vemuri, MC (eds.), Pluripotent Stem Cells - Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 997 (2013) Humana Press (Springerのブランド)、ならびに前述のいずれかに引用される参考文献で確認することができる。様々なリプログラミング法の非包括的、非限定的な考察は、Theunissen TW and Jaenisch R., Cell Stem Cell. (2014), 14(6): 720-34で確認される。

【0236】

本開示は、核酸（例えば、DNAまたはRNA）を細胞に導入して、例えば、リプログラミング及び/または遺伝子改変を行うための、任意の好適な方法を想定している。いくつかの実施形態では、核酸は、電気穿孔によって体細胞に導入される。いくつかの実施形態では、核酸は、トランスフェクションによって体細胞に導入される。好適なトランスフェクション試薬が使用され得、その多くが当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態では、核酸は、ビヒクル、例えば、カチオン性ビヒクル、例えば、カチオン性リポソームまたはナノ粒子と複合されてもよい。いくつかの実施形態では、ビヒクルは、エンドサイトーシスによる核酸の取り込みを促進し、かつ/またはエンドソームからの核酸の放出を促進する。いくつかの実施形態では、核酸は、ベクターに組み込まれるか、またはそ

10

20

30

40

50

れによって担持されてもよい。

【0237】

概して、ヒト i P S 細胞は、いずれの型の体細胞から生成されてもよい。いくつかの実施形態では、ヒト i P S 細胞は、線維芽細胞、ケラチノサイト、脂肪組織細胞、間葉系幹細胞（これは脂肪組織から得ることができる）、末梢血単核細胞（P M N C）、または尿から回収される上皮細胞から生成される。これらの細胞型は、生きているヒト対象から非侵襲的に、または最小もしくは低度の侵襲性で容易に得られ得るため、ヒト i P S 細胞を得るために特に簡便であり得る。いくつかの実施形態では、ヒト i P S 細胞は、精製されたヒト C D 3 4 + 細胞（これは末梢血から単離され得る）から得られる。

【0238】

いくつかの実施形態では、リプログラミングされた細胞は、分化して1つ以上の異なる細胞系統または細胞型の細胞を産生するように誘導され得る。例えば、リプログラミングによって生成された多能性細胞が、多分化能前駆細胞、例えば、神経前駆細胞に分化することを許容または誘導してもよく、これが様々な型の成熟分化細胞を生じるようにさらに分化することを許容または誘導してもよい。1つ以上の所望の細胞系統または細胞型への分化は、細胞を適切な1つ以上の操作一式に供すること、または分化を許容する条件下に細胞を置くことによって誘導され得る。分化が1つまたは複数の細胞周期の過程にわたって起こり得ることは理解されよう。分化を引き起こすために使用されるべき具体的な操作及び/またはプロトコルは、例えば、所望の細胞型及び/または開始細胞型に応じて、適切に選択されてよい。

【0239】

いくつかの実施形態では、神経幹細胞は、多能性ヒト細胞から得られる。「神経幹細胞」という用語は、多分化能、自己再生、神経球形形成能、及び神経幹細胞に特徴的な細胞マーカーの発現などの、神経幹細胞に特徴的な特徴を示す神経系細胞を指す。神経幹細胞は多分化能性であり、成熟した神経細胞、アストロサイト、及びオリゴデンドロサイトを生じさせる能力を有する。いくつかの実施形態では、神経前駆細胞は、多能性ヒト細胞からインビトロで得られる。「神経前駆細胞」という用語は、神経幹細胞よりも特定の細胞運命に向かって分化または特異化しており、成熟神経細胞よりも分化しておらず、成熟神経細胞の特徴を有する細胞を生じさせることができる、神経系細胞を指す。いくつかの実施形態では、誘導神経前駆細胞は、神経細胞とグリア細胞との両方（例えば、アストロサイト及び/またはオリゴデンドロサイトを生じさせることができる。成熟した神経細胞及びグリア細胞を生じさせるプロセスが、進行する分化を伴う1つ以上の細胞分裂周期を伴い得ることは理解されよう。

【0240】

神経幹細胞及び神経前駆細胞は、培養液中で分化して、成熟神経細胞、そしていくつかの実施形態ではグリア細胞を生じさせ得る。いくつかの実施形態では、成熟神経細胞は、分裂終了細胞である。そのような分化を誘導するための方法は、当該技術分野で既知である。概して、かかる方法は、所望の細胞型を生成するのに適切な時間にわたって神経幹細胞または神経前駆細胞を好適な培養培地中で培養する工程を含む。培養培地は、神経分化を促進する1つ以上の薬剤を含んでもよく、かつ/または、神経分化を阻害するか、もしくは非神経細胞系統経路に沿った分化を促進し得る1つ以上の薬剤を欠いていてもよい。i P S または E S 細胞、神経幹細胞、及び神経前駆細胞などのヒト多能性幹細胞（P S C）から培養液中で神経細胞を生成するための方法は、当該技術分野で既知である。具体的な方法、培養培地は、所望の細胞型またはサブタイプの細胞を生成するために適切に選択されてよい。いくつかの実施形態では、神経細胞とグリア細胞との両方を含む細胞培養物が生成され得る。例えば、いくつかの実施形態では、神経細胞は、米国特許公開第 2 0 1 0 0 0 2 1 4 3 7 号及び/または Chung, C., et al., Science. (2013); 342 (6161): 983-7 に記載されているように、i P S 細胞から生成され得る。

【0241】

10

20

30

40

50

多能性ヒト細胞からグリア前駆細胞を生成するための方法が利用可能である。グリア前駆細胞は、オリゴデンドロサイト細胞及びアストロサイト細胞に分化することができる。アストロサイトとオリゴデンドロサイトとの両方が、ヒトiPSC由来のヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)から効率的に得られる(Wang, S., et al. Cell Stem Cell 12, 252-264)。

【0242】

いくつかの実施形態では、哺乳動物(例えば、ヒト)の神経系細胞は、例えば、インビトロの分化転換によって生成され得る。いくつかの実施形態では、神経幹細胞、神経前駆細胞、または神経細胞は、体細胞、例えば、線維芽細胞またはケラチノサイトからの分化転換によって生成される。かかる細胞を分化転換によって生成するための方法は、当該技術分野で既知である(例えば、Ring, KL, et al., (2012) Cell Stem Cell 11, 100-109及び/またはPang, ZP, et al., (2012), Nature, 476:220-224を参照されたい)。

10

【0243】

いくつかの実施形態では、特定の型の神経細胞またはグリア細胞が、本明細書に記載されている方法において生成、単離、及び/または使用される。当業者であれば、脳または脳の特定の領域もしくは小領域、例えば前脳、中脳、皮質、海馬、線条体、または脳の特定の核、例えば、神経変性疾患において影響を受ける頻度が高い領域、小領域、または核内に典型的に見出され、かつ/あるいはこれらの場所にある、神経細胞及び/もしくはグリア細胞に発達するように運命づけられている細胞を示す、特徴及び細胞マーカーを把握しているであろう。当業者であれば、目的の神経系細胞を同定するために適切なマーカーを把握しているであろう。好適なマーカーは、例えば、転写因子、神経伝達物質の合成または神経伝達物質前駆体として機能する分子の取り込みに関与する酵素、神経伝達物質の受容体、中間径フィラメントタンパク質、イオンチャネルサブユニット、細胞接着分子などであってもよい。当業者であれば、目的の組織または細胞において、目的の核酸またはタンパク質、例えば、ApoE媒介性毒性の修飾遺伝子である酵母遺伝子のヒト相同体を発現するために使用され得る好適な制御要素、例えば、プロモーターを把握しているであろう。例えば、前述のマーカーをコードする遺伝子の制御要素、例えば、プロモーターが使用され得る。いくつかの実施形態では、神経細胞特異的プロモーターシナプシンが使用され得る。

20

30

【0244】

いくつかの実施形態では、細胞は、A を過剰発現し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、A の変異体型、例えば、ADに関連する変異体型を発現し得る。

【0245】

ApoE媒介性毒性を調節する酵母遺伝子の哺乳動物相同体が過剰発現または阻害もしくは無効化されている哺乳動物細胞及び/あるいは非ヒトトランスジェニック動物が、多様な目的のために使用され得る。例えば、かかる細胞及び/または動物は、本明細書に記載されている酵母系もしくは他の系で同定されている候補薬剤を試験するためのモデル系として使用されてもよく、または新規の候補薬剤を同定するために使用されてもよい。いくつかの実施形態では、ApoE媒介性疾患、例えば、ADの遺伝的危険因子である酵母遺伝子の哺乳動物相同体を保有する哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞)は、遺伝的危険因子を保有する罹患対象を治療するのに特に役立つ候補薬剤を同定するための個別化されたモデルとして機能し得る。いくつかの実施形態では、かかる細胞は、ヒトApoE、例えば、ヒトApoE4、または特定のApoEアイソフォームを模倣するApoEを保有する。例えば、ヒトApoE4を模倣するApoEは、ヒトApoEの残基112及び158に対応する位置にアルギニンを有する。いくつかの実施形態では、細胞は、いずれのAPOE遺伝子型を有してもよい。

40

【0246】

前出の哺乳動物モデル系のいずれが、本明細書に記載されているヒトApoEタンパク質の結合パートナーを同定する方法において使用されてもよい。

50

【0247】

薬学的組成物及び治療方法

細胞内のApoE媒介性毒性を予防または抑制することが分かっている化合物は、例えば、ApoE関連疾患、例えば、アルツハイマー病などのApoE関連神経変性疾患を治療するための対象への投与のために、薬学的組成物として製剤化することができる。

【0248】

薬学的組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」には、生理学的に適合性である、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれる。本組成物は、薬学的に許容される塩、例えば、酸付加塩または塩基付加塩（例えば、Berget al., J. Pharm. Sci. 66: 1-19, 1977を参照されたい）を含むことができる。

10

【0249】

本化合物は、標準的方法に従って製剤化することができる。製剤処方は、十分に確立された技術であり、例えば、Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472)、Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727)、及びKibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X)にさらに記載されている。

20

【0250】

いくつかの実施形態では、細胞内のApoE媒介性毒性を予防または抑制する化合物は、塩化ナトリウム、リン酸二塩基ナトリウム七水和物 (sodium dibasic phosphate heptahydrate)、リン酸一ナトリウムなどの賦形剤材料、及び安定剤を用いて製剤化することができる。これは例えば、好適な濃度にて緩衝液中で準備することができ、2~8で保管することができる。

30

【0251】

本薬学的組成物は、多様な形態であってよい。これらには、例えば、液体溶液（例えば、注射用液及び輸注用液）、分散液または懸濁液、錠剤、カプセル剤、ピル、粉剤、リボソーム、及び坐剤などの、液体、半固体、及び固体剤形が含まれる。好ましい形態は、意図される投与方法及び治療用途によって決めることができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている1つ以上の薬剤を含む組成物は、注射用液または輸注用液の形態である。このような組成物は、非経口方法（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内注射）によって投与することができる。本明細書で使用される「非経口投与」及び「非経口的に投与される」という表現は、通常は注射による経腸及び局所投与以外の投与方法を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、脳内、頭蓋内、頸動脈内、及び胸骨内注射ならびに輸注を含むが、これらに限定されない。

40

【0252】

本組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リボソーム、または高濃度での安定な保管に好適な他の秩序構造として製剤化することができる。無菌注射用液は、本明細書に記載されている薬剤を、必要に応じて、上に列挙された成分のうちの1つまたはそれらの組み合わせと共に、適切な溶媒中に必要量で組み込み、その後、濾過滅菌することによって、調製することができる。概して、分散液は、化合物を、塩基性分散媒及び上に列挙されたもののうち必要な他の成分を含有する無菌ビヒクル中に組み込むことによって調

50

製される。無菌注射用液の調製用の無菌粉体の場合、好ましい調製法は真空乾燥及び凍結乾燥であり、これは、化合物に加え、任意のさらなる所望の成分の粉体を、以前に滅菌濾過されたその溶液からもたらすものである。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合は必要な粒径の維持によって、そして界面活性剤の使用によって、維持することができる。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアレート塩及びゼラチンを組成物に含めることによって引き起こすことができる。

【0253】

ある特定の実施形態では、本化合物は、インプラントを含む徐放性製剤、及びマイクロカプセル化送達系などの、化合物を急速な放出から保護する担体を用いて調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの、生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤の調製のための多くの方法が、特許取得されているか、または一般的に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

10

【0254】

細胞内のApoE誘導性毒性を予防または抑制するものと同定された化合物は、例えば、循環、例えば、血液、血清、もしくは他の組織におけるその安定化及び/または保持を、例えば、少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、または50倍改善する部分で修飾することができる。当該修飾された化合物を、それが目的の治療部位に到達できるかどうか、例えばアルツハイマー病などの神経変性疾患を有する対象の細胞において見出されるかどうかを（例えば、標識された形態の当該化合物を使用することによって）評定するために評価することができる。

20

【0255】

例えば、本化合物は、ポリアルキレンオキシドまたはポリエチレンオキシドなどのポリマー、例えば、実質的に非抗原性のポリマーと会合することができる。好適なポリマーは、重量によって実質的に異なる。約200~約35,000ダルトン（または約1,000~約15,000、及び2,000~約12,500）の範囲の数平均分子量を有するポリマーを使用することができる。例えば、化合物は、水溶性ポリマー、例えば、親水性ポリビニルポリマー、例えば、ポリビニルアルコールまたはポリビニルピロリドンに抱合され得る。かかるポリマーの非限定的な一覧には、ポリエチレングリコール（PEG）またはポリプロピレングリコールなどのポリアルキレンオキシドホモポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール、それらのコポリマー、及びそれらのブロックコポリマー（ただし、ブロックコポリマーの水溶性が維持されることを条件とする）が含まれる。さらなる有用なポリマーとしては、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、及びポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンとのブロックコポリマー（PLURONICS（登録商標））などのポリオキシアルキレン；ポリメタクリレート；カルボマー；ならびに分岐または非分岐状の多糖類が挙げられる。

30

40

【0256】

本化合物が第2の薬剤（例えば、アルツハイマー病または他のApoE関連疾患のための任意のさらなる治療薬と組み合わせて使用される場合、この2つの薬剤は、別々に製剤化されても一緒に製剤化されてもよい。例えば、それぞれの薬学的組成物を、例えば投与の直前に混合し、一緒に投与することもでき、または、例えば同時もしくは異なる時間に、別々に投与することもできる。別々に投与される化合物は、例えば具体的な薬剤に応じて、同じ経路で投与されても異なる経路で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、第1及び第2の化合物は、互いから1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日以内、または互いから2週間、3週間、4週間、もしくは6週間に、1回以上投与される。

【0257】

50

本明細書に記載されている化合物、及び本明細書に記載されているように同定された化合物は、ApoE 媒介性毒性、アミロイド 媒介性毒性、及び/またはアミロイド 凝集体、例えば、アミロイド オリゴマー及び/もしくは二量体の形成、沈着、蓄積、もしくは存続性に関連する障害のリスクがあるか、あるいはそれを有する対象（例えば、ヒト対象）を治療するために使用することができる。特定の実施形態では、この障害はアルツハイマー病である。このような障害のリスクがあるかまたはそれを有する個体を同定する方法は、当該技術分野で既知である。例えば、ADは、例えば、患者病歴（例えば、記憶喪失）臨床的観察、特徴的な神経学的及び神経心理学的特徴の存在、ならびに前述のものの原因であり得る他の病態の検出の欠如に基づいて診断することができる。コンピュータ断層撮影法（CT）、磁気共鳴画像法（MRI）、単一光子放射断層撮影法（SPECT）、または陽電子放出断層撮影法（PET）などの撮影技法を用いることができる。診断は、脳物質の死後検査によって確認することができる。ADの例示的な診断基準は、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) - IV (2000年編集)またはDSM - V、及びNational Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA)の基準 (McKhann G, et al. (1984) Neurology 34 (7): 939 - 44)、例えば更新版 (Dubois B, et al. (2007) Lancet Neurol 6 (8): 734 - 46)で確認される。様々なバイオマーカー、例えば、アミロイド もしくはタウタンパク質（例えば、全タウタンパク質及びリン酸化タウ）についての脳脊髄液（CSF）の分析、及び/またはアミロイド 沈着物に結合する標識化合物（例えば、11C標識ピツパーグ化合物 B (11C - PIB) もしくは 18F - AV - 45 (フロベタピル (florbetapir) F18))を用いた撮影法（例えば、PET撮影法）は、ADの発症を予測するために、例えば、将来（例えば、今後2年以内）にADに進行する著しい可能性を有する個体を同定するために使用することができる。そのような撮影法はまた、本明細書において特定され、かつ/または本発明のスクリーニングアッセイを使用して同定された化合物のインビボでの作用を評定するために、本発明において用いられてもよい。いくつかの実施形態では、対象は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）、プレセニリン 1、またはプレセニリン 2をコードする遺伝子内に突然変異を有する。いくつかの実施形態では、突然変異は、A 42の産生を増加させるか、またはA 42対A 40の比を変更する。

10

20

30

【0258】

いくつかの実施形態では、APOE 遺伝子に関する対象の遺伝子型は既知である。いくつかの実施形態では、対象は、APOE 遺伝子の 4対立遺伝子を少なくとも1コピー有する。一般的なApoEアイソフォームは、ApoEポリペプチドの112位及び158位にあるアミノ酸をコードするコドンにおけるC/T多型によって決定される。可能性のある6つの遺伝子型のうち、3つはホモ接合性であり（2/2、3/3、4/4）、3つはヘテロ接合性である（2/3、2/4、3/4）。いくつかの実施形態では、対象は、4対立遺伝子に対してヘテロ接合性である（対象の遺伝子型は、2/4または3/4である）。いくつかの実施形態では、対象は、4対立遺伝子に対してホモ接合性である。いくつかの実施形態では、対象は、3対立遺伝子に対してヘテロ接合性である（対象の遺伝子型は、2/3または3/4である）。いくつかの実施形態では、対象は、3対立遺伝子に対してホモ接合性である。いくつかの実施形態では、対象は、2対立遺伝子に対してヘテロ接合性である（対象の遺伝子型は、2/3または2/4である）。いくつかの実施形態では、対象は、2対立遺伝子に対してホモ接合性である。APOE 遺伝子座における遺伝子型は、当該技術分野で既知の遺伝子検査に有用な多様な方法のいずれか、例えば、配列決定（例えば、PCRによる増幅後）、対立遺伝子特異性プローブのハイブリダイゼーション後の検出、対立遺

40

50

伝子特異性プライマーのハイブリダイゼーション後のリアルタイムPCR (Calero O, et al., (2009) J Neurosci Methods. 183 (2) : 238 - 40)、SNaPshot (商標)ミニシーケンシング (Ben-Avital, et al., J Alzheimers Dis. 2004 Oct; 6 (5) : 497 - 501)、及び多重テトラプライマー増幅不応性突然変異系 (T-ARMS) PCR、TaqManアッセイ (Koch W, et al., (2002) Clin Chem Lab Med. 40 (11) : 1123 - 31)、FRETベース法 (Rihn, BH (2009) Clin Exp Med; 9 (1) : 61 - 5.)、PCR後の制限断片長多型性評価 (Zivelin A, et al., (1997) Clin Chem. 43 : 1657 - 9)などを使用して、決定することができる。

10

【0259】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、患者に治療用化合物を適用もしくは投与すること、すなわち、疾患（または他の医学的に認識される障害もしくは症候群）、疾患の症状、または疾患に向かう素因（例えば、疾患に関連する1つ以上の危険因子（例えば、遺伝的危険因子））を有する対象（例えば、「患者」とも称され得るヒト対象）に、疾患、疾患の症状、または疾患に向かう素因を、癒やすか、治癒するか、軽減するか、和らげるか、変更するか、是正するか、緩和するか、改善するか、または（対象に有益な様式で）それに影響を及ぼす目的で、治療用化合物を適用もしくは投与することとして定義される。いくつかの実施形態では、治療は予防的である。すなわち、治療は、疾患を発症していない（そして疾患を発症する素因を有する場合も有しない場合もある）対象に、対象が疾患を発症することを遅延させること、予防すること、もしくはその可能性を低減させること、または対象が疾患を発症した場合はその重症度を低減させることを目的として施される。化合物は、同様にまたは代替的に、試験、研究、もしくは診断の目的で対象に投与されてもよく、かつ/あるいは、例えば、試験、研究、診断の目的で、または単離された組織、細胞、もしくは細胞株を後に治療のために対象に投与することを目的として、患者から単離された組織、細胞、もしくは細胞株と接触させられてもよい。

20

【0260】

いくつかの態様では、対象（例えば、ヒト）において、標的タンパク質、または標的タンパク質の発現もしくは少なくとも1つの標的タンパク質の活性を調節する化合物を対象に投与することによって、ApoE媒介性疾患を予防するための方法が、本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、例えば、本発明の方法によって同定されたヒトApoEタンパク質の結合パートナーであり得る。異常または不要な標的タンパク質の発現または活性によって引き起こされるか、またはそれらが寄与する疾患のリスクがある対象は、例えば、本明細書に記載されている診断アッセイもしくは予後アッセイのうちのいずれか、またはそれらの組み合わせによって同定することができる。予防的化合物の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいは、その進行が遅延されるように、疾患に特徴的な症状の顕在化の前に行うことができる。当該技術分野で既知の方法を使用して、治療の有効性を判定することができる。対象を治療するために使用される適切な化合物は、本明細書に記載されているスクリーニングアッセイに基づいて決定することができる。AD（または他のApoE媒介性疾患）の一部の症例は、少なくとも部分的に、異常なレベルの標的遺伝子産物によって、または異常な活性を示す標的タンパク質の存在によって引き起こされ得る。本発明のいくつかの態様では、そのような遺伝子産物のレベル及び/または活性を変更することで、障害の症状の緩和がもたらされる。例えば、異常に高いレベルの標的遺伝子産物、もしくは標的タンパク質の異常に高いレベルの活性は、低減することができ、かつ/または、異常に高いレベルの標的遺伝子産物、もしくは標的タンパク質の異常に高いレベルの活性は、上昇することができる。したがって、かかる遺伝子産物のレベル及び/または活性の調節により、障害の症状の緩和がもたらされる。故に、いくつかの実施形態では、ApoE媒介性またはアミロイド媒介性障害の治療は、選択された標的遺伝子産物（例えば、ApoE媒介性毒性の増強因子）の発現または活性を阻害する技法によって達成することができる。いくつかの実施形態では、Apo

30

40

50

E 媒介性またはアミロイド 媒介性障害の治療は、選択された標的遺伝子産物（例えば、ApoE 媒介性毒性の抑制因子）の発現または活性を増強する技法によって達成することができる。例えば、負の調節活性を示す（例えば、遺伝子発現またはタンパク質活性を阻害する）化合物、例えば、上述のアッセイのうちの一つ以上を使用して同定された薬剤は、本明細書に記載されているように、ApoE 媒介性またはアミロイド 媒介性障害の症状を予防及び/または緩和するために使用することができる。かかる分子としては、ペプチド、有機もしくは無機小分子、抗体、siRNA、miRNA、アンチセンス、アプタマー、リボザイム、または三重らせん分子を挙げることができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本化合物は、一つ以上の標的タンパク質活性を増強する。かかる化合物の例としては、活性標的タンパク質（またはその生物活性断片もしくはバリエーション）、標的タンパク質をコードするか、またはその生物活性断片もしくはバリエーションをコードする核酸分子、さもなければ遺伝子の発現を阻害するであろうmiRNAを阻害するアンタゴミル、ペプチド、有機もしくは無機小分子、及び抗体を挙げることができるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0261】

ApoE 媒介性毒性を阻害し、かつ/または標的遺伝子の発現、合成、及び/もしくは活性を調節する（阻害または増強する）化合物は、ApoE 媒介性もしくはアミロイド 媒介性障害を予防、治療、または緩和するために、治療有効用量で患者に投与することができる。治療有効用量は、疾患の一つ以上の症状もしくは徴候の緩和、及び/または疾患の一つ以上の症状もしくは徴候の重症度が高まる速度の（例えば、療法の不在下で予想されるであろう速度と比較したときの）低減をもたらすのに十分な化合物の量とすることができる。ADにおける有効性を評定するための基準は、当該技術分野で既知である。かかる化合物の毒性及び治療有効性は、標準的な薬理学的手段によって判定することができる。いくつかの実施形態では、Vellas, B., et al., Lancet Neurology (2008) 7 (5): 436 - 450に記載されている一つ以上のエンドポイントまたはエンドポイントセットが使用され得る。いくつかの実施形態では、Aisen, PS, et al., 2011; 76 (3): 280 - 6に記載されている一つ以上のエンドポイントまたはエンドポイントセットが、早期（前認知症（predementia））ADにおける有効性を評価するために使用される。有効用量は典型的に、例えば、その半減期などの様々な要因に応じて複数回、例えば、毎日、毎週、毎月などに1回またはより多くの回数で投与されることは理解されよう。例示的な実施形態では、治療有効量は、体重1kg当たり約0.001~100mg、例えば、体重1kg当たり約0.01~25mg、体重1kg当たり約0.1~20mg、体重1kg当たり約1~10mgの範囲である。疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全身的健康及び/または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、ある特定の要因が、対象を効果的に治療するために必要とされる薬用量及びタイミングに影響し得ることは、当業者であれば理解するであろう。さらに、治療有効量の薬剤、例えば、小分子、タンパク質、ポリペプチド、核酸、または抗体を用いた対象の治療は、単回治療を含むことができ、または一連の治療を含むことができる。

【0262】

いくつかの態様では、標的タンパク質または核酸分子の異常または不要な発現または活性によって特徴付けられる疾患または障害を患う個体を治療する方法が、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、当該方法は、化合物（例えば、本明細書に記載されているスクリーニングアッセイによって同定された化合物）、または標的タンパク質の発現または活性を調節する（例えば、上方制御または下方制御する）化合物の組み合わせを投与する工程を伴う。標的タンパク質活性の刺激は、標的タンパク質が異常に下方制御されており、かつ/または上昇した標的タンパク質活性が有益な効果を有する可能性が高い状況において望ましい場合がある。標的タンパク質活性の阻害は、標的タンパク質が異常に上方制御されており、かつ/または低下した標的タンパク質活性が有益な効果を有する可能性が高い状況において望ましい場合がある。ある特定の実施形態では、1種以上の

化合物（例えば、異なる遺伝子またはタンパク質の発現または活性を調節する化合物）と一緒に（同時に）投与することも、または異なる時間に（逐次）投与することもできる。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、例えば、本発明の方法によって同定されたヒト ApoE タンパク質の結合パートナーであり得る。

【0263】

以下は、本発明の実施の例である。これらは、本発明の範囲をいかようにも限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0264】

実施例 1：ApoE 毒性の酵母モデル

ヒト ApoE のガラクトース誘導性発現を可能にするいくつかの酵母菌株を生成した。これらの研究で使用した発現構築物は、アミノ末端に酵母 Kar2p シグナル配列、続いてヒト ApoE タンパク質、続いてカルボキシ末端に EGF P タンパク質を含有する融合ポリペプチドをコードする。ヒト ApoE タンパク質を細胞内で小胞体に輸送させ、それによってこれが分泌経路に進入するように、シグナル配列を融合ポリペプチド内に含めた。GAL1 プロモーターの制御下でヒト ApoE 2、ApoE 3、または ApoE 4 アイソフォームをコードする構築物を生成した。

【0265】

以下の配列を、Gateway クローニング技術 LR 反応を使用して、pAG304 Gal⁺ccDB EGF P ベクター (<https://www.addgene.org/14207/>; Alberti, S., et al., (2007) Yeast. 24(10):913-9) に挿入した。これらの配列において、下線が引かれたイタリック体の大文字は、酵母 Kar2 シグナル配列

MFFNRLSAGKLLVPLSVVLYALFVVILPLQNSFHSSNVLVRG (SEQ ID NO: 4)

をコードし、大文字の配列の残部は、対応するヒト ApoE アイソフォームをコードするヒト ApoE 2、3、または 4 ヌクレオチド配列であり、イタリック体の小文字 (tgccc) は、Gateway クローニングのために使用された ATTB2 組換え配列の一部である)。ApoE アイソフォームをコードする配列内の下線が引かれた太字は、タンパク質の ApoE 部分において 112 位及び 158 位にあるアミノ酸をコードする。

【0266】

ApoE2

ATGTTTTTCAACAGACTAAGCGCTGGCAAGCTGCTGGTACCACTCTCCGTGGTCCTGTACG
CCCTTTTCGTGGTAATATTACCTTTACAGAATTCTTTCCACTCCTCCAATGTTTTAGTTAGAG
GTAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGA
GTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTGCTTTTTGGGATTACCTGCGCT
GGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCACCCAG
GAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTG
GAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGC 10
AGGCGGCGCAGGCCCGGTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG**TGC**GGCCGCCTGGTGCA
GTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGC
CTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCA
GAAG**TGC**CTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGC
GCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTG
TGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCT
GCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAG 20
GAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCTGC
AGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTTCGAGCCCCTGGTGGAAAGACATG
CAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCG
CCCCTGTGCCAGCGACAATCACtccc (SEQ ID NO: 8)

ApoE3

ATGTTTTTCAACAGACTAAGCGCTGGCAAGCTGCTGGTACCACTCTCCGTGGTCCTGTACG
CCCTTTTCGTGGTAATATTACCTTTACAGAATTCTTTCCACTCCTCCAATGTTTTAGTTAGAG
GTAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGA

10

20

30

GTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCT
 GGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCACCCAG
 GAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTG
 GAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGC
 AGGCGGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG**CGC**GGCCGCCTGGTGCA
 GTACCGCGGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGC
 CTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCA
 GAAG**TGC**CTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGC
 GCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTG
 TGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCT
 GCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAG
 GAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCTGC
 AGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCTGGTGGAAAGACATG
 CAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCG
 CCCCTGTGCCAGCGACAATCACtgc (SEQ ID NO: 9)

10

20

ApoE4

ATGTTTTCAACAGACTAAGCGCTGGCAAGCTGCTGGTACCACTCTCCGTGGTCCTGTACG
CCCTTTTCGTGGTAATATTACCTTTACAGAATTCTTTCCACTCCTCCAATGTTTTAGTTAGAG
GTAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGA
 GTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCT
 GGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCACCCAG
 GAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTG
 GAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGC
 AGGCGGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG**CGC**GGCCGCCTGGTGCA
 GTACCGCGGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGC
 CTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCA
 GAAG**CGC**CTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGC
 GCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTG
 TGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCT
 GCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAG
 GAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCTGC
 AGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCTGGTGGAAAGACATG
 CAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCG
 CCCCTGTGCCAGCGACAATCACtgc (SEQ ID NO: 10)

30

40

【 0 2 6 7 】

A p o E 融合ポリペプチドを酵母内で発現させ、酵母細胞生存能力に対するその作用を次のように評定した：酵母細胞を、空ベクター、または A p o E 融合ポリペプチドのうちの 1 つをコードするガラクトース誘導性発現プラスミドのいずれかで形質転換した。形質転換体の段階希釈物を、グルコースまたはガラクトース培地を含むプレート上にスポットィングし、増殖を評定した。A p o E タンパク質の発現（すなわち、ガラクトースプレー

50

ト上で増殖した形質転換体におけるもの)は、酵母細胞に対して毒性であることが分かった(図2(B);各写真中、示されているように、対照ベクターは一番上にあり、実験用発現ベクター(ApoE2、ApoE3、またはApoE4融合ポリペプチドをコードする)は下3つの横列にある。3つ全てのアイソフォームが毒性を誘導したが、その度合いは異なった。各対立遺伝子によって誘導された毒性の度合いは、当該対立遺伝子がヒトにもたらすADリスクの度合いと相関した。E4アイソフォームは、酵母において最も高い毒性を有し、ヒトにおいて最も高いADリスクをもたらす、E3アイソフォームは、酵母において中等量の毒性を示し、ヒトにおいて中等度のADリスクに関連し、E2アイソフォームは、酵母において最小量の毒性を示し、ヒトにおいて最も低いADリスクをもたらす。

10

【0268】

ガラクトースを含有する液体培地中で形質転換体を培養し、OD600を経時的にモニタリングすることによって増殖を評定したとき、同様のパターンが観察された(図2C)。増殖曲線の各々については、菌株を、2%ラフィノースを含有するトリプトファン不含培地中で飽和状態まで振盪しながら、30で一晚増殖させた。次いで、これらの培養物を0.1の光学密度(600nmのOD)まで希釈し、OD(600nm)が約0.4~0.8になるまで7~8時間放置し、増殖させた。次いで、これらの細胞を、2%ガラクトースを含むトリプトファン不含培地中で0.1のODまで希釈して、ApoEの産生を誘導した。その増殖を、最大72時間にわたって15分毎に、時間の関数としてのODを追跡することによって測定した。

20

【0269】

これらの形質転換体は、qPCRによって評定したとき、ApoE2構築物を4コピー、ApoE3構築物を3~4コピー、またはApoE4構築物を3~4コピー保有しており、したがって、毒性レベルの違いは構築物のコピー数の差によるものではなかったことが実証された。

【0270】

それぞれの形質転換体におけるApoEタンパク質のレベルを、ウェスタンブロットによって決定し、次のようにPGK1のレベルと比較した:ウェスタンブロットのために、誘導の24時間後に細胞を採取し、ODによって細胞数を正規化した。TCA沈降プロトコルを使用して、細胞を溶解し、タンパク質を採取した。それらを、4~12%のビストリスSDS-PAGEゲルで、約1時間にわたり150Vで泳動した。このゲルを、Invitrogen Iblot装置を使用してニトロセルロースの0.2um孔径膜上に移した。次いで、このブロットを、5%脱脂乳中で一晚ブロッキングし、5%乳中で抗GFP抗体(1:1000希釈、Roche Diagnosticsカタログ番号11814460001)を用いてプローブし、PBS 1% Tween20で洗浄し、二次抗体抗マウスHRP(SIGMA、1:10000)を使用して再プローブした。このブロットを、SuperSignal Femto基質を使用して現像し、BioRad Gel-Docデバイスを使用して撮影した。ローディング対照は、抗ウサギPGK1抗体(1:1000)及び抗ウサギHRP二次抗体(1:10000)を使用して行った。

30

40

【0271】

上述のように、Kar2ss-ApoE2-EGFP、Kar2ss-ApoE3-EGFP、またはKar2ss-ApoE4-EGFP(図2A参照)の4つの遺伝子コピーを有する細胞を、ガラクトースを含有する液体培地中で培養し、OD600を経時的にモニタリングすることによって増殖を評定した(図3A)。図3Bは、これらの菌株において発現したApoEアイソフォームのタンパク質レベルをローディング対照(PGK1)と比較して評定するために、抗GFP一次抗体を使用したウェスタンブロットの結果を示す。

【0272】

上述の結果がポリペプチドのEGFPではなくApoE部分に起因したことを確認する

50

ため、上述の構築物と同様であるが融合ポリペプチドのEGFP部分を欠いた構築物を生成し、酵母に形質転換した。これらの実験は、2ミクロン発現プラスミド内のApoE構築物を用いて行った。上述のように、形質転換体の段階希釈物を、グルコースまたはガラクトース培地を含むプレート上にスポッティングし、増殖を評定した。その結果は、上述の結果と同様であり、EGFPの存在は観察される表現型に影響しないことが確認された(図4)。

【0273】

実施例2：中レベルまたは高レベルの毒性を有するApoE発現菌株の生成

ApoE2、ApoE3、またはApoE4融合ポリペプチドをコードする発現構築物を様々なコピー数保有するさらなる酵母菌株を生成した。中レベルの毒性を示す菌株(「中等度毒性」菌株と称される)または高レベルの毒性を示す菌株(「高毒性」菌株と称される)を、各アイソフォームについて単離した。上述のように、ガラクトースを含有する液体培地中の様々な菌株の増殖を、OD600を経時的にモニタリングすることによって評定した(図5A)。上述のように、PGK発現に対する、各菌株におけるそれぞれのApoEタンパク質の発現レベルを、ウェスタンブロットによって判定した(図5B)。

10

【0274】

様々な中等度毒性及び高毒性菌株における関連性のあるコード配列のコピー数を、qPCRを使用して決定した。結果を表4に提示する。

【0275】

(表4) 中等度毒性及び高毒性菌株におけるApoEをコードする構築物のコピー数

20

菌株	コピー数
ApoE2 中等度毒性	4
ApoE3 中等度毒性	3-4
ApoE4 中等度毒性	2
ApoE2 高毒性	約13 (2つの部位において組み込まれている)
ApoE3 高毒性	7
ApoE4 高毒性	3-4

30

【0276】

実施例3：R61T突然変異はApoE3様表現型を回復する

2ミクロン発現プラスミド内のGAL1プロモーターの制御下の発現を有する、R61T突然変異を保有するKar2ss-ApoE-eGFP融合タンパク質をコードする酵母発現構築物を生成した。上述のように、R61T突然変異は、ApoE4の構造をApoE3の構造のようにする。発現構築物のKar2ss-ApoE-eGFP配列は、R61T突然変異の存在を除いては上述のものと同であった。R61T突然変異を保有するApoE融合ポリペプチドをコードする構築物を、2ミクロン発現プラスミド内で酵母に導入し、各タンパク質の酵母細胞生存能力に対する作用を、形質転換体の段階希釈物をガラクトース含有培地上にスポッティングして融合ポリペプチドの発現を誘導することによって評定した(図7)。ApoE4 R61T融合ポリペプチドは、ApoE3融合ポリペプチドによって示される毒性に酷似した、ApoE4野生型融合ポリペプチドと比較して低減した毒性を示した。これらの結果は、酵母モデル系においてApoEによって誘導される毒性の根底にある機序が、ApoEがヒトにおいてその効果を発揮する機序に直接関連していることをさらに裏付ける。

40

【0277】

実施例4：ApoE毒性の修飾遺伝子についてのスクリーニング

ApoE毒性の修飾遺伝子を同定するためにスクリーニングを行った。このスクリーニングは、プール形式で行った。上述の高毒性菌株(ApoE2高毒性、ApoE3高毒性

50

、及びApoE4高毒性)ならびにeGFP発現対照菌株の各々を、FLEXGENEライブラリ(Hu, Y., et al. (2007) Genome Res. 17: 536-43)における約5700個のプラスミドのプールライブラリを用いて形質転換した(各々がその酵母ゲノムにおいて1つのGAL誘導性ORFにより形質転換された)。各菌株(各々が概ね1つのプラスミドを保有する)から得られたクローンを採取してプールし、(毒性タンパク質ApoEまたは対照GFPが目的のORFと共に発現されるように)ガラクトースを用いた誘導下で増殖させた。同時に、ライブラリ適用範囲の知るために、これらの菌株の別のアリコートでグルコース含有培地中で増殖させた。プラスミドを抽出し、PCRを使用してORFを増幅させた。DNAを超音波処理し、遺伝子の配列を決定した。ヒットは、それらの効果サイズに基づいて(ApoE対GFP対照とグルコース対ガラクトースとの両方を比較して)閾値決定した(thresholded)。

10

【0278】

ヒットの多くについて、FLEXGENEライブラリ(非プール)からの個別のプラスミドを、ApoE2、ApoE3、またはApoE4を発現する酵母菌株に個別に形質転換し、ガラクトース培地中の(すなわち、プラスミド内のApoEとORFとの両方の発現が誘導される条件下にての)それらの増殖を追跡することによって、再試験した。各菌株において増殖を空ベクターと比べて増強または抑制したヒットを同定した。この検証に使用したApoE2菌株は、ApoE2をコードする発現構築物を約11~15コピー含有していた。検証に使用したApoE3菌株は、ApoE3をコードする発現構築物を7コピー含有していた。検証に使用したApoE4菌株は、ApoE4をコードする発現構築物を4コピー含有していた。

20

【0279】

表1Aは、ヒットが初めに同定されたスクリーニングに使用した菌株と同じApoEアイソフォームを発現する検証用菌株においてApoE毒性の抑制因子または増強因子として認証されたこれらのヒットを列記している。こうしたヒットのうちいくつかは、他のアイソフォームを発現する検証用菌株のいずれかまたは両方におけるApoE毒性も調節した。表1Bは、ヒットが初めに同定されたスクリーニングに使用した菌株によって発現されるものとは異なるApoEアイソフォームを発現する1つ(または2つ)の検証用菌株においてApoE毒性を調節するものとして認証されたこれらのヒットを列記している。表2A、2B、及び2Cは、よりストリンジентなカットオフ基準を使用して、少なくとも1つのApoEアイソフォームの抑制因子または増強因子として同定された、同じスクリーニングからのヒットを列記している。各菌株の増殖に対する各酵母遺伝子の作用は、各表(効果サイズを示す縦列)に示されている。数字は、対照菌株(同じ菌株だが酵母遺伝子が挿入されていないベクターで形質転換されているもの)と比較した、示されている酵母遺伝子が発現する菌株の相対的な増殖を表す。したがって、1.0超の数字は、その遺伝子が過剰発現されるとApoE媒介性毒性が抑制されたことを示す。1.0未満の数字は、その遺伝子が過剰発現されるとApoE媒介性毒性が増強されたことを示す。表1A及び1B中、毒性の抑制因子は「S」の文字で示され、毒性の増強因子は「E」の文字で示されている。この値が0.5以下または1.5以上である遺伝子は特に大きな効果を有した。

30

40

【0280】

表2A、2B、及び2Cは、ApoE誘導性毒性の酵母抑制因子及び増強因子のうちの特定のもののヒト相同体を列記している。アルツハイマー病の既知の遺伝的危険因子であるヒト相同体は、別個の縦列に列記されている。ヒト相同体は、配列及び構造に基づく相同性検索ツールを使用して同定された。AD危険因子である相同体のうちの特定のものの同定においては、この配列及び構造に基づく基準に加えて、同様の配列の長さならびに文献データに基づくさらなる基準を考慮した。

【0281】

実施例5: ApoE媒介性毒性を調節する能力についての化合物の試験

Kar2ss-ApoE4-eGFPをコードする構築物を保有するApoE4発現酵

50

母細胞をスクリーニングアッセイに使用して、治療候補化合物のスクリーニングにおける組換え細胞の有用性を評価した。ApoE4構築物を3~4コピー保有し、薬物ポンプ転写因子PDR1及びPDR3が欠失したApoE4高毒性菌株を、この実験に使用した。細胞をラフィノース中で増殖させ、細胞を(発現構築物の発現を開始させるために)ガラクトース培地中に希釈した。被験化合物を0.25µM~32.0µMの範囲の様々な濃度で培養物に添加し、この化合物の添加後、細胞を24時間増殖させ、次いで光学密度をA600で読み取った。被験化合物は、アルツハイマー病の治療のための既知の候補化合物であるクリオキノール、ならびに、酵母及び哺乳動物の神経細胞を含む多様な細胞型を - シヌクレイン毒性から選択的に保護する小分子であるNAB2 (Tardiff, DL, et al., Science (2013); 342(6161): 979-83) 10
であった。クリオキノール自体が高濃度で酵母に対して毒性になることが、他の実験から知られている。結果(図10)は、約1.5µM未満の濃度でクリオキノールは酵母モデル系におけるApoE4媒介性毒性を低減させることができたが、NAB2にはそれができなかったことを実証した。これらの結果は、ApoE誘導性細胞毒性のモデル系として酵母が使用可能であること、及びこの毒性を軽減する治療候補化合物が特定可能であることを裏付ける。

【0282】

実施例6: ApoEを発現する酵母細胞はエンドサイトーシスの欠陥を示す

S.セレピシエのMUP1は、通常の条件下では細胞膜において発現され、メチオニンの存在下でエンドサイトーシスを受ける、高親和性メチオニンパーミアーズである。MUP1局在化は、エンドサイトーシスのマーカーとして使用することができる。MUP1局在化に基づくエンドサイトーシスアッセイを行って、酵母におけるエンドサイトーシスに対するApoEの作用を評価した。 20

【0283】

上述のApoE高毒性菌株(ApoE2高毒性、ApoE3高毒性、及びApoE4高毒性)ならびにeGFP発現対照菌株の各々を、MUP1レポーター構築物(蛍光タンパク質mKate2に融合しているMUP1を含有する融合タンパク質の発現を駆動するS.セレピシエメチオニンパーミアーズMUP1のプロモーターを含有する発現構築物)を用いて形質転換した。加えて、さらなるヒト神経変性疾患関連タンパク質である - シヌクレインをコードする発現構築物を保有する酵母菌株(-syn中等度毒性、-syn高毒性菌株)またはA をコードする発現構築物を保有する酵母菌株(Treusch, S., et al., Science. (2011), 334: 1241-5に記載されているKar2ss-A 菌株)を、MUP1レポーター構築物で形質転換した。(図11(A))。 30

【0284】

各菌株の細胞を、ガラクトースを含有し、かつ標準レベルのメチオニンを含有するか、またはメチオニンを欠いているかのいずれかの培地中で、6時間(ヒト神経変性疾患タンパク質の発現を誘導するために)培養した。次いで細胞を蛍光顕微鏡法によって検査した。ヒト神経変性疾患関連タンパク質を発現する酵母菌株は、GFPのみの対照と比較して(特にApoE菌株及び - syn菌株において)重度に攪乱されたエンドサイトーシスを示した(図11(B)、上パネル)。 40

【0285】

ApoE4、A、及び - シヌクレインは、MUP1のエンドソーム輸送の妨害において明確に異なる表現型をもたらす(図11(C))。ApoE4「高毒性」、Aスクリーニング菌株2.8(ADE2+)、及び - シヌクレイン「中等度毒性」菌株を、図11(C)に示されている画像を得る前に8時間にわたって、上述のApoE4、A、または - シヌクレイン構築物を発現するように誘導した。理論に束縛されることを望むものではないが、これらのタンパク質によって引き起こされるエンドソーム輸送欠陥の性質は明確に異なる場合がある。

【0286】

10

20

30

40

50

実施例 7 : A p o E 毒性の修飾遺伝子スクリーニングからのトップヒットの再検証

実施例 4 に記載されている A p o E 毒性についての修飾遺伝子スクリーニングからのトップヒットのうちおよそ 5 0 0 個の再検証を行った (図 1 2) 。これらのヒットは、濃縮 / 欠乏カットオフの 3 シグマ倍率変化を使用して選択した。これらのヒットを、上述の F L E X G E N E ライブラリ動原体プラスミドを使用した 3 8 4 ウェルプレート形式の増殖アッセイを使用して再検証した。これらをまた、 β -シヌクレイン及びアミロイド β 発現酵母モデルにおいて交差検証した。

【 0 2 8 7 】

表 3 は、A p o E 4 媒介性毒性の増強因子及び抑制因子に関する再検証されたヒットの概要を示す。図 1 2 には、各 A p o E アイソフォームについて再検証されたヒットの数、ならびに交差試験実験において観察されたレスキューの重複を要約するベン図が含まれる。理論に束縛されることを望むものではないが、A p o E 4 スクリーニングにおける再検証されたヒット間の重複の欠如は、毒性の差に起因するものであり得る。

10

【 0 2 8 8 】

再検証分析によって確認されたヒットは、小胞輸送 (例えば、A T G 2 0、U B P 3、T R S 6 5、B R E 5、M U K 1、及び G Y P 5)、エンドサイトーシス (例えば、R V S 1 6 1、O S H 2、R V S 1 6 7、Y A P 1 8 0 2、及び O S H 3)、ユビキチン化 / 脱ユビキチン化 (例えば、A P C 1 1、U B P 3、U B P 7、C D C 7 3、B R E 5、及び R R I 2)、脂質代謝 (例えば、P E R 1、M D H 3、G P I 8、S M P 3、及び S U R 1)、DNA 修復 (例えば、M G T 1、P C D 1、C D C 7 3、及び R A D 1 4)、ならびにミトコンドリア機構 (例えば、A T G 2 0、M H R 1、M R P 4、R R M 3、I L M 1、M S T 1、Y T A 1 2、P O R 1、及び M R P L 1 0) を含む、いくつかの生物学的経路における A p o E 媒介性攪乱を示唆した。

20

【 0 2 8 9 】

実施例 8 : A p o E 媒介性毒性を調節する化合物の化学的スクリーニング

神経変性疾患に関連するタンパク質の発現に関連する毒性を抑制する化合物を同定するために、M o l e c u l a r L i b r a r i e s P r o b e P r o d u c t i o n C e n t e r s N e t w o r k (M L P C N) ライブラリ (N I H - N C A T S プログラム) を、 β -シヌクレインの酵母モデル (T R P 及び U R A 遺伝子座に β -シヌクレインのコピーが組み込まれており、転写因子 P D R 1 及び P D R 3 が欠失している、「高毒性」菌株) ならびに T D P - 4 3 の酵母モデル (T a r d i f f e t a l . J . B i o l . C h e m . 2 8 7 : 4 1 0 7 - 4 1 2 0 , 2 0 1 2 に記載されている T D P - 4 3 モデル) の毒性をレスキューする化合物について、7 つの用量でスクリーニングした。これらのアッセイは、B A C T I T E R - G L O (商標) 発光を増殖の代理として使用し、1 5 3 6 ウェルプレートにて行った。これら 2 つのスクリーニングから、 β -シヌクレインモデル、T D P - 4 3 モデル、またはその両方に対してレスキュー活性を示した 1 6 4 種の化合物を選択し、さらなる分析のために得た。

30

【 0 2 9 0 】

これらの化合物について、 β -シヌクレイン酵母モデル及び T D P - 4 3 酵母モデルに対する再スクリーニングを実施し、当該化合物の活性を 3 8 4 ウェルプレートにて増殖測定用に 6 0 0 n m の光学密度で検証した。また、これらの化合物について、A p o E 4 を発現する酵母細胞、アミロイド β (1 - 4 2) を発現する酵母細胞、及び F U S タンパク質を発現する酵母細胞を含む、他の酵母モデル系に対する交差スクリーニングも実施した。当該 A p o E 4 細胞は、転写因子 P D R 1 及び P D R 3 をコードする遺伝子が欠失している、実施例 5 に記載されている高毒性菌株であった。当該アミロイド β (1 - 4 2) 細胞は、K e n t e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1 1 : 4 0 1 3 - 4 0 1 8 , 2 0 1 4 に記載されたものであった。これらの交差スクリーニングは、細胞からの薬物排出を最小限に抑えるために、2 つの転写因子 P D R 1 及び P D R 3 が欠失している菌株を使用して実施した。この例示的な分析の目的では、細胞の増殖を、未処理の細胞の増殖の 1 . 1 5 倍に上昇させた化合物を、「レスキュー」化合物と見

40

50

なした。

【0291】

これらのスクリーニングから、化合物の49% (80) が -シヌクレイン酵母モデルをレスキューし、試験した化合物の21% (35) がTDP-43酵母モデルをレスキューし、57% (94) がApoE4酵母モデルをレスキューし、18% (29) がFUSタンパク質酵母モデル (J. et al., PLoS Biology 9(4): e1001052 に記載されている通りだがPDR1及びPDR3をコードする遺伝子が欠失しているもの) をレスキューし、33% (54) がアミロイド-酵母モデルをレスキューした。

【0292】

3種の化合物が、試験した5つ全ての酵母モデルをレスキューした。19種の化合物が、FUSタンパク質モデルとApoE4酵母モデルの両方をレスキューした。18種の化合物が、TDP-43酵母モデルとApoE4酵母モデルの両方をレスキューした。43種の化合物が、アミロイド-酵母モデルとApoE4酵母モデルの両方をレスキューした。同じ43種の化合物は、-シヌクレイン酵母モデルとApoE4酵母モデルの両方もレスキューした。26種の化合物は、ApoE4酵母モデルを明確にレスキューし、試験した他のモデルはレスキューしなかった。

10

【0293】

前述の結果はさらに、本明細書に記載されているApoE誘導性細胞毒性の酵母モデル系が、ApoE媒介性毒性を軽減する治療候補化合物 (これは、アルツハイマー病を含むApoE関連疾患の治療のための治療候補化合物でもあり得る) の同定のための確固たるスクリーニングプラットフォームであることを実証している。

20

【0294】

実施例9：ApoEを発現する酵母細胞はSte3エンドサイトーシスの欠陥を示す

Ste3-mKate2アッセイを使用して、酵母におけるエンドサイトーシスに対するApoEの作用をさらに分析した。Ste3は、細胞表面から液胞へのエンドサイトーシスを自然に受ける酵母Gタンパク質共役受容体(GPCR)である。クラスリン媒介性エンドサイトーシスが妨害されると、Ste3輸送もまた妨害され得る。

【0295】

pAG423ガラクトース誘導性プラスミドから蛍光タグ(mKate2)付きのSte3を過剰発現させることによって、蛍光顕微鏡法を使用してSte3の輸送を観察した。上述のApoE4高毒性菌株を、pAG423-Ste3-mKate2プラスミドで形質転換した。加えて、実施例4に記載されている、ヒト神経変性疾患関連タンパク質である-シヌクレインをコードする発現構築物を保有する酵母菌株(-syn中等度毒性)またはAをコードする発現構築物を保有する酵母菌株(Treusch, S., et al., Science. (2011), 334: 1241-5に記載されているKar2ss-A菌株)も、pAG423-Ste3-mKate2プラスミドで形質転換した。Gal-GFPプラスミドで形質転換した菌株は、陰性対照として機能した。ガラクトースを用いた6~8時間の誘導の後、ApoE4の産生は、液胞へのSte3エンドサイトーシスの重度の妨害をもたらした。(図13)。-シヌクレイン及びAの発現もまた、Ste3エンドサイトーシスの妨害をもたらした(図13)。

30

40

【0296】

実施例10：治療標的候補であるApoE結合パートナーの同定

ApoE結合パートナーの同定は、相互作用、及び潜在的な治療標的として機能する相互作用タンパク質を明らかにし得る。ApoEタンパク質を発現する細胞は、ApoEタンパク質の単離または精製、続いてApoEタンパク質と同時に精製される結合パートナーの同定によって分析される。

【0297】

例えば、N末端もしくはC末端にTAPタグ(タンデムアフィニティー精製タグ)またはGFPタグが付いたApoEアイソフォームをコードする発現構築物を保有する酵母菌

50

株を生成する。TAPタグは、TEVプロテアーゼ切断部位によって分離されるS.アウレウス (*S. aureus*) のプロテインA及びカルモジュリン結合ペプチド (CBP) の2つのIgG結合ドメインを含む (例えば、Puig et al. Methods 24:218-229, 2001を参照されたい)。例えば、ガラクトース誘導性GAL1-10プロモーターの制御下で、Kar2ss-ApoE2-TAP、Kar2ss-ApoE3-TAP、またはKar2ss-ApoE4-TAPのいずれかをコードする組込み型発現構築物を保有する酵母菌株を、本明細書に記載されている方法を使用して生成する。これらの酵母菌株は、異なるApoEアイソフォームを複数の菌株にわたって均等なレベルで発現するために、異なるコピー数の発現構築物を保有する。細胞がApoEアイソフォームを均等なレベルで発現することを確実にする別の手法は、ガラクトース誘導性プロモーターなどの誘導性プロモーターのタイトレーションである。タグ付きApoEを欠いている対照菌株も生成される。抗TAPタグ抗体 (例えば、抗TAPタグ抗体 [22F12-1E3]、Abcam) を用いて行われるウェスタンブロットは、菌株が均等なレベルの異なるApoEアイソフォームを発現することを確認するために使用される。中レベルの毒性を有する細胞 (例えば、中等度毒性菌株) は、結合パートナーの同定に適合性がある。一部の例では、誘導の長さは、十分なタンパク質の発現と毒性とを均衡させるように変更 (例えば、短縮) してもよい。

【0298】

TAPタグ付きApoEアイソフォームを発現する酵母菌株または対照細胞を、並行して、例えば、2リットルの培養液中で早期対数期まで増殖させ、増殖培地へのガラクトースの添加によってApoEアイソフォーム融合タンパク質の産生を誘導する。誘導時間は、過度の毒性をもたらすことなく十分なApoEタンパク質を産生するために変更してもよい。これらの培養物を、溶解用に細胞をペレット化するために遠心処理する。

【0299】

次に、酵母細胞を並行して溶解して、例えば、Puig et al. (上記) に記載されている抽出物を調製する。手短に述べると、ペレットを水で1回洗浄し、50mlのポリプロピレン管において再度ペレット化する。このペレットを液体窒素で凍結させる。溶解物を調製するため、血中血球容積 (packed cell volume) が1の緩衝液A (10mM HEPES (pH7.0)、10mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.5mMジチオトレイトール (DTT)、及びプロテアーゼ阻害因子) を、解凍し4に保ったペレットに添加する。細胞を8.27MPaの圧力でフレンチプレス (Sim-Aminco) に3回通すことによって、細胞を溶解する。2M KClの添加によってKClを0.2Mに調整する。典型的にはこの溶解物を遠心処理して、デブリを除去して抽出物を得る。他の酵母溶解方法、例えば、ビーズ叩解、アルカリ溶解、酵素溶解 (例えば、ザイモリナーゼを用いるもの)、または液体窒素で冷やした乳鉢及び乳棒を用いた凍結酵母の粉碎を用いてもよい。

【0300】

タンデムアフィニティー精製は、例えば、Puig et al. (上記) に記載されているように、ApoE含有タンパク質複合体を単離する (またはそれを濃縮する) ために行われる。手短に述べると、IgG SEPHAROSE (商標) ビーズをカラムに加え、IPP150緩衝液 (10mMトリスHCl (pH8.0)、150mM NaCl、0.1% Nonidet P-40) で洗浄し、このビーズに抽出物を加え、4でインキュベートする。重力流により溶出を行い、ビーズをIPP150緩衝液で3回、そしてTEV切断緩衝液 (0.1mM EDTA及び1mM DTTに調整したIPP150) で1回洗浄する。TEV切断緩衝液及びTEVプロテアーゼ (Gibco) を添加することによって、同じカラム内で切断を行う。このビーズを16で2時間回転させ、その溶出液を重力流によって回収する。次に、カルモジュリンビーズ (Stratagene) を含むカラムにこの溶出液を加え、10mlのIPP150カルモジュリン結合緩衝液 (10mMのトリス-HCl (pH8)、10mMのβ-メルカプトエタノール、150mMのNaCl、1mMの酢酸マグネシウム、1mMのイミダゾール、2mMのCaC

10

20

30

40

50

1₂、及び0.1%のNP-40)で洗浄する。次に、このビーズをIPP150カルモジュリン結合緩衝液で1回洗浄し、結合タンパク質をカラムから溶出させる。

【0301】

次に、質量分析(MS)によって、例えば、Gavin et al. Nature 415:141-147, 2002に記載されているように、種々のApoEアイソフォームの結合パートナーを同定する。TAP精製からの溶出物を濃縮し、SDS-pageによって分離し、クマシーブルー染色または銀染色を実施する。バンドを切り取り、トリプシンで消化し、MALDI-TOF MSに供してもよい。ApoE結合パートナーを自動ペプチド質量フィンガープリンティングによって同定し、酵母タンパク質の配列データベース(例えば、Saccharomyces Genome Database (SGD)、yeastgenome.org)と比較してもよい。あるいは、データベース検索と自動LC/MS/MSの組み合わせによってApoE結合パートナーを同定してもよい。ApoE2、ApoE3、及びApoE4と相互作用するタンパク質は、複数のアイソフォームと相互作用する結合パートナー、ならびに特定のアイソフォームと相互作用する結合パートナーを決定するために比較され得る。

10

【0302】

前述の手法によって同定された結合パートナーがApoEに特異的に結合することを確認するために、異なるアフィニティタグ(例えば、GFP)を使用する任意の並行スクリーニングが行われる。この分析のために、例えば、本明細書に記載されている中等度毒性ApoE-GFP酵母菌株を使用するかまたは適合させてもよい。質量分析の前にApoE含有タンパク質複合体を免疫沈降するために抗GFP抗体が使用されることを除いて、同様の手法が使用される。

20

【0303】

ApoE結合パートナーのヒト相同体は、本明細書に記載されているように、例えば、Homologene、BioMart-Ensembl、BLAST検索、構造的相同性を使用して、かつ/または相同性機能に基づいて、同定される。後続の研究には、高スループットランダム変異誘発手法、例えば、結合パートナータンパク質における、ApoEと結合パートナータンパク質の相互作用を媒介する領域をプローブするためのバリオミクス(variomics)ライブラリ(例えば、Huang et al. Cell Rep. 3(2):577-585, 2013)の使用が含まれ得る。

30

【0304】

例えば、本実施例に記載されている例示的な非限定的手法を使用して、ApoE結合パートナーを同定すると、ApoE関連疾患の治療のための治療標的候補が同定される。

【0305】

実施例11: ApoEタンパク質と相互作用する脂質の分析

ApoEタンパク質と相互作用する脂質の分析を行う。細胞、例えば、酵母細胞から(例えば、アフィニティ精製または免疫沈降によって)ApoEアイソフォームを単離し、相互作用している脂質を質量分析によって同定する。

【0306】

例えば、N末端もしくはC末端にTAPタグ(タンデムアフィニティ精製タグ)またはGFPタグが付いているApoEアイソフォームをコードする発現構築物を保有する酵母菌株を、例えば、実施例10に記載されているように生成する。ApoEアイソフォームを、例えば、実施例10に記載されているように、酵母内で発現させ、精製する。あるいは、タグ無しApoEアイソフォームを本明細書に記載されている酵母において発現させ、適切な抗ApoE抗体を使用して免疫沈降してもよい。

40

【0307】

精製されたApoEアイソフォームと相互作用している脂質を、質量分析によって同定する。ApoEタンパク質と相互作用する脂質の同定には、任意の好適な手法が使用される。例えば、液体クロマトグラフィMS(LC/MS)、多次元質量分析に基づくショットガンリピドミクス(MDMS-SL)、MALDIに基づく質量分析、ガスクロマトグ

50

ラフィ - MS (GC OMS)、及び/またはエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI - MS) を行って、ApoE2、ApoE3、及び/またはApoE4と相互作用する脂質を同定する。

【0308】

各ApoEアイソフォームと相互作用する脂質を比較して、複数のアイソフォームと相互作用する脂質、ならびに特定のApoEアイソフォームと特異的に相互作用する脂質を同定する。同定された脂質は、ApoE関連疾患の治療のための治療標的候補を示し得る。

【0309】

実施例12：ApoEタンパク質を発現する細胞のリピドミック解析及びメタボロミック解析

ApoEタンパク質を発現する細胞を、リピドミック解析及びメタボロミック解析を使用して分析し、ApoE発現によって攪乱される生物学的経路、ならびにApoE関連疾患を含む神経変性疾患の治療のための治療標的候補を同定する。

【0310】

例えば、ApoEアイソフォームを発現する酵母細胞（例えば、実施例2に記載されている中等度毒性ならびに/または高毒性のApoE2、ApoE3、及びApoE4菌株）を網羅的リピドミック解析に供して、細胞脂質含有量に対するApoEの発現の作用を決定する。脂質組成は、任意の好適な手法によって測定される。例えば、ショットガンリピドミクスを、Guan et al. Methods in Enzymology 470:369-391, 2010、Tarasov et al. Mol. Biosyst. 10:1364-1376, 2014、またはda Silveira dos Santos et al. Mol. Biol. Cell. 25(20)3234-3246, 2014に記載されている手法と同様の手法を使用して行ってもよい。

【0311】

種々のApoEアイソフォームをコードする発現構築物を保有する酵母菌株を、適切な期間にわたってApoEを発現するように誘導する。一部の事例では、試料を異なる時点で採取して、脂質組成に対するApoEアイソフォーム発現の経時的な作用を決定する。ApoE発現酵母を採取し、例えば、ピーズ叩解、続いて脂質抽出（例えば、クロロホルム/メタノールの抽出溶媒、またはエタノール、水、ジエチルエーテル、ピリジン、及び4.2N水酸化アンモニウム[15:15:5:1:0.018, vol/vol]の抽出溶媒を使用する）によって溶解する。有機相を収集し、真空蒸発に供する。次いでこの脂質を、質量分析によって分析する。任意の好適な質量分析法、例えば、ESI-MS、MALDI-MS、大気圧化学イオン化 (APCI) 質量分析、及びガスクロマトグラフィ - 質量分析 (GC-MS) が使用される。グリセロリン脂質及びスフィンゴ脂質は、例えば、ESI-MSまたは高解像度質量分析によって分析及び数量化され得る。ステロールは、例えば、GC-MSを使用して分析及び数量化され得る。全体的な脂質組成に対する各ApoEアイソフォームの作用を決定して、ApoEタンパク質発現によって攪乱される生物学的経路を同定する。脂質組成の変化もまた、ApoE関連疾患を含む神経変性疾患の治療のための治療標的候補を示し得る。

【0312】

別の例において、ApoEアイソフォームを発現する酵母細胞（例えば、実施例2に記載されている中等度毒性ならびに/または高毒性のApoE2、ApoE3、及びApoE4菌株）を網羅的メタボロミック解析に供して、代謝物に対するApoEの発現の作用を決定する。種々のApoEアイソフォームをコードする発現構築物を保有する酵母菌株を、適切な期間にわたってApoEを発現するように誘導する。一部の事例では、試料を異なる時点で採取して、代謝物組成に対するApoEアイソフォーム発現の経時的な作用を決定する。代謝物組成は、任意の好適な手法によって測定される。細胞外代謝物と細胞内代謝物の両方がアッセイされ得る。

【0313】

10

20

30

40

50

LC - MSを行って、種々のApoEアイソフォームを発現する酵母細胞から得られる試料中の代謝物の濃度を決定する。LC - MSは、Zhou et al. Mol. Biosyst. 8 (2) : 470 - 481, 2012、Theodoridis et al. Anal. Chim. Acta. 711 : 7 - 16, 2012、またはGika et al. J. Pharm. Biomed. Anal. 87 : 12 - 25, 2014に記載されているように実施される。代謝物組成の変化は、ApoEタンパク質発現によって攪乱される生物学的経路を同定し得る。代謝物濃度の変化もまた、ApoE関連疾患を含む神経変性疾患の治療のための治療標的候補を示し得る。

【0314】

様々な実施形態

本発明がその詳細な説明と併せて説明されてきたが、前記説明は例示を意図し、本発明の範囲を限定することを意図するものではないことを理解されたい。一群の1つ以上の構成要素間に「または」を含む特許請求の範囲または前記説明は、別段の指示がある場合または文脈から明白である場合を除き、その群の構成要素のうち1つ、2つ以上、または全てが所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、または別様に関連性がある場合に満たされると見なされることも理解されたい。本発明には、厳密に1つの群構成要素が所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、または別様に関連性がある実施形態が含まれる。本発明には、群構成要素のうち2つ以上もしくは全てが所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、または別様に関連性がある実施形態も含まれる。さらに、別段の記載がある場合または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者にとって明らかである場合を除き、本発明には、列記されている請求項のうち1つ以上における1つ以上の制約、要素、条項、記述用語などが、同じ基本請求項（または関連する任意の他の請求項）に従属する別の請求項に導入されている全ての実施形態が包含され、かかる実施形態が、提出される本出願の追加項目を構成することも、その内容の範囲を超えることもないことを理解されたい。要素が一覧として提示される場合、その要素の各部分群も開示されること、また、任意の1つ以上の要素がその群から除外され得ること、また、かかる部分群または結果として得られる一覧が本明細書に明示的に開示され、提出される本出願の追加項目を構成することも、その内容の範囲を超えることもないことを理解されたい。概して、本発明、または本発明の態様が、特定の要素、特徴などを含むものと称される場合、本発明のある特定の実施形態または本発明の態様は、かかる要素、特徴などからなるか、またはそれらから本質的になるものと理解されるべきである。本発明の任意の実施形態が、特許請求の範囲から明示的に除外されることも理解されるべきである。

【0315】

特許請求の範囲または前記説明が生成物（例えば、物質の組成物）に関する場合、本明細書に開示される方法のうちいずれかに従った該生成物の作製方法または使用方法、及び本明細書に開示される目的のいずれか1つ以上のために該生成物を使用する方法が、別段の記載がある場合または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者にとって明らかである場合を除き、該当する場合は本開示に包含されることが理解されるべきである。特許請求の範囲または前記説明が方法に関する場合、その方法の1つ以上の工程を行うために有用な生成物、例えば、物質の組成物、デバイス、またはシステムが、別段の記載がある場合または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者にとって明らかである場合を除き、該当する場合は本開示に包含されることが理解されるべきである。

【0316】

本明細書において範囲が与えられる場合、エンドポイントが含まれる実施形態、両方のエンドポイントが除外される実施形態、及び一方のエンドポイントが含まれ、他方が除外される実施形態が提供される。別段の記載がない限り、両方のエンドポイントが含まれると見なされるべきである。さらに、別段の記載がある場合または文脈及び当業者の理解から明白である場合を除き、範囲として表わされる値は、本発明の異なる実施形態では、文脈による明確な別段の規定がない限り、その範囲の下限の単位の10分の1まで、記載さ

10

20

30

40

50

れた範囲内のいかなる特定の値または部分的範囲をとることもできると理解されるべきである。一連の数値が本明細書に記載されている場合、その一連における任意の介在値、または任意の2つの値によって定義される範囲に類似して関連する実施形態が提供されること、及び最も低い値が最小値と見なされ得、最も大きい値が最大値と見なされ得ることも理解される。本明細書において、「少なくとも」、「最大」、「以下」などの表現、または同様の表現が、一連の数字に先行する場合、その表現は、文脈による明確な別段の規定がない限り、様々な実施形態において一覧内の各数字に適用されることを理解されたい（ただし、文脈に応じて、ある値、例えば、百分率として表される値の100%は、上限であり得ると理解されるものとする）。例えば、「少なくとも1、2、または3」は、様々な実施形態において「少なくとも1、少なくとも2、または少なくとも3」を意味すると理解されるべきである。該当する場合、ありとあらゆる合理的な下限及び上限が明示的に想定されることも理解されよう。合理的な下限または上限は、当業者により、例えば便宜、コスト、時間、労力、（例えば、試料、薬剤、または試薬の）利用能、統計的考慮事項などの要因に基づいて、選択または決定され得る。いくつかの実施形態では、上限または下限は、特定の値と2倍、3倍、5倍、または10倍異なる。本明細書で使用される数値は、百分率として表される値を含む。数値の前に「約」または「およそ」が置かれる各実施形態については、その厳密値が記載される実施形態が提供される。数値の前に「約」または「およそ」が置かれない各実施形態については、その数値の前に「約」または「およそ」が置かれる実施形態が提供される。

10

【0317】

20

本明細書で使用される節の見出しは、いかようにも限定するものと解釈されるべきではない。いかなる節の見出しの下に提示される主題も、本明細書に記載されているいずれの態様または実施形態に適用可能であり得ることが明示的に想定される。本明細書における実施形態または態様は、本明細書に記載されているいかなる薬剤、組成物、物品、キット、及び/または方法をも対象とし得る。適切であればいつでも、いずれか1つ以上の実施形態または態様が、いずれか1つ以上の他の実施形態または態様と自由に組み合わせ可能であることが想定される。

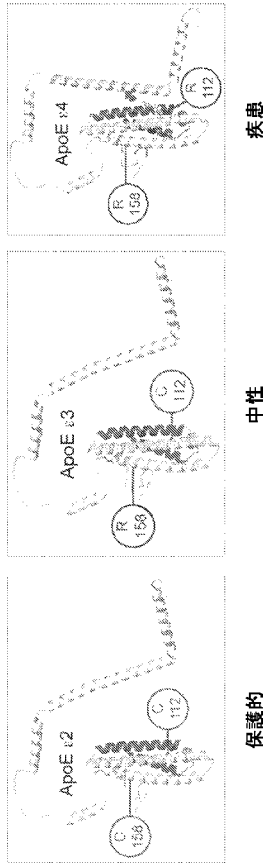
【0318】

本発明の他の態様、利点、及び改変形態は、以下に記載されている特許請求の範囲内に含まれる。

30

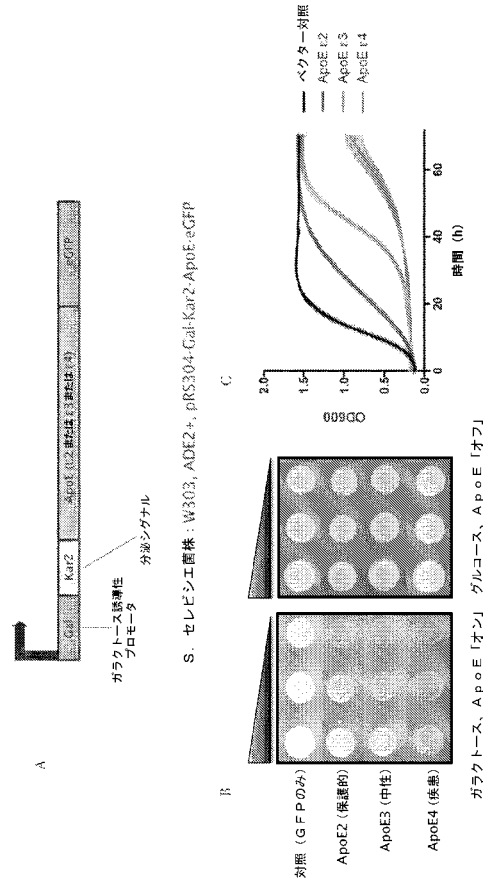
ApoEには、2つのアミノ酸位置に違いがある
3つのアイソフォームがある

【図1】

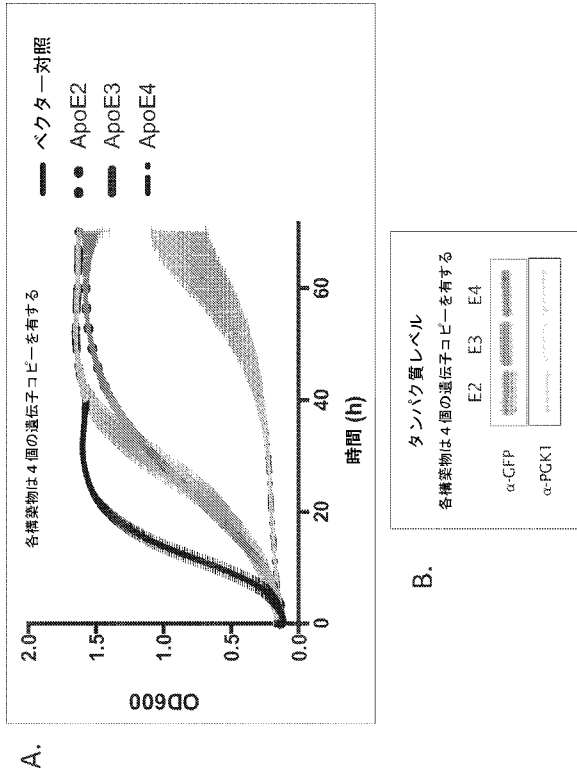


出芽酵母はApoEアイソフォーム特異的な
毒性表現型を示す

【図2】

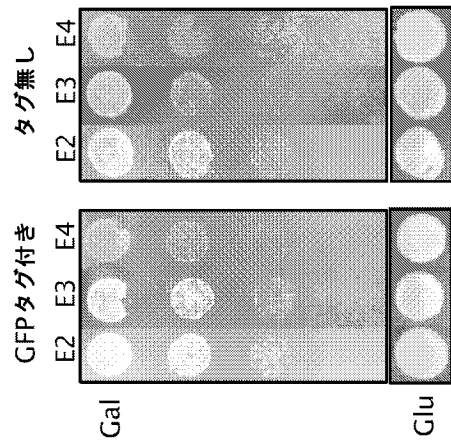


【図3】



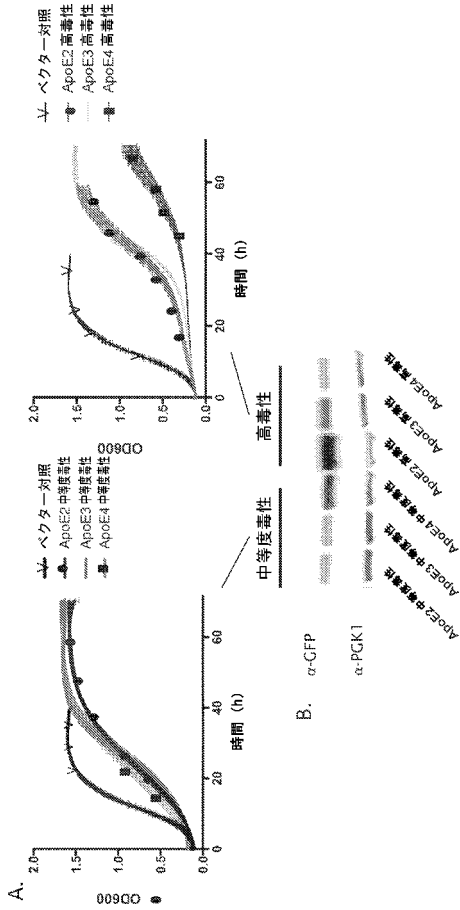
【図4】

ApoE構築物にGFPタグを付けても、構築物の毒性に影響はない



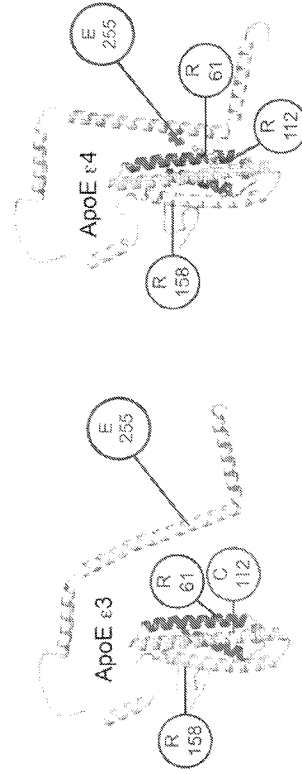
酵母におけるApoEの発現は、アイソフォーム特異的な増殖表現型をもたらす

【 図 5 】



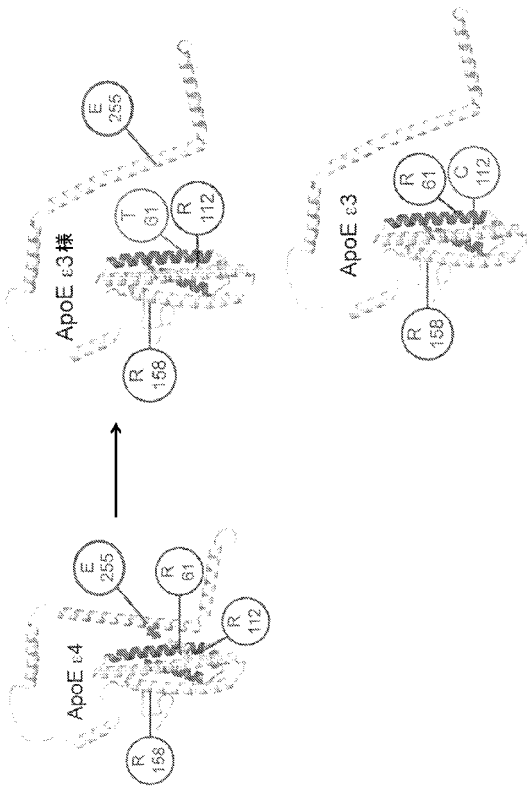
【 図 6 A 】

ApoEには、2つのアミノ酸において違いがある
3つのアイソフォームがある



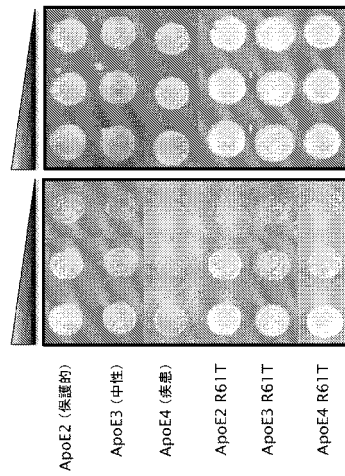
R61T突然変異は、ApoE4の構造をApoE3の構造のようにする

【 図 6 B 】



【 図 7 】

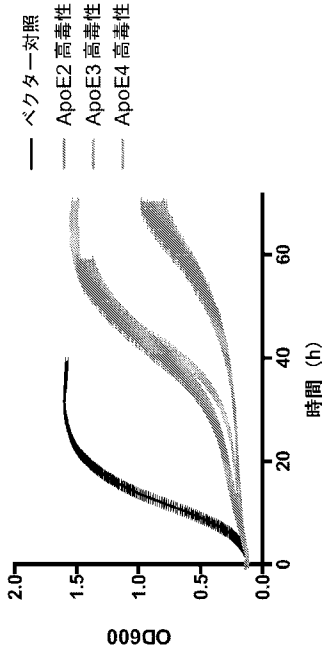
R61T突然変異はApoE ε3様表現型を回復する



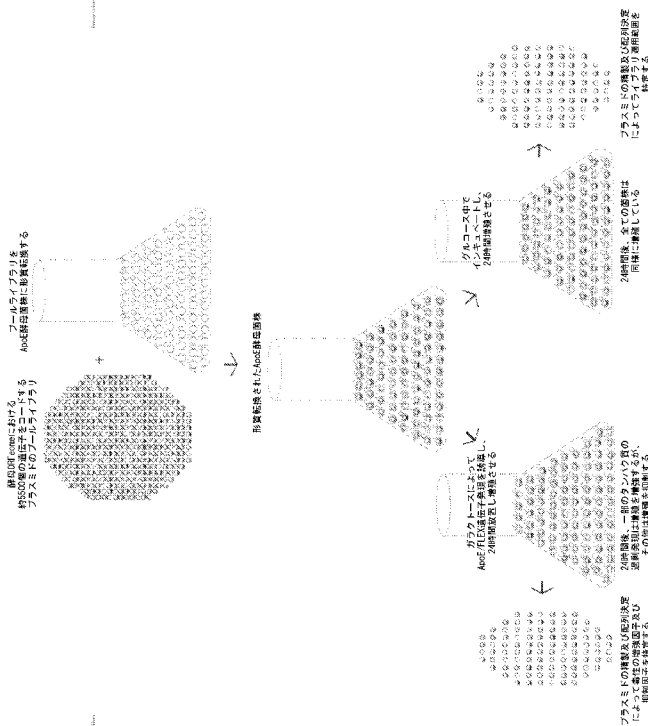
ガラクトース、ApoE「オン」 グルコース、ApoE「オフ」

スクリーニング菌株

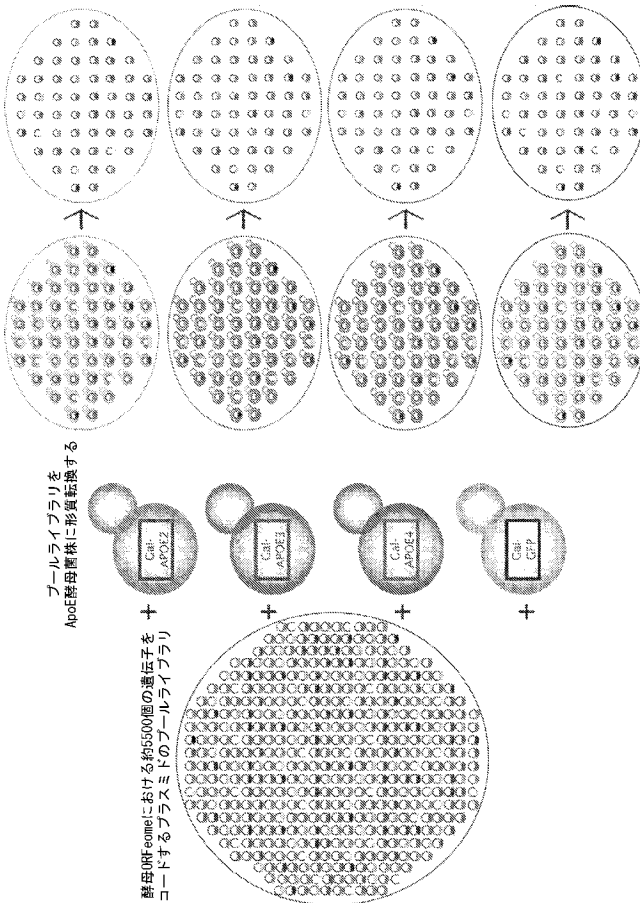
【 図 8 】



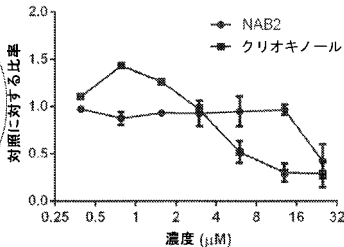
【 図 9 A 】



【 図 9 B 】

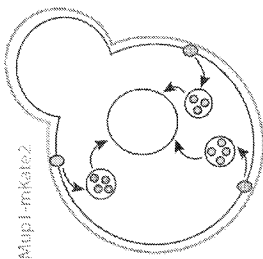
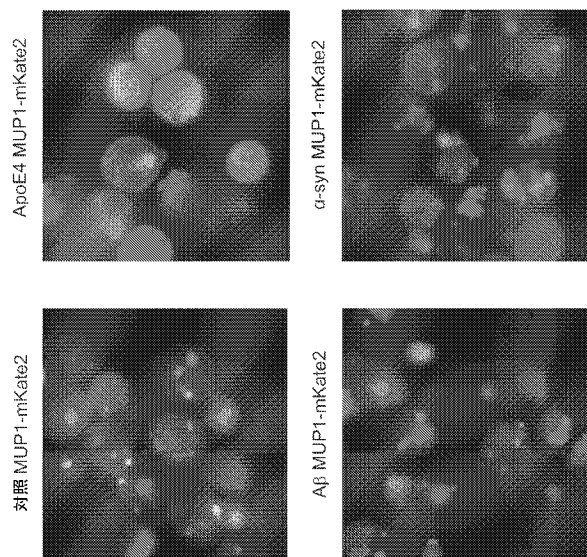


【 図 10 】

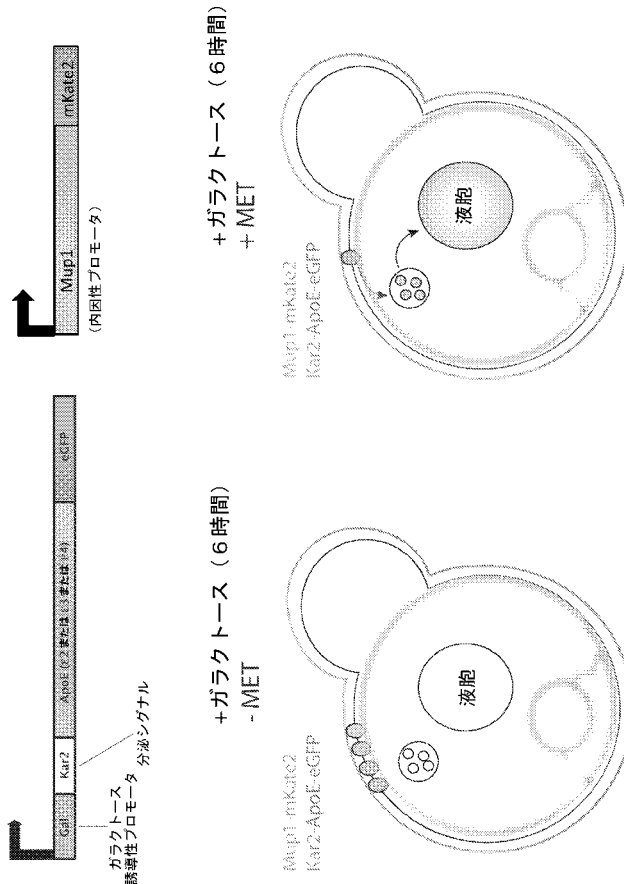


ApoE4、Aβ、及びα-synは、異なる方法でエンドソーム輸送を妨害する

【図 1 1 C】

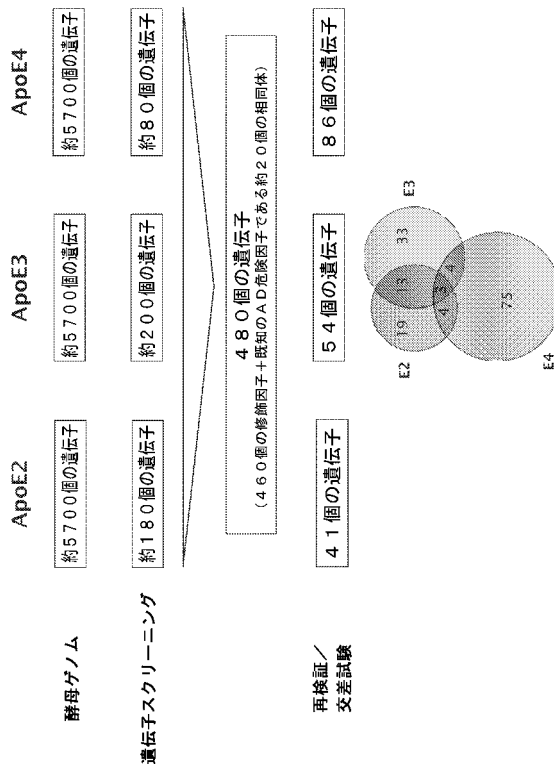


【図 1 1 A】

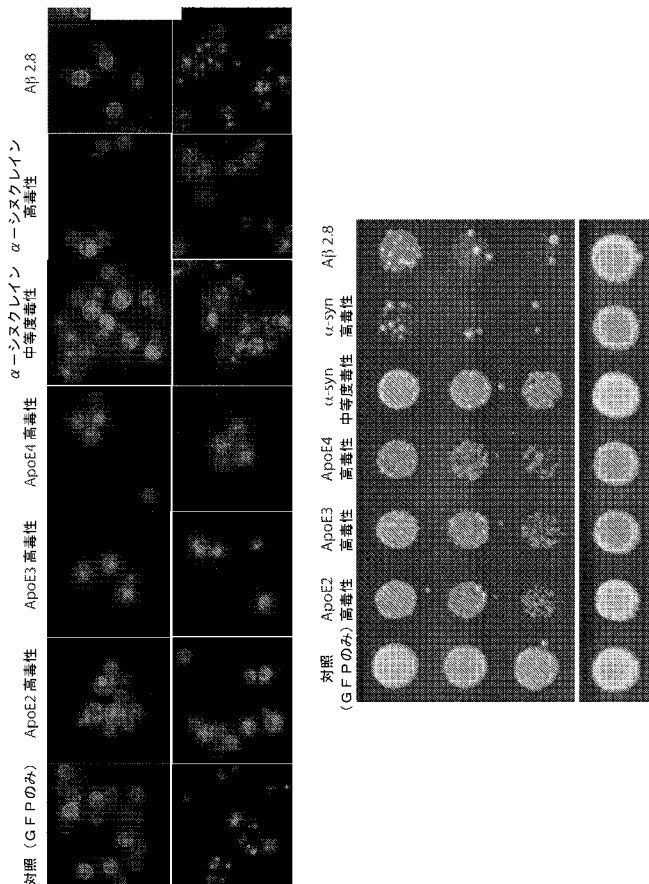


【図 1 2】

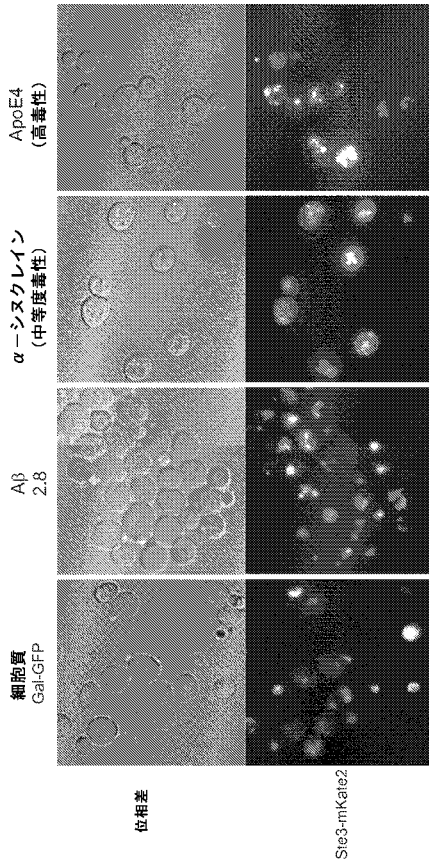
全ゲノム過剰発現スクリーニングの概要



【図 1 1 B】



【 図 1 3 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成29年5月11日 (2017.5.11)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2017534255000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/49674												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N1/19, C12N 15/81, C12Q1/02, C07K14/47 (2016.01) CPC - C12N 15/81, C12Q1/02, C07K14/4711 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 1/19, 15/12; C12N 15/81; C12Q 1/02, 1/18, 1/68; C07K 14/47 (2016.01) CPC: C12N 15/81, 15/85; C12Q 1/02, 1/18; C07K 14/4711; C12N 2800/22 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google Scholar; Pubmed; EBSCO; yeast, cell, express*, nucleic acid, DNA, RNA, construct, promoter, genetic, gene, ApoE, amyloid beta, polypeptide, product, decrease, loss, growth, viability, toxicity, signal, sequence, human, alzheimers														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 5116739 A (TERANISHI, Y et al) May 26, 1992; column 5, lines 15-21; column 5, lines 36-38; column 6, lines 28-37</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JORDAN, J et al. Isoform Specific Effect Of Apolipoprotein E On Cell Survival and Beta-Amyloid Induced Toxicity In Rat Hippocampal Pyramidal Neuronal Cultures. J Neurosci. 01 January 1998; Vol. 18, No. 1; pages 195-204; abstract; page 197, paragraph 2.</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0045483 A1 (TREUSCH, S et al.) February 21, 2013; abstract</td> <td>1-3</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 5116739 A (TERANISHI, Y et al) May 26, 1992; column 5, lines 15-21; column 5, lines 36-38; column 6, lines 28-37	1-3	Y	JORDAN, J et al. Isoform Specific Effect Of Apolipoprotein E On Cell Survival and Beta-Amyloid Induced Toxicity In Rat Hippocampal Pyramidal Neuronal Cultures. J Neurosci. 01 January 1998; Vol. 18, No. 1; pages 195-204; abstract; page 197, paragraph 2.	1-3	A	US 2013/0045483 A1 (TREUSCH, S et al.) February 21, 2013; abstract	1-3
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	US 5116739 A (TERANISHI, Y et al) May 26, 1992; column 5, lines 15-21; column 5, lines 36-38; column 6, lines 28-37	1-3												
Y	JORDAN, J et al. Isoform Specific Effect Of Apolipoprotein E On Cell Survival and Beta-Amyloid Induced Toxicity In Rat Hippocampal Pyramidal Neuronal Cultures. J Neurosci. 01 January 1998; Vol. 18, No. 1; pages 195-204; abstract; page 197, paragraph 2.	1-3												
A	US 2013/0045483 A1 (TREUSCH, S et al.) February 21, 2013; abstract	1-3												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 14 January 2016 (14.01.2016)		Date of mailing of the international search report 01 FEB 2016												
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/49674

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/49674

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 4-45, 58, 59, 70-77, 83-97, 100-114
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US15/49674

***Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-3 are directed toward a yeast cell comprising an expression construct comprising a promoter operably linked to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising a human ApoE protein, wherein expression of the nucleic acid and production of the polypeptide in the cell results in a decrease in growth or viability of the cell.

Groups II+: Claims 46-57 are directed toward a method of modulating ApoE-mediated toxicity, and identifying a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity.

The methods can be searched to the extent that the enhancer or suppressor encompasses yeast gene PRS2. It is believed that Claims 46 (in-part), 47 (in-part), 48 (in-part), 49 (in-part), 50 (in-part), 51 (in-part), 52 (in-part), 53 (in-part), 54 (in-part), 55 (in-part), 56 (in-part) and 57 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass yeast gene PRS2. Applicant is invited to elect additional enhancer(s) or suppressor(s) to be searched. Additional enhancer(s) or suppressor(s) can be searched upon the payment of additional fees. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: yeast gene RVS167.

Group III+: Claims 60 and 61 are directed toward a method of treating or preventing an ApoE4-mediated disease; the method comprising administering to a subject in need thereof a pharmaceutical composition comprising a therapeutic or prophylactic amount of a compound that modulates the expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity.

The method can be searched to the extent that the enhancer or suppressor encompasses yeast gene PRS2. It is believed that Claims 60 (in-part) and 61 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass yeast gene PRS2. Applicant is invited to elect additional enhancer(s) or suppressor(s) to be searched. Additional enhancer(s) or suppressor(s) can be searched upon the payment of additional fees. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: yeast gene RVS167.

Groups IV+: Claims 62-64 are directed toward methods of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease.

The methods can be searched to the extent that the enhancer or suppressor encompasses yeast gene PRS2. It is believed that Claims 62 (in-part), 63 (in-part) and 64 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass yeast gene PRS2. Applicant is invited to elect additional enhancer(s) or suppressor(s) to be searched. Additional enhancer(s) or suppressor(s) can be searched upon the payment of additional fees. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: yeast gene RVS167.

Groups V+: Claims 65-69 and 78-82 are directed toward cells comprising a first expression construct comprising a first promoter operably linked to a first nucleic acid encoding a polypeptide comprising a human ApoE protein, wherein the cell: (a) further comprises a second expression construct comprising a second promoter operably linked to a second nucleic acid encoding a polypeptide encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity, or has reduced or absent expression or activity of a protein encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity.

The cells can be searched to the extent that the enhancer or suppressor encompasses yeast gene PRS2. It is believed that Claims 65 (in-part), 66 (in-part), 67 (in-part), 68 (in-part), 78 (in-part), 79 (in-part), 80 (in-part), 81 (in-part) and 82 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass yeast gene PRS2. Applicant is invited to elect additional enhancer(s) or suppressor(s) to be searched. Additional enhancer(s) or suppressor(s) can be searched upon the payment of additional fees. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: yeast gene RVS167.

Group VI: Claims 98 and 99 are directed toward methods of identifying a binding partner of a human ApoE protein.

Continued on Next Supplemental Page

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US15/49674

***-Continued from Previous Supplemental Page:

The inventions listed as Groups I, II+ - V+ and VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include wherein production of human ApoE in a cell results in a decrease in growth of the cell, which is not present in any other Groups, the special technical features of Groups II+ including identifying a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity, which is not present in any other Groups, the special technical features of Groups III+ including treating or preventing an ApoE4-mediated disease, which is not present in any other Groups, the special technical features of Groups IV+ including evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease, which is not present in any other Groups, the special technical features of Groups V+ including cells comprising a second expression construct comprising a second promoter operably linked to a second nucleic acid encoding a polypeptide encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity, which is not present in any other Group, the special technical features of Group VI including identifying a binding partner of a human ApoE protein, which is not present in any other Groups.

Groups I, II+ - V+ and VI share the technical features including: a cell expressing ApoE. Groups I, V+ and VI share the technical features including a cell comprising an expression construct comprising a promoter operably linked to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising a human ApoE protein. Groups I, IV+ and VI share the technical features including yeast. Groups II+ - V+ share the technical features including: ApoE-mediated toxicity; and a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3 or a human homolog thereof. Groups II+ and III+ share the technical features including a compound that modulates the expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity. Groups III+ and IV+ share the technical features including an ApoE-mediated disease in a subject. Groups IV+ and V+ share the technical features including at least a portion of a sequence encoding a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity. Groups II+ share the technical features including: a method of modulating ApoE-mediated toxicity, the method comprising contacting a cell expressing a toxicity-inducing amount of ApoE with an effective amount of a compound that modulates expression or activity of a genetic enhancer or suppressor of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3, or a human homolog thereof; and a method of identifying a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity, the method comprising: (a) providing a cell expressing an amount of ApoE that reduces viability of the cell; (b) contacting the cell with an agent that modulates expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3 or a human homolog thereof; and (c) measuring cell viability in the presence of the agent, wherein an increase in cell viability in the presence of the agent as compared to cell viability in the absence of the agent identifies the agent as a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity. Groups III+ share the technical features including: a method of treating or preventing an ApoE4-mediated disease, the method comprising administering to a subject in need thereof a pharmaceutical composition comprising a therapeutic or prophylactic amount of a compound that modulates the expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3 or a human homolog thereof. Groups IV+ share the technical features including: a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease, the method comprising: obtaining a biological sample from a subject; analyzing the sample for the expression or activity of one or more proteins encoded by a human homolog of a yeast gene that is genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3 and comparing the expression or activity of the one or more proteins in the sample from the subject with a suitable control value, wherein the result of the comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing the ApoE-mediated disease; and a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease, the method comprising: obtaining a sequence of at least a portion of a gene in the subject selected from the group consisting of human homologs of genetic suppressors and enhancers of ApoE-mediated toxicity and comparing the sequence from the subject with a suitable control sequence, wherein the result of the comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing an ApoE-mediated disease, optionally wherein the genetic suppressor or enhancer is listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3. Groups V+ share the technical features including: a cell comprising a first expression construct comprising a first nucleic acid comprising a promoter operably linked to a first nucleic acid encoding a polypeptide comprising a human ApoE protein, wherein the cell: (a) further comprises a second expression construct comprising a second promoter operably linked to a second nucleic acid encoding a polypeptide encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, and 2C or a human homolog thereof or (b) has reduced or absent expression or activity of a protein encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3 or a human homolog thereof, wherein (i) the first nucleic acid is a heterologous nucleic acid, (ii) the cell is engineered to have reduced expression or activity of the protein encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity or human homolog thereof, or (iii) both (i) and (ii).

-Continued on Next Supplemental Page-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/49674

-***Continued from Previous Supplemental Page:

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2013/0045483 A1 to Treusch, et al. (hereinafter 'Treusch') and further in view of the publication entitled 'Genetic Evidence For The Involvement Of Variants At ApoE, Bin1, Cr1, and Picalm loci In Risk Of Late-Onset Alzheimer's Disease And Evaluation For Interactions With ApoE Genotypes' by Ghare Souran, et al. (hereinafter 'Ghare Souran') and US 5,116,739 A to Teranishi, et al. (hereinafter 'Teranishi').

Treusch discloses a cell expressing ApoE (a subject whose cells have at least one copy of an ApoE gene, including the epsilon4 allele of ApoE (a cell expressing ApoE); paragraph [0167]); a cell comprising an expression construct (paragraph [0006]) comprising a promoter operably linked to a nucleic acid encoding a polypeptide (paragraph [0006]) comprising a human protein (paragraph [0006]); yeast (paragraph [0006]); human amyloid beta-mediated toxicity (paragraph [0005]); and a genetic suppressor or enhancer of amyloid-beta mediated toxicity (paragraph [0023], [0026]) listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof (including VPS9 and homolog Rabgef1 (listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof); paragraph [0026]); a compound that modulates the expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of amyloid beta-mediated toxicity (paragraphs [0023], [0026]); an amyloid beta-mediated disease in a subject (Alzheimer's disease (an amyloid beta-mediated disease in a subject); abstract, paragraphs [0004], [0005]); at least a portion of a sequence encoding a genetic suppressor or enhancer of amyloid beta-mediated toxicity (a gene encoding a genetic suppressor or enhancer of toxicity; paragraph [0025]); a method of modulating amyloid beta-mediated toxicity (paragraph [0026]), the method comprising contacting a cell expressing a toxicity-inducing amount of amyloid beta (paragraph [0026]) with an effective amount of a compound that modulates expression or activity of a genetic enhancer or suppressor of amyloid beta-mediated toxicity (paragraph [0026]) listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof (including VPS9 and homolog Rabgef1 (listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof); paragraph [0026]); and a method of identifying a compound that inhibits amyloid beta-mediated toxicity (paragraph [0023]), the method comprising: (a) providing a cell expressing an amount of amyloid beta that reduces viability of the cell (the method comprising: (a) providing a cell expressing an amount of amyloid beta that induces toxicity (reduces viability) of the cell; paragraph [0023]); (b) contacting the cell with an agent that modulates expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of amyloid beta-mediated toxicity (paragraph [0023]) listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof (including VPS9 and homolog Rabgef1 (listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof); paragraph [0026]); and (c) measuring cell viability in the presence of the agent (paragraph [0023]), wherein an increase in cell viability in the presence of the agent (paragraph [0023]) as compared to cell viability in the absence of the agent (paragraph [0023]) identifies the agent as a compound that inhibits amyloid beta-mediated toxicity (paragraph [0023]); a method of treating or preventing an amyloid beta-mediated disease (paragraphs [0005], [0156], [0173]), the method comprising administering to a subject in need thereof a pharmaceutical composition (paragraphs [0026], [0156], [0173]) comprising a therapeutic or prophylactic amount (comprising an effective amount; paragraphs [0026], [0027]) of a compound that modulates the expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of amyloid beta-mediated toxicity (paragraphs [0026], [0027], [0173]) listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof (including VPS9 and homolog Rabgef1 (listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof); paragraph [0026]); a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an amyloid beta-mediated disease (paragraphs [0167]), the method comprising: obtaining a biological sample from a subject (analysis of cerebrospinal fluid; paragraph [0167]); analyzing the sample for the expression or activity of one or more proteins (paragraph [0167]) and comparing the expression or activity of the one or more proteins in the sample from the subject with a suitable control value (paragraph [0152]), wherein the result of the comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing the amyloid beta-mediated disease (paragraphs [0152], [0167]); and a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an amyloid beta-mediated disease (paragraph [0167]), the method comprising: obtaining a sequence of at least a portion of a gene in the subject (wherein the subject has a mutation in a gene encoding amyloid precursor protein, a presenilin gene, or ApoE; paragraph [0167]) and comparing the sequence from the subject with a suitable control sequence (wherein the subject has a mutation in a gene encoding amyloid precursor protein, a presenilin gene, or ApoE; paragraph [0167]), wherein the result of the comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing an amyloid beta-mediated disease (wherein the presence of said mutation indicates that the subject is at increased risk for developing an amyloid-beta mediated disease; paragraph [0167]); a cell comprising a first expression construct (paragraph [0006]) comprising a first nucleic acid comprising a first promoter (paragraph [0006]) operably linked to a first nucleic acid encoding a human amyloid beta polypeptide (paragraph [0006]), wherein the cell has reduced or absent expression or activity of a protein encoded by a genetic suppressor or enhancer of amyloid beta-mediated toxicity (wherein a suppressor or enhancer of amyloid beta-mediated toxicity is disrupted in the cell; paragraph [0026]) listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof (including VPS9 and homolog Rabgef1 (listed in Tables 1A, 2A, 2B, and 3 or a human homolog thereof); paragraph [0026]), wherein the first nucleic acid is a heterologous nucleic acid (paragraph [0006]); wherein cells from a subject having or at risk for a disorder associated with amyloid beta have at least one copy of an ApoE gene, such as the epsilon4 allele of ApoE (wherein cells from a subject having or at risk for a disorder associated with amyloid beta have at least one copy of an ApoE gene, such as the epsilon4 allele of ApoE; paragraph [0167]).

-***Continued on Next Supplemental Page-***

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/49674

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Treusch does not disclose: an expression construct comprising a promoter operably linked to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising a human ApoE protein; ApoE-mediated toxicity; a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity listed in any one or more of Tables 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, and 3; an ApoE-mediated disease in a subject; at least a portion of a sequence encoding a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; a method of modulating ApoE-mediated toxicity, the method comprising contacting a cell expressing a toxicity-inducing amount of ApoE with an effective amount of a compound that modulates expression or activity of a genetic enhancer or suppressor of ApoE-mediated toxicity; a method of identifying a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity, the method comprising: (a) providing a cell expressing an amount of ApoE that reduces viability of the cell; (b) contacting the cell with an agent that modulates expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity, wherein an increase in cell viability in the presence of the agent as compared to cell viability in the absence of the agent identifies the agent as a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity; a method of treating or preventing an ApoE-mediated disease, the method comprising administering to a subject in need thereof a pharmaceutical composition comprising a therapeutic or prophylactic amount of a compound that modulates the expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease, the method comprising: obtaining a biological sample from a subject; analyzing the sample for the expression or activity of one or more proteins encoded by a human homolog of a yeast gene that is genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; wherein the result of a comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing the ApoE-mediated disease; and a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease, the method comprising: obtaining a sequence of at least a portion of a gene in the subject selected from the group consisting of human homologs of genetic suppressors and enhancers of ApoE-mediated toxicity and comparing the sequence from the subject with a suitable control sequence, wherein the result of the comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing an ApoE-mediated disease; a cell comprising a first expression construct comprising a first nucleic acid comprising a promoter operably linked to a first nucleic acid encoding a polypeptide comprising a human ApoE protein, wherein the cell has reduced or absent expression or activity of a protein encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; wherein the first nucleic acid is a heterologous nucleic acid.

Gharsouran discloses wherein Alzheimer's disease is an ApoE-mediated disease (wherein Alzheimer's disease is associated with expression of the epsilon4 allele of ApoE (wherein Alzheimer's disease is an ApoE-mediated disease); page 2, column 1, paragraph 2 to column 2, paragraph 1), and wherein ApoE epsilon4 regulates the toxicity of amyloid beta (wherein ApoE epsilon4 regulates the toxicity of amyloid beta; page 2, column 1, paragraph 2 to column 2, paragraph 1); as well as wherein a genetic suppressor or enhancer modulates ApoE epsilon4 toxicity (wherein Bin1 suppresses ApoE epsilon4 antagonistically interacts with the ApoE epsilon4 allele (as well as wherein a genetic suppressor or enhancer modulates ApoE epsilon4 toxicity); page 2, column 1, paragraph 2 to column 2, paragraph 1; page 6, column 2, paragraph 2); wherein the suppressor or enhancer is listed in Table 2A, 2B and 2C (wherein the genetic suppressor is an allele of Bin1 (wherein the suppressor or enhancer is listed in Table 2A, 2B and 2C); page 2, column 1, paragraph 2 to column 2, paragraph 1; page 6, column 2, paragraph 2); and wherein the suppressor or enhancer is, itself, toxic in the absence of the ApoE (page 6, column 2, paragraph 2).

Teranishi discloses expression vectors comprising nucleic acid sequences encoding human apolipoprotein E (expression vectors comprising nucleic acid sequences encoding human apolipoprotein E; abstract), comprising a promoter (column 5, lines 28-45) and host cells for the expression of the protein, including yeast (column 7, lines 19-24).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Treusch, for including an expression construct in the yeast cells, disclosed by Treusch, for the heterologous expression of human ApoE, as disclosed by Teranishi, in order to provide recombinant cells expressing both beta amyloid protein, as disclosed by Treusch, and human ApoE, as in cells from a subject having or at risk for a disorder associated with amyloid beta, such as the epsilon4 allele of ApoE.

-***-Continued on Next Supplemental Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/49674

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Furthermore, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Treusch, in order to provide for the determination of the amyloid beta-dependent ApoE epsilon4 toxicity, and modulation thereof by a genetic enhancer or suppressor, as disclosed by Ghare Souran, in a controlled and controllable yeast expression system, as disclosed by Treusch, including heterologous expression of an epsilon4 allele of human ApoE, as disclosed by Teranishi, for providing at least a portion of a sequence encoding a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; a method of modulating ApoE-mediated toxicity, the method comprising contacting a cell expressing a toxicity-inducing amount of ApoE with an effective amount of a compound that modulates expression or activity of a genetic enhancer or suppressor of ApoE-mediated toxicity; a method of identifying a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity, the method comprising: (a) providing a cell expressing an amount of ApoE that reduces viability of the cell; (b) contacting the cell with an agent that modulates expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity, wherein an increase in cell viability in the presence of the agent as compared to cell viability in the absence of the agent identifies the agent as a compound that inhibits ApoE-mediated toxicity; a method of treating or preventing an ApoE4-mediated disease, the method comprising administering to a subject in need thereof a pharmaceutical composition comprising a therapeutic or prophylactic amount of a compound that modulates the expression or activity of a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease, the method comprising: obtaining a biological sample from a subject; analyzing the sample for the expression or activity of one or more proteins encoded by a human homolog of a yeast gene that is genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; wherein the result of a comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing the ApoE-mediated disease; and a method of evaluating an individual for the presence of or susceptibility to developing an ApoE-mediated disease, the method comprising: obtaining a sequence of at least a portion of a gene in the subject selected from the group consisting of human homologs of genetic suppressors and enhancers of ApoE-mediated toxicity and comparing the sequence from the subject with a suitable control sequence, wherein the result of the comparison indicates whether the subject is an individual having or at risk of developing an ApoE-mediated disease; a cell comprising a first expression construct comprising a first nucleic acid comprising a promoter operably linked to a first nucleic acid encoding a polypeptide comprising a human ApoE protein, wherein the cell has reduced or absent expression or activity of a protein encoded by a genetic suppressor or enhancer of ApoE-mediated toxicity; wherein the first nucleic acid is a heterologous nucleic acid; since said methods would have created cells more useful in identifying compounds for the modulation of suppressors and enhancers of ApoE toxicity in a cell, and enabled the determination of the susceptibility of a subject to an ApoE-toxicity mediated disease, such as Alzheimer's disease, based on a model that more closely follows the complex interactions disclosed by Ghare Souran, where individually toxic factors may suppress each other, for enabling the selection of appropriate treatments for patients, based on a panel or profile of genes, for selecting compounds useful in the prophylaxis and treatment of an associated disease, such as Alzheimer's, and avoiding selecting a treatment which promotes a disease in a subject, rather than treating the disease.

Since none of the special technical features of the Groups I-VI inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Treusch, Teranishi and Ghare Souran references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 V
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z
C 0 7 K	14/775 (2006.01)	C 0 7 K	14/775
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リンドキスト スーザン エル.
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ イースト ケンブリッジ パークウェイ 7 5

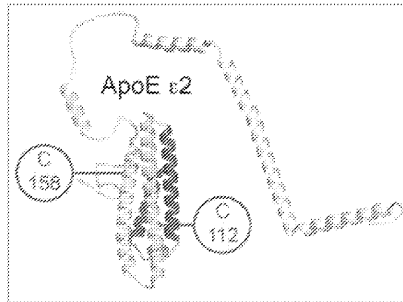
(72)発明者 ナラヤン プリヤンカ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ハーバード ストリート 3 5 3 アpartment 2

Fターム(参考) 2G045 AA24 CB21 DA66 FB06
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ61 QR48 QR76 QR77 QR80 QS10 QS14
QS38 QX01
4B065 AA72X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 BB12 BB15 BB17
BB31 BC03 BC11 BD16 CA24 CA46

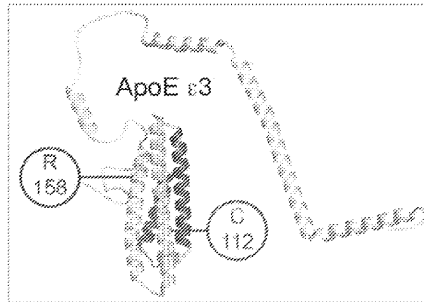
4C084 AA17 NA14 ZA021 ZA151 ZA161 ZC412
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA83 EA50 FA74

【要約の続き】

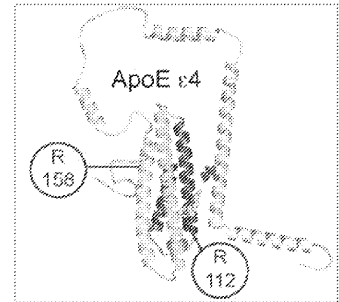
ApoEには、2つのアミノ酸位置に違いがある
3つのアイソフォームがある



保護的



中性



疾患

专利名称(译)	表达载脂蛋白E的细胞及其用途		
公开(公告)号	JP2017534255A	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	JP2017513737	申请日	2015-09-11
申请(专利权)人(译)	怀特黑德生物医学研究所		
[标]发明人	リンドキストスーザンエル ナラヤンプリヤンカ		
发明人	リンドキスト スーザン エル. ナラヤン プリヤンカ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/19 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N5/10 A61K45/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P43/00 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/15 C07K14/775 C07K14/705 C07K19/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/4711 C07K14/775 C12Q1/02 G01N33/5014 G01N33/5058 G01N33/6896 G01N2333/775 G01N2800/2821 C07K2319/02 C12N15/81 G01N33/92 G01N2500/10 G01N2800/50 G01N2800/709		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/19 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N5/10 A61K45/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P43/00.111 G01N33/50.Z G01N33/68 G01N33/53.V G01N33/15.Z C07K14/775 C07K14/705 C07K19/00		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB21 2G045/DA66 2G045/FB06 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063 /QQ61 4B063/QR48 4B063/QR76 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS38 4B063/QX01 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/BB12 4B065/BB15 4B065/BB17 4B065/BB31 4B065/BC03 4B065/BC11 4B065 /BD16 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA151 4C084 /ZA161 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA83 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/050045 2014-09-12 US		
其他公开文献	JP2017534255A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了表达包括信号序列和人ApoE蛋白的多肽的酵母细胞。在一些实施方案中，该多肽包含ApoE2。在一些实施方案中，该多肽包含ApoE3。在一些实施方案中，多肽包含ApoE4。还公开了筛选酵母细胞以鉴定预防或抑制Apo诱导的毒性的化合物的方法。通过此类筛选鉴定出的化合物可用于治疗或预防神经退行性疾病，例如阿尔茨海默氏病。还公开了筛选酵母细胞以鉴定ApoE诱导的毒性的抑制基因或增强基因的方法。还公开了使用该方法鉴定的ApoE诱导的毒性的抑制剂或增强剂及其人类同源物。还公开了鉴定针对ApoE-诱导的毒性而调节修饰基因的表达或活性的化合物的方法。

ApoE comes in three isoforms that differ at 2 AA positions

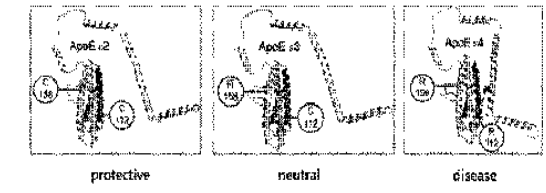


Fig. 1