

(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2005-526502
(P2005-526502A)

(43) 公表日 **平成17年9月8日(2005.9.8)**

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	Z N A E
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04	4 B O 6 3
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	4 B O 6 5
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-571481 (P2003-571481)	(71) 出願人	592054292
(86) (22) 出願日	平成15年2月21日 (2003.2.21)		ザ ロックフェラー ユニバーシティー
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月15日 (2004.10.15)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/005273		21-6399, ニューヨーク, ヨークア
(87) 国際公開番号	W02003/072801		ベニュー 1230
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003.9.4)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	60/358, 548		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成14年2月21日 (2002.2.21)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(72) 発明者	グリーンガード, ポール
			アメリカ合衆国 10021 ニューヨ
			ーク州, ニューヨーク, イースト シックス
			ティーナインス ストリート 362
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳のカルシウム依存性シグナル伝達の調節のための組成物および方法

(57) 【要約】

脳組織内でのカルシウムシグナル伝達のもジュレーターとしての活性について薬剤をスクリーニングする方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞または組織をDARPP-21の生物活性をモジュレートする薬剤と接触させて、シグナル伝達経路をモジュレートすることを含んでなる、細胞または組織内でDARPP-21の生物活性をモジュレートする方法。

【請求項 2】

前記薬剤がDARPP-21のリン酸化状態を変化させるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記薬剤がDARPP-21/カルモジュリン複合体の形成を変化させるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ドーパミン関連疾患を予防、治療、またはその症状を改善する方法であって、それらを必要としている被験者にDARPP-21の生物活性をモジュレートする薬剤を投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 5】

前記薬剤がDARPP-21のリン酸化状態を変化させるものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記薬剤がDARPP-21/カルモジュリン複合体の形成を変化させるものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞または組織におけるカルシウムシグナル伝達をモジュレートする活性について薬剤をスクリーニングする方法であって：

(a) 細胞または組織の第1のサンプルにおけるDARPP-21の第1のリン酸化レベルを測定すること；

(b) 細胞または組織の第2のサンプルを、カルシウムシグナル伝達を調節する能力について試験すべき薬剤と接触させること；

(c) 該細胞または組織におけるDARPP-21の第2のリン酸化レベルを測定すること；および

(d) 第1および第2のリン酸化レベルを比較するが、ここでそれらのレベルの差は、該薬剤がDARPP-21リン酸化をモジュレートし、ひいてはカルシウムシグナル伝達をモジュレートすることを示すこと、
を含んでなる前記方法。

【請求項 8】

細胞または組織におけるカルシウムシグナル伝達をモジュレートする活性について薬剤をスクリーニングする方法であって：

(a) 細胞または組織のサンプルを、カルシウムシグナル伝達を調節する能力について試験すべき薬剤と接触させること；

(c) (a)の細胞または組織中におけるDARPP-21のリン酸化レベルを測定すること；および

(d) (c)で測定したレベルを、該薬剤と接触させなかった対応する細胞または組織の対照サンプルでのレベルと比較するが、ここでそれらのレベルの差は、該薬剤がDARPP-21リン酸化をモジュレートし、ひいてはカルシウムシグナル伝達をモジュレートすることを示すこと、
を含んでなる前記方法。

【請求項 9】

該細胞または組織が脳の細胞または組織である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

カルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)またはプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)の生物活性をモジュレートする能力について、同定された薬剤を試験することをさらに含む、請求項 7 または 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

細胞または組織におけるカルシウムシグナル伝達をモジュレートする能力について試験すべき薬剤を同定する方法であって：

(a) DARPP-21と薬剤を、DARPP-21と結合させるのに十分な時間にわたり接触させること；

(b) 結合していない薬剤を洗って除去すること；および

(c) DARPP-21に結合した薬剤の存在をアッセイし、ここで該薬剤がDARPP-21と結合するならば、次にカルシウムシグナル伝達をモジュレートする能力について試験すべき薬剤が同定されること、

を含んでなる前記方法。

10

【請求項 1 2】

同定された薬剤を、DARPP-21、カルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)、またはプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)の生物活性をモジュレートする能力について試験することをさらに含んでなる、請求項 1 1に記載の方法。

【請求項 1 3】

細胞内カルシウムシグナル伝達をモジュレートする活性について薬剤をスクリーニングする方法であって：

(a) 薬剤の不在下でDARPP-21とカルモジュリンを含んだタンパク質-タンパク質結合アッセイを行うこと；

(b) 薬剤の存在下でDARPP-21とカルモジュリンを含んだタンパク質-タンパク質結合アッセイを行うこと；

(c) ステップ(a)でのDARPP-21とカルモジュリンの結合のレベルをステップ(b)での同レベルと比較するが、ここでその結合レベルの差は、該薬剤が細胞内カルシウムシグナル伝達をモジュレートすることを示すこと、

を含んでなる前記方法。

20

【請求項 1 4】

細胞内カルシウムシグナル伝達をモジュレートする活性について薬剤をスクリーニングする方法であって：

(a) 薬剤の存在下でDARPP-21とカルモジュリンを含んだタンパク質-タンパク質結合アッセイを行うこと；

(b) ステップ(a)でのDARPP-21とカルモジュリンの結合のレベルを測定すること；および

(c) (c)におけるそのレベルを、該薬剤の不在下で行った対応する対照のタンパク質-タンパク質結合アッセイでの結合のレベルと比較し、ここでその結合レベルの差は該薬剤が細胞内カルシウムシグナル伝達をモジュレートすることを示すこと、

を含んでなる前記方法。

30

【請求項 1 5】

同定された薬剤をカルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)またはプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)の生物活性をモジュレートする能力について試験することをさらに含んでなる、請求項 1 3または 1 4に記載の方法。

40

【請求項 1 6】

DARPP-21との結合がカルモジュリンによって阻害または増強される候補DARPP-21結合タンパク質をスクリーニングする方法であって：

(a) カルモジュリンの不在下でDARPP-21と候補タンパク質を含んだタンパク質-タンパク質結合アッセイを行うこと；

(b) カルモジュリンの存在下でDARPP-21と候補ポリペプチドを含んだタンパク質-タンパク質結合アッセイを行うこと；

(c) ステップ(a)でのDARPP-21と候補ポリペプチドの結合をステップ(b)での結合と比較することによって、カルモジュリンがそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定すること、

50

を含んでなる前記方法。

【請求項 17】

カルモジュリンとのその結合がDARPP-21によって阻害または増強される候補カルモジュリン結合タンパク質をスクリーニングする方法であって：

(a) DARPP-21の不在下でカルモジュリンと候補タンパク質を含んだタンパク質-タンパク質結合アッセイを行うこと；

(b) DARPP-21の存在下でカルモジュリンと候補ポリペプチドを含んだタンパク質-タンパク質結合アッセイを行うこと；

(c) ステップ(a)でのカルモジュリンと候補ポリペプチドの結合をステップ(b)でのそれらの結合と比較することによって、DARPP-21がタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定すること、

を含んでなる前記方法。

【請求項 18】

同定された薬剤を、カルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)またはプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)の生物活性をモジュレートする能力について試験することをさらに含む、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

DARPP-21がアミノ酸55位に負電荷を含む、請求項 7 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法

【請求項 20】

DARPP-21がリン酸化されていない、請求項 7 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

DARPP-21がリン酸化されている、請求項 7 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

タンパク質-タンパク質結合アッセイが、酵母における2-ハイブリッドアッセイまたは大腸菌/BCCP 双方向システムを含む、請求項 7 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

タンパク質-タンパク質結合アッセイが、免疫共沈または固定化タンパク質-タンパク質結合アッセイを含む、請求項 7 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 7 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法によって同定される、細胞または組織におけるニューロンのカルシウムシグナル伝達をモジュレートするための組成物。

【請求項 25】

同定された薬剤を、カルモジュリン依存性タンパク質の生物活性をモジュレートする能力についてさらに試験することを含む、請求項 7、8、11、13、または14のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

カルモジュリン依存性タンパク質が酵素である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記酵素がホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、またはアデニル酸シクラーゼである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

ドーパミン関連疾患が、てんかん、統合失調症、パーキンソン病、注意欠陥多動障害、うつ病、薬物乱用、疼痛、癌、卒中もしくはアルツハイマー病、ハンチントン病、またはトゥレット症候群である、請求項 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2002年2月21日に出願された米国仮出願第60/358,548号（これはその全体を参照により本明細書中に組み入れる）に対する35 U.S.C. § 119(e)に基づく利益を主張す

10

20

30

40

50

る。

【0002】

1. 技術分野

本発明は、第1に、DARPP-21が関与している神経系のカルシウムシグナル伝達をモジュレートする活性について、薬剤をスクリーニングする方法を提供する。例えば、本発明は、DARPP-21とカルモジュリンとの間のタンパク質-タンパク質結合を阻害または増強させる薬剤をスクリーニングする方法、およびカルモジュリンとのその結合がDARPP-21によって阻害されるかまたは増強される候補カルモジュリン結合タンパク質をスクリーニングする方法を提供する。本発明はまた、DARPP-21関連シグナル伝達経路、例えば、ドーパミン作動性シグナル伝達経路などをモジュレートするための組成物および方法にも関する。例えば、本発明は、そのようなシグナル伝達経路でのDARPP-21のリン酸化状態、タンパク質発現レベル、および/またはタンパク質間相互作用をモジュレートする方法および組成物に関する。本発明はまた、例えば、DARPP-21/カルモジュリン複合体の形成をモジュレートする薬剤を投与することにより、ドーパミン関連疾患を予防、治療、またはその症状を改善する組成物および方法にも関する。

10

【背景技術】

【0003】

2. 本発明の背景

神経伝達物質、ホルモン、薬物、および細胞の脱分極などの種々の刺激への応答としての細胞内カルシウムレベルの上昇は全ての細胞にあまねく見られるものである。神経のカルシウム依存性シグナル伝達は記憶の獲得、てんかん、および脳虚血のような重要かつ様々な各種の生理学的および病理学的プロセスに関与している。

20

【0004】

神経伝達物質のドーパミンを利用している細胞ネットワーク中の細胞などの中樞神経系(CNS)の特定の細胞中では、cAMP依存性シグナル伝達経路はドーパミン、セロトニン、オピエート、およびその他の薬剤に反応して活性化される(Greengard(2000), Science 294:1024-1029)。例えば、パーキンソン病、注意欠陥多動障害(ADHD)、統合失調症、および薬物乱用などの多数の疾患が、このCNSのドーパミン作動性細胞ネットワークと密接に関連している。カルシウム-シグナル伝達経路とcAMP依存性シグナル伝達経路の間の相互作用の分子的メカニズムは明らかではないものの、ドーパミン作動性細胞ネットワーク中のcAMP依存性シグナル伝達経路の機能的アウトプットの1つはカルシウム-シグナル伝達経路のモジュレートである。従って、当業界では、カルシウム依存性シグナル伝達経路とcAMP依存性シグナル伝達経路の間の相互関係を調節する薬剤であって、治療に用いるための候補となりうるものを見出すための適切な方法の提供が非常に強く求められている。

30

【0005】

DARPP-21はニューロン性の21kDaのドーパミンおよびcAMPによって調節されるリンタンパク質(dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein)であり、脳のドーパミンに富んだ領域中で高度に発現されている。DARPP-21には保存されたドメインは含まれておらず、これまでは既知のタンパク質のいずれとも類似性を示さなかったが、最近、N末端配列の一部としてDARPP-21の全体を含んでいる100kDaのタンパク質が、胸腺で発見された(Kiselow, J.ら, 2001 Eur. J. Immunol. 4:1141-1149)。このタンパク質はTARPP(胸腺特異的cAMP調節リンタンパク質)として知られているが、脳内では検出されておらず、その機能は依然として不明である。

40

【0006】

DARPP-21の配列決定と生化学的分析によって、DARPP-21がSer⁵⁵においてcAMP依存性プロテインキナーゼ(これはプロテインキナーゼAまたはPKAとしても知られている; Williams, K. R.ら, 1989, J. Neurosci. 9:3631-3637)によってリン酸化されることが示されている。ラット脳の免疫組織化学的分析では、DARPP-21が基底核中に豊富に存在し、中でも辺縁線条体を含む構造中でもっとも高いレベルの免疫反応性レベルが示されることが実証された(Ouimet, C. C.ら, 1989, J. Neurosci. 9:865-875)。哺乳類の脳のこれらの領域

50

はドーパミン作動性ニューロンが密に集まっていることで知られている。Ser⁵⁵でリン酸化されたDARPP-21を選択的に検出するリン酸化状態特異的抗体を用いて、D1ドーパミン受容体が活性化されるとPKA活性のアップレギュレーションによる線条体切片中でのDARPP-21リン酸化のレベルが増加することが見出された。反対に、D2ドーパミン受容体の活性化はDARPP-21リン酸化の低減を引き起こした(Caporaso, G. L.ら, 2000, *Neuropharmacology* 39:1637-1644)。さらに、マウスをメタンフェタミンまたはコカインで処置すると、*in vivo*でDARPP-21リン酸化の増加をもたらした。プロテインホスファターゼ2Aはマウスの線条体内のDARPP-21の脱リン酸に主として関わっていることが示されている(Caporaso, G. L.ら, 2000, *Neuropharmacology* 39:1637-1644)。

【0007】

10

これらのデータは、DARPP-21が、CNS中のドーパミン作動性細胞ネットワークにおけるドーパミンおよびある種の乱用性薬物の生理的作用によって影響を受け、またおそらくはその作用を媒介することを示している。これらのプロセスでDARPP-21が役割を果たすとすればそれはどのような役割なのか、とりわけ、カルシウム依存性および/またはcAMP依存性シグナル伝達経路に影響を与えることにおいてDARPP-21が役割を果たすとすればどのような役割なのかは明らかではない。

【発明の開示】

【0008】

3. 本発明の要旨

現在では、DARPP-21のリン酸化が中枢神経系におけるカルシウム依存性シグナル伝達をモジュレートすることが判明している。特に、本発明は、部分的には、DARPP-21のリン酸化状態が生理的条件下でDARPP-21とカルシウム/カルモジュリンとの相互作用を調節するとの発明者らによる驚くべき発見に基づいたものである。DARPP-21は以前はARPP-21と呼ばれていたことに注意すべきである；例えば、米国仮特許第60/358,548号を参照せよ。

20

【0009】

本発明の目的の1つは、ドーパミン作動性シグナル伝達経路、特にDARPP-21関連ドーパミン作動性シグナル伝達経路をモジュレートする能力について薬剤をスクリーニングする方法である。1実施形態においては、そのような方法は細胞または組織中のカルシウムシグナル伝達をモジュレートする能力について薬剤をスクリーニングすることに関する。

【0010】

30

非限定的な1つの例においては、そのような方法は、細胞または組織の第1のサンプルまたは対照サンプルにおけるDARPP-21の第1のリン酸化レベルを測定し；細胞または組織の第2のサンプルを、カルシウムシグナル伝達を調節する能力について試験すべき薬剤と接触させ；それらの細胞または組織におけるDARPP-21の第2のリン酸化レベルを測定し；第1のリン酸化レベルと第2のリン酸化レベルを比較することを含み、かつ、そのリン酸化レベルの差が、DARPP-21のリン酸化をモジュレートし、そうしてカルシウムシグナル伝達をモジュレートする前記薬剤の能力を示す方法でありうる。1実施形態においては、その細胞または組織は脳の細胞または組織である。このような方法はさらに、薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えば、ホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼ、カルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)および/またはプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)などの酵素の生物活性をモジュレートするかどうかを試験することを含んでもよい。

40

【0011】

また別の非限定的な1つの例においては、このような方法は、薬剤がDARPP-21と結合するかどうかを決定することを含むものでもよい。例えば、薬剤をDARPP-21と、結合するのに十分な時間接触させ、DARPP-21を洗って結合していない薬剤を除去し、さらにDARPP-21に結合した薬剤の存在をアッセイして、その薬剤がDARPP-21と結合する場合には、カルシウムシグナル伝達をモジュレートする能力について試験すべき薬剤が同定されているものとすることができる。

【0012】

50

別の非限定的な1つの例においては、そのような方法は、DARPP-21とカルモジュリンとを薬剤の存在下で含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを使用すること、およびその薬剤がDARPP-21とカルモジュリンとの間のタンパク質-タンパク質結合を阻害または増強するかどうかを決定することを含み、そのタンパク質-タンパク質結合の阻害または増強によってその薬剤が細胞内のカルシウムシグナル伝達をモジュレートすることが示される方法でありうる。そのような方法は、例えば、その薬剤がDARPP-21および/またはカルモジュリンと結合するかどうかをまず決定し、その薬剤がDARPP-21および/またはカルモジュリンと結合する場合には、次いでその薬剤をタンパク質-タンパク質結合アッセイで試験することを、さらに含んでもよい。このような方法は、さらに、あるいは代替的に、その薬剤が、例えばカルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)および/またはプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)などの生物活性をモジュレートするかどうかを試験することをさらに含んでもよい。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位において負電荷を有している。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。

10

【0013】

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、DARPP-21との結合がカルモジュリンによって阻害または増強されるようなDARPP-21結合ペプチドの候補をスクリーニングする方法であって、DARPP-21および候補DARPP-21結合ペプチドをカルモジュリンの存在下で含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、カルモジュリンがそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定することを含む方法である。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含んでいる。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。これらの方法は、薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼなどの酵素などの生物活性をモジュレートするかどうかを試験することをさらに含んでもよい。

20

【0014】

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、カルモジュリンとの結合がDARPP-21によって阻害されるかまたは増強される候補カルモジュリン結合ペプチドをスクリーニングする方法であって、カルモジュリンおよび候補カルモジュリン結合ペプチドをDARPP-21の存在下で含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、DARPP-21がそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強させるかを調べることを含む方法である。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含む。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。これらの方法は、その薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼなどの酵素の生物活性をモジュレートするかどうかをさらに試験することを含んでもよい。

30

【0015】

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、DARPP-21との結合がカルモジュリンによって阻害または増強される候補DARPP-21結合薬剤、例えば候補ペプチドをスクリーニングする方法であって、DARPP-21および候補ペプチドをカルモジュリンの存在下で含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、カルモジュリンがそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定することを含む方法である。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含んでいる。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。また別の1実施形態においては、DARPP-21のSer⁵⁵が別のアミノ酸と置換されることによって変異している。これらの方法はさらに、該薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼなどの酵素の生物活性をモジュレートするかどうかを試験することをさらに含んでもよい。

40

【0016】

50

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、カルモジュリンとの結合がDARPP-21によって阻害または増強される候補カルモジュリン結合薬剤、例えば候補ペプチドをスクリーニングする方法であって、カルモジュリンおよび候補ポリペプチドをDARPP-21の存在下で含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、DARPP-21がそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定することを含む方法である。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含んでいる。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。これらの方法は、その薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼなどの酵素の生物活性をモジュレートするかどうかを試験することをさらに含んでもよい。

10

【0017】

本発明のさらに別の目的はドーパミンシグナル伝達経路におけるDARPP-21の生物活性(例えば、リン酸化状態、タンパク質発現レベル、および/またはタンパク質-タンパク質相互作用など)をモジュレートするための方法および組成物である。例えば、本発明はカルシウムシグナル伝達、例えば、ニューロンのカルシウムシグナル伝達を上述のような経路でモジュレートするための方法と組成物を提供する。1実施形態においては、このような方法は、細胞または組織をDARPP-21の生物活性をモジュレートする薬剤と接触させて、シグナル伝達経路をモジュレートすることを含んでもよい。接触させる薬剤は、例えば、DARPP-21のリン酸化状態を変化させるものであってよい。接触させる薬剤は、例えば、DARPP-21/カルモジュリン複合体の形成を変化させるものであってよい。

20

【0018】

本発明の別の目的は、カルシウムに関連する症状、例えばドーパミン関連疾患などの予防、治療または改善を、それらを必要とする被験者にDARPP-21の生物活性をモジュレートする薬剤を投与することによってもたらすための方法である。1実施形態においては、投与された薬剤は、DARPP-21のリン酸化状態を変化させる。別の1実施形態においては、投与された薬剤は、DARPP-21/カルモジュリン複合体の形成を変化させる。

【0019】

4. 図面の説明

(図面の説明については後述)

5. 発明の詳細な説明

30

本発明は、部分的には発明者らによる、生理的条件下でDARPP-21のリン酸化状態がDARPP-21とカルシウム/カルモジュリンとの相互作用を調節するとの驚くべき発見に基づいたものであり、カルシウム依存性シグナル伝達の調節について薬剤をスクリーニングする方法において用いることができる。これらの知見に基づいて、細胞内カルシウムシグナル伝達をモジュレートし、ニューロン細胞カルシウムシグナル伝達をモジュレートし、さらにドーパミン関連疾患を予防し、治療し、または症状を改善することができる薬剤の標的として、DARPP-21/カルモジュリン複合体の形成が同定されている。

【0020】

特定の理論に拘束されることは意図しないが、DARPP-21のリン酸化はDARPP-21のカルモジュリンに対する親和性を増加させ、それによって例えばカルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)およびプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)などを含むカルシウムシグナル伝達経路の構成成分を競合的に阻害するものと考えられている。DARPP-21のリン酸化はPKAのドーパミン刺激を伴うので、PKAのドーパミン刺激はカルシウムシグナル伝達のメカニズムと関連している。この経路では、D1受容体の活性化はアデニル酸シクラーゼによるcAMPの合成を刺激し、それが次いでPKAを活性化し、他のタンパク質の中でもとりわけDARPP-21のリン酸化をもたらす。このように、本発明はニューロン内でのカルシウムシグナル伝達を調節するリン酸化依存性メカニズムを説明するものである。

40

【0021】

本発明の1つの目的は、ドーパミン作動性シグナル伝達経路、特にDARPP-21関連ドーパミン作動性シグナル伝達経路をモジュレートする能力について薬剤をスクリーニングする

50

方法である。1実施形態においては、そのような方法は細胞または組織におけるカルシウムシグナル伝達をモジュレートする能力についての薬剤のスクリーニングに関する。

【0022】

本発明の1態様は、ニューロンのカルシウム依存性シグナル伝達を、脳組織内でのDARPP-21のリン酸化に影響を及ぼすことによって調節する、新規の治療剤をスクリーニングする方法を提供する。なおDARPP-21のリン酸化の調節はカルシウム依存性シグナル伝達の変化をもたらす。その方法は、*in vivo*または*in vitro*のいずれかで細胞または組織内でDARPP-21のリン酸化をモジュレートすることができる薬剤を同定することを含、い。本発明では、「モジュレートする」とは、DARPP-21のリン酸化に関連して用いられる場合には、リン酸化の増加または減少のいずれかと定義される。該方法は、細胞または組織を被験薬剤で処理する前後の両方でのDARPP-21のリン酸化レベルの測定に基づくものであるか、あるいはまた、細胞または組織の被験薬剤での処理後のDARPP-21のリン酸化のレベルを測定し、対照または既知の標準品でのレベルと比較することに基づくものでもよい。

10

【0023】

非限定的な1つの例においては、そのような方法は細胞または組織の第1のサンプルまたは対照サンプルにおけるDARPP-21の第1のリン酸化レベルを測定し；細胞または組織の第2のサンプルをカルシウムシグナル伝達を調節する能力について試験する薬剤と接触させ；それらの細胞または組織におけるDARPP-21の第2のリン酸化レベルを測定し；第1のリン酸化レベルと第2のリン酸化レベルを比較することを含む方法であり、ここでそれらのリン酸化レベル間の差は、DARPP-21のリン酸化をモジュレートし、それによりカルシウムシグナル伝達をモジュレートする能力を示している。1実施形態においては、該細胞または組織は脳の細胞または組織である。このような方法ではさらに、その薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質の生物活性、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼのような酵素などの生物活性をモジュレートするかどうか試験することを含んでもよい。

20

【0024】

この方法の特定の実施形態においては、該細胞または組織は脳細胞または脳組織である。*in vivo*および*in vitro*での適用には、限定はされないが、動物体全体、組織切片、破壊した細胞の調製物、インタクトな細胞、および単離精製した細胞調製物における活性のモジュレートを含む。細胞または組織としては、限定はされないが、興奮細胞、例えば、知覚ニューロン、運動ニューロン、または介在ニューロン；グリア細胞；細胞の一次培養物、例えば、神経細胞またはグリア細胞の一次培養物；神経細胞系統またはグリア細胞系統由来の細胞；解離させた細胞；細胞体全体またはインタクトな細胞；透過化細胞；破壊した細胞調製物；単離したおよび/または精製した細胞調製物；細胞抽出物または精製酵素調製物；組織または器官、例えば、脳、脳構造物、脳切片、脊髄、脊髄切片、中枢神経系、末梢神経系、または神経；組織切片、および動物体の全体。特定の実施形態においては、該脳構造物は線条体、大脳皮質、海馬、または他の哺乳類のそれらの解剖学および/もしくは機能的同等物である。特定の実施形態においては、該細胞または組織は神経一次培養物、海馬組織外移植片、または胎児脳から得た再凝集培養物である。

30

【0025】

DARPP-21のリン酸化レベルは当業者には既知の技法によって評価することができる。そのような技法としては、例えば、放射性同位元素もしくはリン酸化状態に特異的な抗体を用いること、またはDARPP-21もしくはDARPP-21から産生されたポリペプチド断片のクロマトグラフィーもしくは電気泳動での移動度の分析、または加水分解したDARPP-21からのホスホセリンの検出、またはその他の何らかの技法を単独でまたはいずれかの組み合わせで用いることを含む。

40

【0026】

本発明の1実施形態においては、モジュレートはDARPP-21のリン酸化のレベルの増加をもたらす。別の1実施形態においては、モジュレートはDARPP-21リン酸化のレベルの低下をもたらす。

50

【0027】

別の非限定的な1つの例においては、そのような方法はDARPP-21と結合する薬剤を決定することを含んでもよい。例えば、DARPP-21と薬剤を、結合するのに十分な時間にわたり接触させ、そのDARPP-21を洗って結合していない薬剤を除去し、DARPP-21薬剤の存在をアッセイして、該薬剤がDARPP-21に結合する場合、次にカルシウムシグナル伝達をモジュレートする能力について試験すべき薬剤が同定されるというようにしてもよい。

【0028】

本発明のまた別の薬剤スクリーニングのカテゴリーは、「タンパク質-タンパク質結合アッセイ」を用いる。この用語は、本明細書中では、2種類の同一でないタンパク質（この少なくとも1方のタンパク質はカルモジュリンまたはDARPP-21）が互いに結合するか否かを測定するような任意のアッセイを意味する。このようなアッセイはスクリーニングしようとしている薬剤の不在下または存在下で行うことができる。1実施形態においては、タンパク質-タンパク質結合アッセイには、カルモジュリンもしくはDARPP-21アッセイ構成要素の単離形態、精製形態、および/もしくは組換え発現された形態のものを用いることができる。本発明の単離または精製されたポリペプチドとはそれらの天然の環境から分離（例えば、細胞由来の細胞質画分、または組換え法によって）されたものである。組換え発現ポリペプチドは、当業界ではよく知られた標準的な技法を用いて発現させ、得ることができる。別の1実施形態においては、タンパク質-タンパク質結合アッセイは単離されていない、または精製していないタンパク質を用いて行われる。

【0029】

別の非限定的な1つの例においては、そのような方法は、薬剤の存在下でDARPP-21およびカルモジュリンを含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを使用すること、および、該薬剤がDARPP-21とカルモジュリンの間のタンパク質-タンパク質結合を阻害するかまたは増強するかを決定することを含み、かつ、タンパク質-タンパク質結合の阻害または増強が、その薬剤が細胞内カルシウムシグナル伝達をモジュレートすることを示す方法であってもよい。そのような方法は、例えば、その薬剤がDARPP-21および/またはカルモジュリンと結合するかどうかをまず試験し、該薬剤がDARPP-21および/またはカルモジュリンと結合する場合には、次いでその薬剤をタンパク質-タンパク質結合アッセイで試験することをさらに含んでもよい。このような方法は、さらに、あるいは代替的に、該薬剤が、例えば、カルモジュリン依存性キナーゼI(CaMKI)および/またはプロテインホスファターゼ2B(カルシニューリン)の生物活性をモジュレートするか否かを試験することをさらに含むものでもよい。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を有する。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。

【0030】

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、そのペプチドとDARPP-21との結合がカルモジュリンによって阻害または増強されるような候補DARPP-21結合ペプチドをスクリーニングする方法であって、カルモジュリンの存在下でDARPP-21および候補DARPP-21結合ペプチドを含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、カルモジュリンがそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定することを含む。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含んでいる。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。これらの方法はさらに、上記薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼのような酵素などの生物活性をモジュレートするかどうかを試験することを含んでもよい。

【0031】

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、カルモジュリンとのその結合がDARPP-21によって阻害または増強されるような候補カルモジュリン結合ペプチドをスクリーニングする方法であって、DARPP-21の存在下でカルモジュリンおよび候補カルモジュリン結合ペプチドを含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、DARPP-21がそのタンパク

10

20

30

40

50

質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定することを含む方法である。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含む。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。これらの方法はさらに、該薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼのような酵素などの生物活性をモジュレートするかどうかを試験することを含んでもよい。

【0032】

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、DARPP-21とのその結合がカルモジュリンによって阻害または増強される候補DARPP-21結合薬剤（例えば候補ペプチド）をスクリーニングする方法であって、カルモジュリンの存在下でDARPP-21および候補ペプチドを含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、カルモジュリンがそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強させるかを決定することを含む方法である。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含んでいる。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。これらの方法はさらに、該薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼのような酵素などの生物活性をモジュレートするかどうかを試験することを含んでもよい。

10

【0033】

このような方法のまた別の非限定的な1つの例は、カルモジュリンとのその結合がDARPP-21によって阻害または増強される候補カルモジュリン結合薬剤（例えば候補ペプチド）をスクリーニングする方法であって、DARPP-21の存在下でカルモジュリンおよび候補ポリペプチドを含むタンパク質-タンパク質結合アッセイを行い、DARPP-21がそのタンパク質-タンパク質結合を阻害するか増強するかを決定することを含む方法である。1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含む。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。これらの方法はさらに、該薬剤が、例えばカルモジュリン依存性タンパク質、例えばホスホジエステラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼもしくはアデニル酸シクラーゼのような酵素などの生物活性をモジュレートするかどうかを試験することを含んでもよい。

20

【0034】

1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含んでいる。「アミノ酸55位」とは、野生型DARPP-21中のPKAリン酸化部位（典型的にはSer⁵⁵）に対応する位置を意味するが、これについてはその部位がPKAによってリン酸化され得ない残基へと突然変異されているか否かとは無関係である。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。

30

【0035】

ある1実施形態においては、DARPP-21はアミノ酸55位に負電荷を含む。別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されていない。また別の1実施形態においては、DARPP-21はリン酸化されている。

【0036】

当業者であれば、タンパク質-タンパク質結合アッセイがin vitro、in vivo、またはin situで行うことができることを知っている。タンパク質-タンパク質結合アッセイを行う方法は当業者には公知である。2つのタンパク質が結合するか否かを決定するために適切でないかなる方法も、タンパク質-タンパク質結合アッセイの意味するところの範囲内に包含されることを意図している。従って、例えば、タンパク質-タンパク質結合アッセイは、一方のタンパク質を適切な支持体上に固定し、それを固定化されていない第2のタンパク質と接触させることを含むものでありうる（「固定化タンパク質-タンパク質結合アッセイ」）。そのような支持体は多孔性または無孔性のものとしてでき、例えば、樹脂、ビーズ、膜（例えばPVDF、ナイロン66、ニトロセルロース、プラスチックその他）、マイクロタイプレートウェル、ディップスティックなどであるが、これらに限定されない。アフィニティークロマトグラフィーを用いる固定化タンパク質-タンパク質結合ア

40

50

ッセイの2つの例を下記の第6.4.3節に示している。その他のタンパク質-タンパク質結合アッセイの代表的なものとしては、可能性を限定する意図はないが、共分画、免疫共沈(一例として第6.4.2節を参照せよ)、重層プロットング(例えば、Murrayら, 2001, *Biotechniques* 30:1036-42)、ゲル排除、クロマトフォーカシング、沈降、酵母2-ハイブリッドシステム(一例として第6.4.1項を参照せよ)、酵母3-ハイブリッドシステム(LicitraとLiu, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93:12817-12821)、大腸菌(*E. coli*)/BCCP双方向スクリーニングシステム(概要および参考文献としては、Germinoら, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90:1639を参照されたい。この文献はその全体を本明細書中に参照により組み入れる)、その他の使用が含まれる。

【0037】

さらに、本発明はカルシウム依存性シグナル伝達経路のモジュレーターとしての活性を有する新規の化学薬剤をデザインする方法を提供する。そのような新規の化学薬剤としては、限定はされないが、DARPP-21のリン酸化に影響を及ぼす能力により、カルシウム依存性シグナル伝達を刺激するかまたはそれを阻害することができる任意の薬剤が含まれる。また、本発明で意図されているものとしては、リン酸化DARPP-21とカルモジュリンの相互作用を妨げる薬剤、そして限定はされないが、ペプチドおよび有機小分子を含む薬剤が挙げられる。さらに、本発明には、細胞および組織においてリン酸化されたDARPP-21の活性を模倣する能力があり、かつ、それ故にそれらのDARPP-21を模倣する能力によりカルシウム依存性シグナル伝達に影響を及ぼすことのできる薬剤、ならびに該薬剤の使用が含まれる。

10

20

【0038】

本発明はまた、本発明の方法で同定された組成物をも含む。当業者であれば、ひとたび本発明のいずれかの方法で活性をモジュレートできるとして薬剤が同定されれば、その薬剤を、例えば、カルシウム依存性シグナル伝達に関与する病的状態を治療するために神経細胞におけるカルシウム依存性シグナル伝達をモジュレートするように治療に用いることができるかについてその薬剤をさらに試験することができる。従って、本発明には本スクリーニング法によって同定された組成物であってカルシウム依存性シグナル伝達に関連する疾患の治療に使用できるものも含まれる。そのような疾患としてはてんかん、統合失調症、パーキンソン病、注意欠陥多動障害、うつ病、薬物乱用、疼痛、癌、卒中、アルツハイマー病、ハンチントン病、またはトゥレット症候群などがある。好ましい実施形態は、ドーパミン関連疾患の予防、治療、または症状の改善のための組成物であってDARPP-21/カルモジュリン複合体の形成に変化をもたらすものである。

30

【0039】

本発明のさらに別の目的は、ドーパミンシグナル伝達経路中のDARPP-21の生物活性(例えば、リン酸化状態、タンパク質発現レベル、および/またはタンパク質-タンパク質相互作用)をモジュレートするための方法および組成物である。例えば、本発明は、そのような経路におけるカルシウムシグナル伝達、例えばニューロンのカルシウムシグナル伝達をモジュレートする方法および組成物を提供する。1実施形態においては、そのような方法は、細胞または組織を、シグナル伝達経路がモジュレートされるように、DARPP-21の生物活性をモジュレートする薬剤と接触させることを含みうる。その接触させる薬剤は、例えば、DARPP-21のリン酸化状態を変化させるものでありうる。その接触させる薬剤は、例えば、DARPP-21/カルモジュリン複合体の形成を変化させるものでありうる。その接触させる薬剤は、例えば、カルシウム/カルモジュリン依存性酵素の活性を阻害するDARPP-21の能力を変化させるものでありうる。

40

【0040】

本発明のまた別の目的は、ドーパミン関連疾患を予防するか、治療するか、またはその症状を改善する方法であって、それを必要とする被験者にDARPP-21の生物活性をモジュレートする薬剤を投与することによるものである。1実施形態においては、投与される薬剤は、DARPP-21のリン酸化状態を変化させる。1実施形態においては、投与される薬剤は、DARPP-21/カルモジュリン複合体の形成を変化させる。モジュレートされうるドーパミン関

50

連疾患としては、例えば、てんかん、統合失調症、パーキンソン病、注意欠陥障害、うつ病、薬物乱用、疼痛、癌、卒中、およびアルツハイマー病などの疾患が含まれる。

【0041】

本明細書で述べた方法によって同定された薬剤はいずれも、本発明のモジュレート関連方法および/または治療関連方法の一部として用いることができる。さらに、DARPP-21の生物活性をモジュレートする薬剤はいずれも、それらの方法の一部として用いることができる。本発明のモジュレート関連方法および/または治療関連方法の一部として用いることのできる薬剤の中には、DARPP-21のリン酸化状態に直接的にまたは間接的に影響を及ぼす薬剤がある。例えば、PKAを活性化または阻害する薬剤は、DARPP-21リン酸化にも影響を及ぼすことができ、結果としてカルシウムシグナル伝達に影響を及ぼす。そのようなものとして例えば、ドーパミンD1受容体および/またはドーパミンD2受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを用いることができる。

10

【0042】

さらに、セロトニンはセロトニン受容体の刺激を介してPKA活性に影響を与える。特定の実施形態においては、用いる薬剤はセロトニン受容体、例えば5-HT4または5-HT6に対してリガンドとして作用する。例えば、ある薬剤は選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)でありうる。

【0043】

グルタミン作動性受容体の活性化はPKAのダウンレギュレーションをもたらすことが知られている。例えば、代謝調節型グルタミン酸受容体タイプI(mGluR1)はカゼインキナーゼI(CKI)を刺激し、そのCKIは次いでcdk5を活性化する。cdk5キナーゼはDARPP-32をThr⁷⁵にてリン酸化する。ホスホDARPP-32はPKAを阻害し、DARPP-21の脱リン酸化を促進する。従って、用いる薬剤には、グルタミン酸受容体リガンド、カゼインキナーゼI、cdk5、もしくはDARPP-32、またはそれらに対するアゴニストもしくはアンタゴニストがある。別の1実施形態においては、本発明の組成物はコレシストキニンであり、これはグルタミン酸、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの放出を刺激する。

20

【0044】

PKAの活性化をもたらす調節経路のさらに別のポイントとしては、ある種のGタンパク質およびアデニル酸シクラーゼが挙げられる。すなわち、これらのタンパク質ファミリーを調節する薬剤、例えば、フォルスコリンおよび百日咳毒素を、本明細書に記載の方法で薬剤として用いることができる。セカンドメッセンジャーであるcAMP(これは、例えば8-ブロモ-cAMPなどのそのホスホジエステラーゼ抵抗性の類似体と同様に、PKAを活性化する)は、DARPP-21を介してカルシウムシグナル伝達に影響を及ぼすことができるさらなる組成物である。それらのモジュレーターの中で、PKA基質のリン酸化レベルに影響を及ぼすその他の重要なタンパク質としては、ホスホジエステラーゼ、ならびにPKAを含むキナーゼおよびその阻害剤、例えばPKI、Rp-cAMPS、PKA調節サブユニット、ホスホ-Thr⁷⁵-DARPP-32、ならびにH89、ならびにホスファターゼ(例えば、PP1およびPP2A)およびそのアクチベーターまたは阻害剤(例えばオカダ酸、カリクリン、およびカンタリジンとそれらのホスファターゼ阻害剤の類似体など)が挙げられる。

30

【0045】

カルモジュリンの結合に直接的に影響を及ぼす薬剤、好ましくはカルモジュリンのDARPP-21との結合を阻害または増強させるものを、本明細書に記載の方法の一部として用いることもできる。DARPP-21またはそれに対するアゴニストもしくはアンタゴニストのリン酸化によって影響を受けるカルシウムシグナル伝達経路の構成成分も、本明細書に記載の方法の一部として用いることができる。例えば、ホスホ-DARPP-21はカルシニューリンの競合的阻害剤であり、カルシニューリンの基質としては、ダイナミン(dynamin)およびタウ因子などのエンドサイトーシス関連タンパク質および細胞骨格関連タンパク質、NMDA受容体を含むチャネル/受容体タンパク質、PKAのタイプII調節サブユニットなどのキナーゼ、DARPP-32を含むキナーゼ活性モジュレート剤、NOシンターゼなどの酵素、ならびにEIk-1およびNFAT4などの転写因子が含まれる。第6.5節に記載のとおり、DARPP-21はまたCaMKI

40

50

をも阻害し、さらにCaMKIそれ自体が、CaMKK、シナプス小胞放出に關与するシナプシンIおよびIIなどのタンパク質、ならびにCREBおよびATF-1を含む転写因子などの基質をリン酸化する。従って、これらの化合物の任意のもの、またはそれらに対するアゴニストもしくはアンタゴニストは、本明細書に記載の方法の一部として薬剤として用いることができる。

【0046】

下記の非限定的実施例は本発明をさらに説明するために提示するものである。

【実施例】

【0047】

6. 例証的实施例

下記の実施例は本発明の原理と利点を説明するためのものである。これらの実施例はいかなる意味においても本発明を限定することを意図したものではない。

【0048】

6.1 実施例1: タンパク質リン酸化反応

リン酸化されたDARPP-21を調製するために、既に報告(Caporasoら, 2000, Neuropharmacology 39:1636-1643)されているように[γ - 32 P]ATPをPKAの触媒性サブユニットとともに用いることによって、タンパク質DARPP-21をin vitroでリン酸化した。リン酸化の化学量論により、DARPP-21の95%がリン酸化されていることが判った。

【0049】

6.2 実施例2: 免疫染色

免疫染色はサンプル中のカルモジュリンまたはDARPP-21の検出のために次のようにして用いた。カルモジュリンのウエスタンブロット解析は、Van EldikとWolchokが報告している方法(1984, BBRC 124:752-759)にマイナーな改変を加えて行った。タンパク質は、SDS-PAGEで分離し、次いで電気泳動により20分間(カルモジュリン)、または60分間(DARPP-21)かけてPVDF膜に転写した。続いてその膜をリン酸塩緩衝生理食塩液(PBS)で2回すすぎ、0.2%グルタルアルデヒド/PBSで室温で45分間かけて固定した。次いで、その膜をPBS/0.05% Tween-20中で5% 粉ミルク溶液を用いて1時間ブロックした後、一次抗体とインキュベートした。DARPP-21はウサギポリクローナル#204抗体またはモノクローナル6A抗体を用いて同定した。抗カルモジュリンモノクローナル抗体はUpstate Biotechnology, Inc, (Lake Placid, NY)から入手した。

【0050】

6.3 実施例3: 融合タンパク質の構築と発現

融合タンパク質の構築および発現のために、DARPP-21フォワードプライマー(5'-AGCGAATTCATGTCTGAGCAAGGAGAACT-3'; 配列番号1)およびDARPP-21リバープライマー(5'-ACGGGATCCGGAGAGTCTGATCCTGGTGAC-3'; 配列番号2)を用いてDARPP-21 cDNAを増幅し、さらに酵母においてDARPP-21/Lex A融合タンパク質を作製した。Alaフォワードプライマー(5'-ACCTGCTCCTGACTTGGCTTTTCTTCTCTTG-3'; 配列番号3)、Aspフォワードプライマー(5'-CAAGAGAG AAGAAAAGACAAGTCAGGAGCAGGT-3'; 配列番号4)、およびAspリバープライマー(5'-ACCTGCTCCTGACTTGTCTTTTCTTCTCTTG-3'; 配列番号5)を用いて、Ser⁵⁵の置換としてそれぞれAlaまたはAspを有するDARPP-21突然変異体を作製した。ここで得られた変異はDNA配列決定によって確認した。Caporasoら(2000, Neuropharmacology 39:1636-1643)が報告しているようにして、DARPP-21のC末端 6x Hisタグ融合タンパク質を作製し、発現させ、精製した。

【0051】

6.4 実施例4: カルモジュリンとDARPP-21が關与するタンパク質-タンパク質相互作用についてスクリーニングするためのタンパク質-タンパク質結合アッセイ

6.4.1 酵母2-ハイブリッドタンパク質-タンパク質結合アッセイ

タンパク質-タンパク質結合アッセイは、酵母株EGY48においてDupLexAシステム(Origen e Technologies, Rockville, MD)を用いる酵母2-ハイブリッドシステムにて行った。LexAとDARPP-21の融合タンパク質を作製するために、DARPP-21 cDNAをpEG202ベイト(餌)ベクターのEcoRI-XhoI部位にサブクローニングした。オリゴdTプライマー増幅ラット脳ライブ

10

20

30

40

50

ラリー (Origene Technologies, Rockville, MD) を含んでいるプレイ (捕食) ベクターを、B 42 酸性プロブ (blob) ドメインに結合させ、gal-1プロモーターによって制御した。

【0052】

酵母を、酢酸リチウムプロトコルを用いて、ベイト、すなわち pSH18-34 lacZ 担持プレイ cDNA ライブラリー含有プラスミドにより、順次、形質転換した。形質転換の効率は、 4×10^6 の独立クローンからなるライブラリーの複雑性から、 10^6 と見積もった。陽性クローンは形質転換の3~7日後に出現した。ベイト-プレイ相互作用は、培地 (gal)(-his, -trp, -ura, -leu) 上での増殖強度によって評価した。その相互作用の特異性は、X-gal 染色および交配アッセイ (Origene Technologies, Rockville, MD) で確認した。

【0053】

カルモジュリン-DARPP-21相互作用を確認し、カルモジュリンのDARPP-21変異体との結合を比較するために、EGY48酵母細胞を、ベイト、プレイ、およびlacZレポータープラスミドで形質転換し、(gul)(-his, -trp, -ura)のプレート上に播いた。4日後、選択したコロニーを液体培地(+raf)(-his, -trp, -ura)中に移し、30℃で激しく攪拌しつつ一晩増殖させた。この培養物の10倍希釈系列を調製し、それを、(gul)(-his, -trp, -ura)(陽性対照)、(gul)(-his, -trp, -ura, -leu)(陰性対照)、および(gal)(-his, -trp, -ura, -leu)の試験プレート上にスポット(10μL)した。

10

【0054】

最初のタンパク質-タンパク質結合アッセイの代表的な結果では、完全長のカルモジュリン配列を含んだ1500塩基対(bp)のcDNAが回収された。酵母内でのDARPP-21-カルモジュリン相互作用は、ガラクトース/グルコース試験(図1)、得られたコロニーの白色/青色染色、および交配試験を用いて確認した。

20

【0055】

DARPP-21はPKAの基質であるので、DARPP-21のリン酸化状態とDARPP-21のカルモジュリンとの結合の間の関連を調べるために、酵母2ハイブリッドタンパク質-タンパク質結合アッセイを用いて実験を行った。DARPP-21中のSer⁵⁵がAlaに変異すると、カルモジュリンとの相互作用は完全に阻害された(図2)。しかし、セリンを負に荷電したアスパラギン酸と置換するとそのような効果はなかった。これらのデータは、酵母においては、カルモジュリンは、絶対的にそうであるとは言えないとしても、主として、DARPP-21のリン酸化状態と相互作用することを示した。

30

【0056】

6.4.2 免疫共沈タンパク質-タンパク質結合アッセイ

ウシ線条体(2グラム)を10mLのバッファA(150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 7.5, 0.5mM CaCl₂, 1% Triton X-100、およびEDTA不含のプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)を含有したもの)中でホモジナイズした。不溶物を100,000 x gで15分間かけて簡易遠心分離することによって除去した。その上清をバッファAで希釈して最終タンパク質含量を1 mg/mLとした。その抽出物(1mL)を抗カルモジュリン抗体または抗DARPP-21抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。プロテインA-Sepharoseスラリー(50% w/vの70μL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を各サンプルに添加し、それらのサンプルをさらに3時間インキュベートした。ビーズを、300mM NaClを含有する改変バッファAで3回洗い、結合したタンパク質をSDS-PAGEサンプルバッファで溶出させた。得られたサンプルを4~20%勾配SDS Tris/グリシングル(Novex)で分画し、上記の第6.2節に記載の免疫染色で分析した。

40

【0057】

図3に示した代表的な結果は、線条体抽出物由来のカルモジュリンとDARPP-21を、ポリクローナル抗DARPP-21抗体が免疫共沈させることができることを示している。

【0058】

6.4.3 固定化タンパク質-タンパク質結合アッセイ

6.4.3.1 DARPP-21-Sepharoseを用いたアフィニティークロマトグラフィー

精製組換えDARPP-21(2~5mg)を、2mLのAminolink Sepharose(Pierce Inc., Rockford,

50

IL)に、共有結合により架橋した。凍結線条体抽出物(2g)を前述のバッファーA中でホモジナイズした。ビーズへの非特異的なタンパク質結合を避けるために、線条体抽出物(1mg/mL)は、4mLのSepharose 4Bを含有する模擬カラムを通過させた。その溶出物を半分ずつ2つに分け、第1の半量をDARPP-21を固定化したカラムにアプライし、第2の半量は模擬カラムを通過させた。カラムを150mM NaClと20mM Tris pH7.5で洗い、10mM EGTA/20mM Tris pH7.5; 2mM NaClおよび6M グアニジニウムHClで溶出した。各溶出ステップからのサンプルをSDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写し、抗DARPP-21特異的抗体によってプローブした。

【0059】

結果は、カルモジュリンはDARPP-21を含有するカラムからだけ溶出され、模擬カラムからは溶出されないことを示していた(図4)。

10

【0060】

6.4.3.2 カルモジュリン-Sepharoseを用いたアフィニティークロマトグラフィー

DARPP-21(0.1mg/mLのものを0.5mL)を、バッファーB(100mM NaCl、20mM Tris pH7.5、1mM MgCl₂、0.5mM CaCl₂、1mM DTT)または0.5mM CaCl₂の代わりに1mM EGTAを含有するバッファーC中に入れた0.5mLの1mg/mLカルモジュリン-Sepharose(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)にアプライした。ビーズを、数倍量の300mM NaClおよび20mM Tris pH7.5を含有するバッファーDで洗い、結合しているタンパク質を10mM EGTA/20mM Tris pH7.5で溶出させた。

【0061】

結果は、DARPP-21の結合はカルシウムを平衡化させたカラム内でのみ検出され、従ってタンパク質-タンパク質相互作用はカルシウム依存性の様式で起こることを示した(図5)。

20

【0062】

6.5 実施例5: リン酸化されたDARPP-21によるカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質の阻害

DARPP-21を第6.1節に記載のようにしてリン酸化した。CaMKIおよびカルシニューリンのキナーゼ活性およびホスファターゼ活性のそれぞれに対するin vitro阻害研究は、当業界の標準的な技法に従って行った。

【0063】

リン酸化されたDARPP-21は、IC₅₀ 1.2 μMでCaMKIを阻害した(図6)。リン酸化されたDARPP-21はまた、IC₅₀ 1 μMでカルシニューリンを阻害した(図7)。同じ濃度のリン酸化されていないDARPP-21は、CaMKI活性またはカルシニューリン活性のいずれに対しても影響を与えなかった。これらのデータは、リン酸化されたDARPP-21がカルモジュリンとの競合的カルシウム依存性結合を介してキナーゼ活性およびホスファターゼ活性の双方を阻害することを示した。

30

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は、ガラクトース/グルコース試験を用いて酵母中でDARPP-21がカルモジュリンと相互作用することを示した、酵母2-ハイブリッドタンパク質-タンパク質結合アッセイの代表的な結果を示している。

【図2】図2は、DARPP-21中のSer⁵⁵をアラニンに突然変異させるとカルモジュリンとDARPP-21の結合が失われるため、ホスホ-Ser⁵⁵-DARPP-21のみがカルモジュリンと結合することを示した、酵母2-ハイブリッドタンパク質-タンパク質結合アッセイの代表的な結果を示している。

40

【図3】図3は、ウシの脳から調製した線条体抽出物から得たカルモジュリンおよびDARPP-21をポリクローナル抗DARPP-21抗体が免疫共沈させることを示した、免疫共沈タンパク質-タンパク質結合アッセイの代表的な結果を示している。

【図4】図4は、固定化DARPP-21カラム(+ レーン)ではカルモジュリンとDARPP-21との間の特異的結合が認められるが対照カラム(- レーン)では認められないことを示した、DARPP-21アフィニティークロマトグラフィーを用いた固定化タンパク質-タンパク質結合アッセイの代表的な結果を示している。

50

【図5】図5は、カルシウムの存在下ではカルモジュリンとDARPP-21との間の特異的結合が認められるが、カルシウム不在下では認められないことを示した、カルモジュリンアフィニティークロマトグラフィーを用いた固定化タンパク質-タンパク質結合アッセイの代表的な結果を示している。

【図6】図6は、リン酸化されたDARPP-21によってCaMKIは選択的に阻害されるが、リン酸化されていないDARPP-21によっては阻害されないことを示している。

【図7】図7は、リン酸化されたDARPP-21によってカルシニューリンは選択的に阻害されるが、リン酸化されていないカルシニューリンによっては阻害されないことを示している。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Greengard, Paul
 Rakhilin, Sergey
 Nairn, Angus

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR REGULATION OF CALCIUM-DEPENDENT
 SIGNALING IN BRAIN

<130> 11181-006-228

<150> US 60/358,548
 <151> 2002-02-21

<160> 5 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 1
 agcgaattca tgtctgagca aggagaact 29

<210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 2
 acgggatccg gagagtctga tcttggtgac 30

<210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Primer

<400> 3
 acctgctcct gacttggtt ttcttctctc ttg 33

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer 40

<400> 4
caagagagaa gaaaagacaa gtcaggagca ggt

33

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

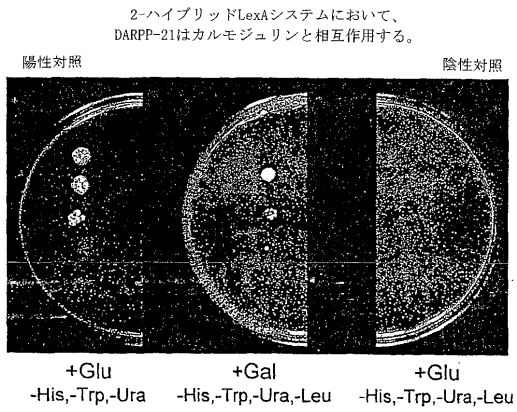
<220>
<223> Primer

<400> 5
acctgctcct gacttgtctt ttcttctctc ttg

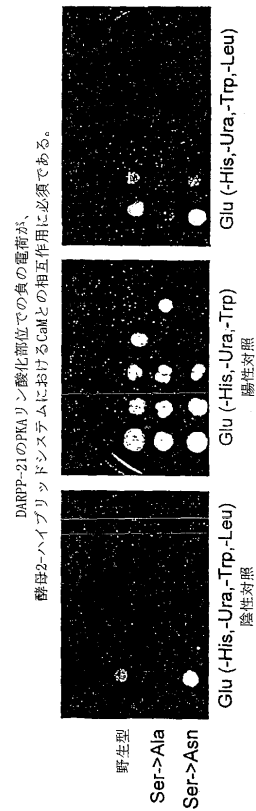
33

10

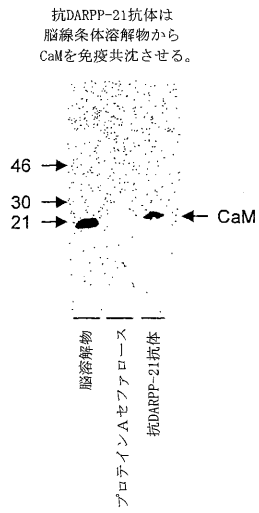
【 図 1 】



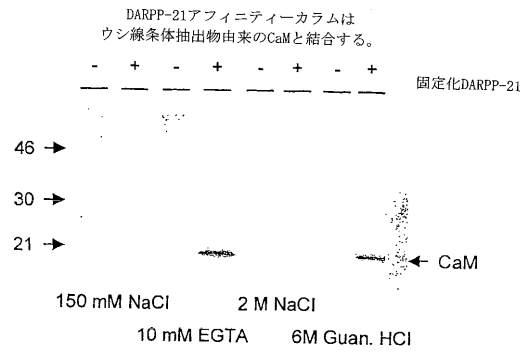
【 図 2 】



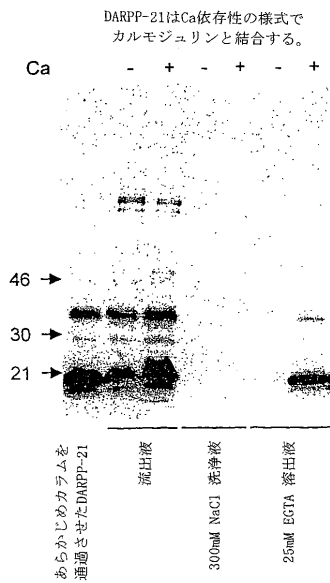
【 図 3 】



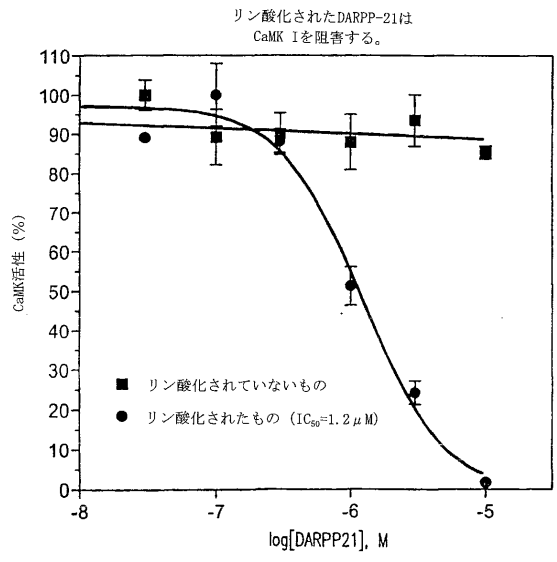
【 図 4 】



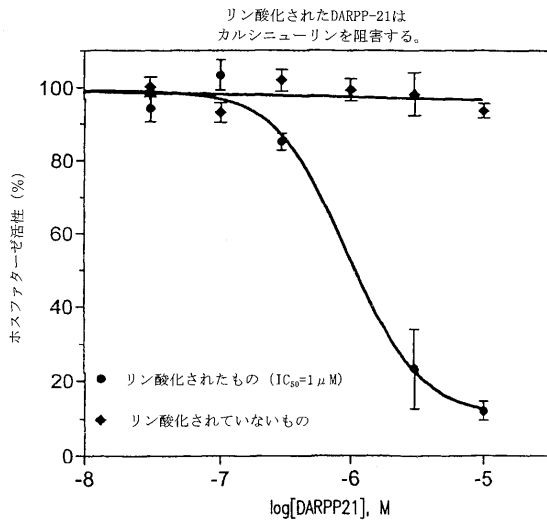
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/05273
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 49/00, 31/00, 38/00; G01N 33/53, 33/542; A01N 61/00, 37/18 US CL : 424/9.2, 514/1, 2; 435/7.1, 7.9, 7.91 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) U.S. : 424/9.2, 514/1, 2; 435/7.1, 7.9, 7.91		
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) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, USPATFULL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CENTONZE et al. Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. European J. Neuroscience, 2001, Vol. 13, pp.1071-1077.	1-28
A	FIENBERG et al. The DARPP-32 knockout mouse. 2000, Brain Research Reviews, pp. 313-319.	1-28
A	GREENGARD. The neurobiology of dopamine signalling. 2001, Bioscience Reports, Vol. 21, No. 3, pp.247-269.	1-28
<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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 19 February 2004 (19.02.2004)		Date of mailing of the international search report 23 MAR 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer: <i>Oleg N. Chernyshev</i> Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/30	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/42	
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ラキーリン, セルゲイ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 8 ニューヨーク州, ヨークタウン, ボールドウィン ロード 1 8 7
0 ナンバー 1 3

(72) 発明者 ナイルン, アンガス

アメリカ合衆国 1 0 0 2 8 ニューヨーク州, ニューヨーク, イースト エイティーフォース
ストリート 3 2 5, アパートメント 3 ビー

F ターム(参考) 2G045 BB24 CB01 DA36 FB03

4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ27 QQ33 QQ41 QQ61 QQ89

QQ91 QQ95 QR75 QR76 QR77 QR80 QS31 QS36

4B065 AA90X BA30 CA43 CA44 CA46

4C084 AA17 NA14 ZA02 ZA06 ZA08 ZA15 ZA16 ZC20 ZC39 ZC41

专利名称(译)	用于调节脑中钙依赖性信号传导的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2005526502A	公开(公告)日	2005-09-08
申请号	JP2003571481	申请日	2003-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
[标]发明人	グリーンガードポール ラキーリンセルゲイ ナイルンアンガス		
发明人	グリーンガード,ポール ラキーリン,セルゲイ ナイルン,アンガス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/30 A61P35/00 A61P43/00 C12N5/06 C12Q1/02 C12Q1/42 C12Q1/48 C40B30/04 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/68		
CPC分类号	A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/30 C12Q1/485 C40B30/04 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5058 G01N33/5082 G01N33/5088 G01N33/6872 G01N2500/02		
FI分类号	C12N5/00.ZNA.E A61K45/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/30 A61P35/00 A61P43/00.111 C12Q1/02 C12Q1/42 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ27 4B063/QQ33 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QQ95 4B063/QR75 4B063/QR76 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS31 4B063/QS36 4B065/AA90X 4B065/BA30 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA06 4C084/ZA08 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZC20 4C084/ZC39 4C084/ZC41		
优先权	60/358548 2002-02-21 US		
其他公开文献	JP2005526502A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于筛选在脑组织中作为钙信号传导调节剂的活性的试剂的方法。

特表2005-32650
(2005-526502)

(43)公表日 平成17年9月8日(2005.9.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00 Z N A E	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続	
(21) 出願番号 特願2003-571481 (P2003-571481)	(71) 出願人 592054292	ザ ロックフェラー ユニバーシティー
(86) (22) 出願日 平成15年2月21日(2003.2.21)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100
(85) 翻訳文提出日 平成16年10月15日(2004.10.15)		21-6399, ニューヨーク, ヨークア
(86) 国際出願番号 PCT/US2003/005273		ベニュー 1230
(87) 国際公開番号 WO2003/072801	(74) 代理人 100091096	弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日 平成15年9月4日(2003.9.4)	(74) 代理人 100096183	弁理士 石井 貴次
(31) 優先権主張番号 60/358,548	(74) 代理人 100118773	弁理士 藤田 郎
(32) 優先日 平成14年2月21日(2002.2.21)	(72) 発明者	グリーンガード, ポール
(33) 優先権主張国 米国 (US)		アメリカ合衆国 10021 ニューヨ
		ーク州, ニューヨーク, イースト シックス
		ティナインス ストリート 362
		最終頁に続く