

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4580618号
(P4580618)

(45) 発行日 平成22年11月17日(2010.11.17)

(24) 登録日 平成22年9月3日(2010.9.3)

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| A O 1 K 67/027 (2006.01) | A O 1 K 67/027 |
| C O 7 K 14/47 (2006.01) | C O 7 K 14/47 |
| C O 7 K 19/00 (2006.01) | C O 7 K 19/00 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 0 2 |
| 請求項の数 40 (全 55 頁) 最終頁に続く | |

(21) 出願番号 特願2002-559452 (P2002-559452)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月2日(2002.1.2)
 (65) 公表番号 特表2004-531224 (P2004-531224A)
 (43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000005
 (87) 国際公開番号 W02002/059150
 (87) 国際公開日 平成14年8月1日(2002.8.1)
 審査請求日 平成16年12月15日(2004.12.15)
 (31) 優先権主張番号 0100119.7
 (32) 優先日 平成13年1月3日(2001.1.3)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

前置審査

(73) 特許権者 507092584
 ウイスタ・ラボラトリーズ・リミテッド
 W I S T A L A B O R A T O R I E S
 L T D.
 シンガポール国、シンガポール 1 3 9 9
 4 8、ナンバー07-01/02、アイア
 ー・ラジャ・クレッセント 5 1
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100116919
 弁理士 齋藤 房幸
 (74) 復代理人 100141357
 弁理士 鈴木 音哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患におけるタンパク質凝集に関する材料および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タウタンパク質が、病理学的に凝集する病態に伴うタウタンパク質の病理学的状態を誘導するか、またはモデル化する方法であって、

(a) (i) 配列番号 2 に示す全長のタウタンパク質のアミノ酸 2 9 6 ~ 3 9 0 を含む凝集部分と、(i i) シグナル配列である異種性膜局在部分とを含む、膜局在可能な融合タンパク質を提供する工程、

(b) タウタンパク質の高親和性捕捉部位を別のタウタンパク質の凝集を促進するように暴露させるようにし、タウタンパク質のタンパク質分解性プロセッシングをもたらすように融合タンパク質を膜に導入する工程であって、ただし導入はヒト生体に対しては行われない工程

を特徴とする方法。

【請求項 2】

病態におけるタウタンパク質の凝集が、神経変性および/または臨床的痴呆に伴う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

疾患が、ピック病、進行性核上性麻痺、アルツハイマー病から選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

融合タンパク質の凝集部分が、配列番号 2 に示す全長のタウタンパク質のアミノ酸残基

296～390、190～441または190～390からなる、請求項1記載の方法。

【請求項5】

(a) 膜局在形態の融合タンパク質を提供すること；
 (b) 融合タンパク質を一以上の可能性のある結合パートナーと接触させること、ここで、該接触工程は、細胞内であり、結合パートナーは、細胞内に存在する；
 (c) 可能性のある結合パートナーが、融合タンパク質に結合するかどうかを決定すること；
 の工程を含む、タウ高親和性捕捉部位の特異的結合パートナーに関してスクリーニングするための、請求項1～請求項4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

(a) 膜局在形態の融合タンパク質を提供することと；
 (b) 融合タンパク質および別のタウタンパク質間の相互作用を引き起こすか、または可能にすることと；
 (c) 別のタウタンパク質の凝集の程度をモニターリングすること；
 の工程を含む、タウタンパク質の凝集を誘導するための、請求項1～請求項4のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

膜が、細胞膜であり、そして凝集が、細胞内で生じる、請求項6記載の方法。

【請求項8】

工程(a)が、
 細胞内に融合タンパク質を導入して、それが細胞内の膜で膜局在化するようにすること、または
 融合タンパク質をコードする核酸を細胞内に導入して、融合タンパク質を細胞において発現させ、そして細胞内の膜で膜局在化するようにすること、
 のいずれかからなる、請求項7記載の方法。

【請求項9】

別のタウタンパク質が、細胞に生来のものである、全長の可溶性タウである、請求項8記載の方法。

【請求項10】

別のタウタンパク質をコードする核酸を、細胞内に導入し、別のタウタンパク質が細胞において発現される工程を含み、別のタウタンパク質が、細胞に対して異種性である、請求項7または請求項8記載の方法。

【請求項11】

融合タンパク質が、構成プロモーターの転写制御下で発現され、そして別のタウタンパク質が、誘導剤の存在下、誘導プロモーターの転写制御下で発現される、請求項10記載の方法。

【請求項12】

別のタウタンパク質が、(i) タウタンパク質の突然変異体または(ii) 全長の可溶性タウタンパク質であるタウの誘導體である、請求項10または請求項11記載の方法。

【請求項13】

別のタウタンパク質が、病態に伴うことが解っているか、または推測されるものに対応する変異を組み込む、請求項12記載の方法。

【請求項14】

以下の種類：(i) 凝集していない融合タンパク質および/または別のタウタンパク質；(ii) 融合タンパク質および/または別のタウタンパク質の凝集物；(iii) その凝集の結果である別のタウタンパク質のタンパク質分解性フラグメント；のいずれか一つまたはそれ以上の濃度またはレベルをモニターリングすることにより凝集をモニターリングする、請求項6～請求項13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

タウの18または25kDaのフラグメントのレベルに基づいて凝集をモニターリング

10

20

30

40

50

する、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

モニターリングの工程が、(i) 融合タンパク質；(ii) 別のタウタンパク質；(iii) その凝集の結果である別のタウタンパク質のタンパク質分解性フラグメント、のいずれかに特異的な抗体の使用を含む、請求項 14 または請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

融合タンパク質が、別のタウタンパク質と免疫学的に区別され、そして(i) タウの配列番号 2 の 16 位の G l y および 26 位の G l n の間の領域に位置するヒト特異的エピトープに特異的であるか、(ii) 配列番号 2 の 391 位の G l u でランケートされたコアタウフラグメントに特異的であるか、(iii) 反復ドメインにおける一般的なタウエピトープに特異的であるか、または(iv) 配列番号 2 の 208 位の S e r および 238 位の S e r の間に位置する種特異的でない一般的なタウエピトープに特異的であるモノクローナル抗体から抗体が選択される、請求項 16 記載の方法。

10

【請求項 18】

(a) 凝集を調整できることが予測される作用物質の存在下で、請求項 6 ~ 請求項 17 のいずれか一項記載の方法を実施すること；

(b) 凝集の程度をモニターリングすること；
を含む、タウタンパク質の凝集モジュレーターを同定する方法。

【請求項 19】

(c) 凝集の程度を作用物質の調整活性と関連させること；および/または、
(d) 作用物質の存在下で得られた結果を作用物質の不在下で得られた結果と比較すること；

20

をさらに含む、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

細胞内で実施される、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

細胞が、ニューロン細胞系または繊維芽細胞系に由来する、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

細胞が、ヒト以外のトランスジェニック動物内に含まれ、そして作用物質を動物に投与する、請求項 20 記載の方法。

30

【請求項 23】

(i) 配列番号 2 に示す全長のタウタンパク質のアミノ酸 296 ~ 390 を含む凝集部分と；(ii) シグナル配列である異種性膜局在部分とを有する膜局在可能な融合タンパク質をコードするキメラヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

【請求項 24】

凝集部分ヌクレオチド配列が、配列番号 2 のアミノ酸 296 ~ 390、190 ~ 441 または 190 ~ 390 をコードする、請求項 23 記載の核酸。

【請求項 25】

配列番号 2 に示す全長のタウタンパク質のアミノ酸 296 ~ 390 を含む凝集部分をコードする核酸をシグナル配列をコードする核酸にライゲートする工程を含み、

40

そしてシグナル配列をコードする核酸が、凝集部分をコードする核酸が挿入される組換えベクターの一部である、請求項 23 または請求項 24 記載の核酸を製造する方法。

【請求項 26】

核酸が、宿主細胞の転写に関するプロモーターに作動可能に連結されており、ここでプロモーターは誘導プロモーターであってもよい、請求項 23 または請求項 24 記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項 27】

プロモーターが、組織特異的プロモーター、プリオン特異的プロモーター、または神経特異的エノラーゼプロモーターから選択される、請求項 26 記載のベクター。

【請求項 28】

50

請求項 2 6 または請求項 2 7 記載のベクターを宿主細胞内に導入する工程であって、ただし導入はヒト生体に対しては行われない工程を含む方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 6 または請求項 2 7 記載の異種性ベクターを含有するか、またはこれで形質転換された宿主細胞。

【請求項 3 0】

ヒト以外の動物の受精卵に請求項 2 6 または請求項 2 7 記載のベクターを導入する工程を含む、タウタンパク質が、病理学的に凝集する病態に関して増強された、または加速された病理を伴うヒト以外のトランスジェニック動物モデルを調製する方法。

【請求項 3 1】

(i) 配列番号 2 に示す全長のタウタンパク質のアミノ酸 2 9 6 ~ 3 9 0 を含む凝集部分と (i i) シグナル配列である異種性膜局在部分とを含む膜局在可能な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターをその複数の細胞の内部に含む、ヒト以外のトランスジェニック動物。

【請求項 3 2】

膜局在可能な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む、請求項 3 1 記載の動物の細胞または組織。

【請求項 3 3】

動物が、げっ歯類である、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 4】

げっ歯類である、請求項 3 1 記載の動物。

【請求項 3 5】

(i) 配列番号 2 に示す全長のタウタンパク質のアミノ酸 2 9 6 ~ 3 9 0 を含む凝集部分と (i i) シグナル配列である異種性膜局在部分とを有する単離された膜局在可能な融合タンパク質。

【請求項 3 6】

宿主細胞において、請求項 2 3 または請求項 2 4 の核酸からの発現を引き起こすか、または可能にする工程を含む、請求項 3 5 記載のタンパク質を作製する方法。

【請求項 3 7】

膜局在可能な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を引き起こすか、または可能にすることを含む、タウタンパク質が病理学的に凝集する病態を請求項 3 1 記載のヒト以外のトランスジェニック動物に誘導する方法。

【請求項 3 8】

凝集を調整できると推測される作用物質の存在下で請求項 3 7 記載の方法を実施することを含む、タウタンパク質が、病理学的に凝集する病態において治療、予後または診断用薬剤として使用するための作用物質をスクリーニングする方法。

【請求項 3 9】

作用物質が、血液脳関門を通過することができる、請求項 2 2 または請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】

以下のいずれか：

(i) タウタンパク質のタンパク質分解性プロセッシングの程度；

(i i) 形成されるタウタンパク質凝集の量を低下させる作用物質の能力；

(i i i) 既に形成されているタウタンパク質凝集のレベルを排除または低減させる作用物質の能力；

を動物の脳内で測定する、請求項 2 2、3 8 または 3 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、神経変性疾患に関連するタンパク質の凝集に関連するモデル、

10

20

30

40

50

材料および方法に関する。

【 0 0 0 2 】

痴呆、例えばアルツハイマー病 (A D) の状態は、しばしば、罹患者の脳におけるタンパク質様構造、例えば - アミロイドプラークおよび神経原繊維濃縮体の細胞内および/または細胞外沈着の進行性蓄積を特徴とする。これらの病変の様相は、主に病的神経原繊維変性および脳萎縮症、ならびに認識障害と関連がある (Mukaetova-Ladinska, E. B. ら、Am. J. Pathol. 157(2): 623 ~ 636(2000))。

【 0 0 0 3 】

神経炎プラークおよび神経原繊維濃縮体の双方は、ペアードヘリカルフィラメント (P H F) を含有し、その主要な構成要素は、微小管関連タンパク質タウである (Wischik ら、PNAS USA85: 4506(1988))。プラークは、またアミロイド前駆体タンパク質のプロセシング異常から誘導される細胞外 - アミロイド原繊維をも含有する (A P P ; Kang ら、Nature 324: 733(1987))。Wischik らの論文 (「Neurobiology of Alzheimer's Disease」第2版 (2 0 0 0 年)、Dawbarn, D. およびAllen, S. J. 編、分子および細胞神経生物学シリーズ、バイオス・サイエンティフィック・パブリッシャーズ、オックスフォード) では、神経変性痴呆の病因におけるタウタンパク質の推定される役割が詳細に論じられている。

【 0 0 0 4 】

アルツハイマー病の研究によりタウの正常の形態の喪失 (Mukaetova-Ladinska ら、Am. J. Pathol. 143: 565(1993); Wischik ら、Neurobiol. Ageing, 16: 409(1995a)); Lai ら、Neurobiol. Ageing, 16: 433(1995b))、病的な P H F の蓄積 (Mukaetova-Ladinska ら、前出 (1993); Harrington ら、Dementia 5: 215(1994a); Harrington ら、Am. J. Pathol. 145: 1472(1994b); Wischik ら、前出 (1995a)) および中前頭皮質のシナプス喪失 (Terry ら、Ann. Neurol. 30: 572(1991)) が随伴認識障害と相関することが示されている。更に、シナプスの喪失 (Terry ら、前出) および錐体細胞の喪失 (Bondareff ら、Arch. Gen. Psychiatry 50: 350(1993)) の双方は、タウ反応性神経原繊維病理の形態測定と相関し、これは、分子レベルではアルツハイマー病におけるタウタンパク質プールの可溶性形態から重合形態 (P H F) にほとんどすべてが再配分されることと平行している (Mukaetova-Ladinska ら、前出 (1993); Lai ら、前出 (1995))。

【 0 0 0 5 】

タウは、選択的にスプライシングされたアイソフォームで存在し、これは、微小管結合ドメインに対応する反復配列の三つまたは四つのコピーを含有する (Gordert, M. ら、EMBO J. 8: 393 ~ 399(1989); Goedert, M ら、Neuron 3: 519 ~ 526(1989))。P H F 中のタウは、タンパク質分解性プロセシングをされてコアドメインになり (Wischik, C. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4884 ~ 4888(1988); Wischik, ら、PNAS USA 85: 4506 ~ 4510(1988); Novac, M. ら、EMBO J. 12: 365 ~ 370(1993))、これは、反復ドメインの位相変化したもから構成され; 三つの反復のみが安定したタウ - タウ相互作用に關与する (Jakes, R. ら、EMBO J. 10: 2725 ~ 2729(1991))。P H F 様タウ凝集物は、一度形成されると、さらなる捕捉の種として作用し、全長タウタンパク質のタンパク質分解性プロセシングの鋳型を提供する。 (Wischik ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11213 ~ 11218(1996))。

【 0 0 0 6 】

ペアードヘリカルフィラメント (P H F) は、その形成および蓄積中に最初に細胞質内で集合し、おそらく、P H F 集合の前または集合中にトランケートされるようになる初期のタウオリゴマーから無定形凝集物を形成する (Mena, R. ら、Acta Neuropathol. 89: 50 ~ 56(1995); (Mena, R. ら、Acta Neuropathol. 91: 633 ~ 641(1996))。次いでこれらのフィラメントは、古典的な細胞内神経原繊維濃縮体を形成し続ける。この状態では、P H F は、トランケートされたタウのコア、および全長タウを含有する微毛性外被から成る。 (Wischik, C. M. ら、Microtubule-associated proteins: modifications in disease、Avila, J., Brandt, R. およびKosik, K. S. 編 (ハーウッド・アカデミック・パブリ

10

20

30

40

50

ッシャーズ、アムステルダム) 185 ~ 241頁)。集合プロセスは指数関数的であり、正常な機能のタウの細胞性プールを消費し、そして欠損を補うために新規タウの合成を誘導する。(Lai, R. Y. K. ら、Neurobiology of Ageing 16(3): 433 ~ 445(1995))。最終的には、ニューロンの機能的障害は、細胞外濃縮体を残して、細胞死の程度まで進行する。細胞死は、細胞外濃縮体の数と高度に相関する(Wischikら、前出(2000))。濃縮体は、細胞外空間まで押し出されるので、PHFコアに関連するタウ免疫反応性の保存ではなくN-末端タウ免疫反応性の対応する損失を伴うニューロンの微毛性外被の進行性の損失であるが、(図4a; Bondareff, W. ら、J. Neuropath. Exper. Neurol. 53(2): 158 ~ 164(1994))。

【0007】

PHF内に組み込まれたタウの反復ドメインにおける位相変化は、反復ドメインがフィラメントへの組み込みの間に誘導される立体配座変化を被ることを示唆している。アルツハイマー病の発症の間に、この立体配座変化が病的基質、例えば損傷を受けるかまたは変異した膜タンパク質へのタウの結合により開始され得ることが認識されている。(図19a - またWischik, C. M. ら、Microtubule-associated proteins: modifications in disease, Avila, J., Brandt, R. およびKosik, K. S. 編(ハーウッド・アカデミック・パブリッシャーズ、アムステルダム) 185 ~ 241頁)をも参照)。

【0008】

アルツハイマー病の場合、現在の薬学的治療法は、神経変性の結果であるコリン作動性伝達の喪失の症状の処置に焦点が置かれている(Mayeux, R. ら、New Eng. J. Med. 341: 1670 ~ 1679(1999))。しかしながら、利用可能な処置は、疾患の進行を6から8カ月遅らせるが、それを防御することはない。神経変性に至るタウの凝集を防御する薬物の発見により、凝集を開始する多様な上流の事象の即座な知識を必要としない、予防または疾患の進行の阻害のための更に効果的な計画が提供されるであろう(図19a)。

【0009】

タンパク質凝集アッセイ

前記した推定モデルに基づいて、WO96/30766は、固相基質に吸着されているコア反復ドメインに対応するタウフラグメントが可溶性全長タウを捕捉し、高親和性でタウと結合できる、タウ凝集に関するインビトロアッセイについて記載している。この結合は、凝集したタウ分子のタンパク質分解性消化に対する安定性を付与する。プロセスは、自己伝播性であり、典型的な医薬品により選択的に遮断され得る(Wischik, C. M. ら、前出(1996))。

【0010】

WO96/30766に記載されたインビトロアッセイによりタウ-タウ結合のインヒビターまたはモジュレーターの同定が可能になるが、本発明はアルツハイマー病様タンパク質凝集の細胞基盤のモデルが有用であるとも認識している。かかる細胞性モデルを、タウ-タウ凝集のモジュレーター候補物質の1次スクリーニング、およびWO96/30766のインビトロアッセイにおいて既に同定された化合物の2次スクリーニングの双方において用いることができる。更に、細胞におけるタウ凝集の実証により、病的なタウ凝集の開始に関与する正常な細胞基質の同定も助けられ、その基質はそれ自体医薬的介入の標的になり得る。

【0011】

しかしながら、多くの文献により、組織培養モデルにおける種々のタウ構築物の発現は、凝集の実証に失敗したと報告されている(例えばBaum, L. ら、Mol. Brain Res. 34: 1 ~ 17(1995))。

これらの問題は、これまでのところインビトロにおける可溶性タウの凝集は、非生理学的条件下および高濃度で達成されたもののみであると考えられると理解できる(Wischik、前出(2000)に総説される)。

WO96/30766は、また細胞環境におけるタウ凝集を研究するための二つの研究法をも記載している。第1の研究法では、全長タウまたはタウのフラグメントが細胞にお

10

20

30

40

50

いて安定して発現された。第2の研究法では、リポフェクチンの使用により凝集したタウが一過的に細胞にトランスフェクションされた。

【0012】

これらの研究法は、共にタウ-タウ凝集の研究に関して有用であるが、これらにはいくつかの限界がある。リポフェクシオンを用いる、凝集したタウの細胞へのトランスフェクションは、凝集したタウそのものの生成と同様に効率が変化しやすい。更に、タウ凝集のための最も有効な種であるコアタウフラグメントは、細胞において安定して発現される場合、毒性であり低発現レベルとなることを見出されている。このように、真核細胞におけるPHFコアのトランケートされたタウフラグメントの構成的発現を達成するのは困難である。一過性発現系によりタウ発現の最適化が可能になるが、フラグメントの固有の毒性によりこれらの系さえも信頼性のないものになっている。タウのより長いフラグメントは、毒性が低い、これらは、細胞において発現される場合に凝集が不確実である。

10

【0013】

したがって、例えばタウ分子等との相互作用が安定した、そして制御可能な細胞系において生理学的条件下で調査され得る、そしてアルツハイマー病のごとき症状の可能性のある診断、予後または治療用物質に関するスクリーニングに用いることができる代替のモデル系が開発されるのが望ましい。

【0014】

動物モデル

インビトロおよび細胞基盤のアッセイは、有用な手段であり得るが、アルツハイマー病および関連する症状の動物モデルにより脳における生化学的および病的変化ならびに記憶および行動の障害間の関係の理解に役立つ。更に、これにより疾患過程の病因がインビボで試験できるようになり、治療計画を試験できるモデルを提供することが可能になる。

20

【0015】

具体的には、薬物動態という面では、例えば治療の可能性をタンパク質凝集に対する特定の生化学的活性に関してのみならず、毒性、作用部位での、例えば血液脳関門を通る分配および半減期に関しても評価できない細胞基盤の系に動物モデルを置く。

【0016】

これにもかかわらず、既存のモデルは、ADに特徴的な濃縮体、ブラークおよび認識障害の組み合わせを表すことができない。高齢のイヌおよびヒト以外の霊長類はアミロイドーシスを進行させるが、タウ病理は、これらの動物の特徴ではない(Walker, (1997))。同様に、アミロイドーシスをモデル化したトランスジェニックマウスが作られたが、これは、タウの異常沈着を示さない(Janus, ChishtiおよびWestaway, (2000))。逆にタウ病理の動物モデルは、アミロイド病理を実証できない。アルミニウムで処置されたげっ歯類の脳に蓄積される濃縮体は、ADにおいて見出されるものとはその超微細構造が異なる(前記を参照)。リン酸化異常のタウに関連する繊維状細胞骨格変化が、高齢のヒヒ、クマ、ヒツジおよびヤギにおいて観察されている(Braak, BraakおよびStrothjohann, (1994); Corkら, (1988); Nelson, GreenbergおよびSaper, (1994); NelsonおよびSaper, (1995); Roertgenら, (1996); Schultzら, (2000))。

30

【0017】

いくつかの実験により動物モデルにおけるタウおよびアミロイド間の連鎖が関係していると思なされた。タンパク質ホスファターゼ2Aのインヒビターであるオカダ酸の長時間の心室内注入の後、高リン酸化タウが、ラット脳のニューロンの細胞体樹状突起区分に蓄積する(Arendt, Holzer, Fruth, BrijcknerおよびGartner, (1995))。更に、オカダ酸処置によりまたA β の細胞外沈着の形成および記憶障害をも導かれる。二つの別の実験により動物モデルにおけるタウの蓄積にA β が関係していると思なされた。高齢のアカゲザルの皮質における繊維性A β のマイクロインジェクションにより細胞内リン酸化タウの限局性の蓄積を引き起こされた(Geulaら, (1998))。これは、年齢および種に依存し;ラットまたは幼若アカゲザルでは、同一の結果が観察されなかった。第2に、AD随伴変異を担持するAPPに関してトランスジェニックであるマウスにおいて、タウの限局性沈着

40

50

が観察された (Sturchler-Pierratら、(1997))。

【 0 0 1 8 】

タウ欠損マウスの脳は、免疫組織化学的に正常であり、培養されたニューロンでは、軸索の伸長は、影響を受けなかった (Haradaら、(1994))。しかしながら、微小管の安定性は低下し、その構成は、いくつかの小径軸索で変化した。更に、大径軸索におけるタウの機能的喪失を補償する微小管関連タンパク質 1 A (マップ 1 A) の増加が認められた。このように、タウは、特定の軸索の軸索微小管の安定性および構成において非常に重要であると思われる。それに続く研究によりタウ欠損マウスが、前頭側頭骨痴呆患者に特徴的な特定の症状に類似の徴候、すなわち人格変化 (脱抑制 / 攻撃性) ならびに記憶および実行機能を呈することが実証された。マウスは、筋衰弱および平衡制御の障害、新しい環境での活動過剰、および状況恐怖条件付けにおける障害 (Ikegami、HaradaおよびHirokawa、(2000)) を示した。しかしながら、マウスでは、空間学習作業は、F T D P - 1 7 患者における記憶機能と同様に影響を受けなかった。

10

【 0 0 1 9 】

神経原繊維濃縮体および表現型の変化は、3 - または 4 - 反復タウアイソフォームに関するトランスジェニック動物では報告されなかった (Brion、TrempeおよびOctave、(1999) ; Gotzら、(1995)) が、これらの知見は、低レベルのタンパク質発現に反映し得る。

ヒトタウタンパク質を高レベル発現するマウスにおいて、タウパチーの存在下、または不在下で、運動機能障害が観察された (Ishiharaら、(1999) ; Spittaelsら、(1999))。これらの動物では、繊維状封入体が、A D P H F の超微細構造の特徴を呈しなかった。

20

【 0 0 2 0 】

P 3 0 1 L 変異を有するヒトタウを発現する最近のトランスジェニックマウスモデルは、神経原繊維濃縮体、ニューロン喪失、運動機能不全を進行させる (Lewisら、(2000))。これらのマウスにおけるタウ封入体は、ヒト患者において見出されるものに類似する直線状のリボンフィラメントおよび捻れたリボンフィラメントの双方を示した。このモデルをアミロイドーシスと組み合わせる試みは、これらのマウスを A P P に関してトランスジェニックであるマウスと交配させることにより進められる。その他のトランスジェニックマウスモデルは、米国特許第 5 , 9 1 2 , 4 1 0 号および第 5 , 8 9 8 , 0 9 4 号において論じられている。

【 0 0 2 1 】

したがって、既存の動物モデルにより、導入遺伝子が、P H F ドメインを含むトランケートされたタウタンパク質の蓄積を導くといういずれかの病的証拠を実証できないことが示されている。P 3 0 1 L 変異を担持するタウにおいてフィラメントが観察されるが、これは F T D P - 1 7 を引き起こし、A D を引き起こさないタウの形態に対応する。今日では、A D を引き起こすタウ遺伝子の変異は同定されておらず、そして、したがって純粋に変異されたタンパク質に基づく研究法は、効果に関して妥当性が限定され得る。

30

【 0 0 2 2 】

より詳しくは、実際の A D P H F コアで見出されるものに対応するトランケートされたコアフラグメントへのタンパク質分解性プロセッシングにより明白であるように、これらの動物モデルにおいて変異されていないタウ凝集についての明白な開示はない。薬物動態という面で、かかるタンパク質分解性プロセッシングを生じる系は、このように技術分野に貢献するであろう。

40

【 0 0 2 3 】

前記したように、化学的修飾よりもむしろタウの立体配座変化がタウ分子の凝集の進行およびそれに続く重合化に寄与し、P H F を形成する。

驚くべきことに、本発明者らはここで、目的のタンパク質、例えばタウ、またはコア凝集ドメインを含有するそのフラグメントの膜局在形態の合成を引き起こすことによりモデル系におけるこの立体配座の変化を再現することが可能であることを見出した。

例えばタウまたはタウフラグメントと細胞のまたはオルガネラの膜、例えば細胞の原形質膜または小胞体の膜との結合が、タウまたはタウフラグメントのさらなる分子の凝集を

50

供給することもでき、したがって、幾分W096/30766の固相アッセイ系で観察されるものに類似の様式で、タウ-タウ凝集物の形成を広めることが、意外にも見いだされた。この技術は、タンパク質凝集型疾患に関係するタンパク質に広く適用できると思われる。

【0024】

いかなる特定のメカニズムにも限定したくないが、その適当な基質への結合時に生じるタウの立体配座変化を物理学的に誘導することにより、タンパク質の膜局在化合成は、このタンパク質の高親和性捕捉部位を暴露させることが本発明者らにより示されている。この立体配座変化の効果により、タンパク質のさらなる凝集が促進されるその種まき立体配座で、十分に高い局所濃度のタウを作ることができる。これらの観察をタンパク質凝集が役割を果たすすべての疾患に関係付けることができる。

10

【0025】

種々の態様において、本発明は、適当なタンパク質またはそのコアフラグメントの疾患様細胞内凝集をモデル化する方法であって、かかる凝集を開始できるタンパク質の膜局在形態を合成する工程により特徴づけられている方法を提供する。かかる方法を用いて、例えば凝集のモジュレーターを同定することができる。

概して膜標的化タンパク質は実際に凝集を行うものであるが、しかしながら第2のタンパク質型の凝集を引き起こすものである場合もあり、いずれでもよい。

【0026】

したがって、本発明の態様では、(i)タンパク質が凝集するか、または立体配座重合相互作用の誘導を介してタンパク質凝集を開始する疾患に伴うタンパク質から誘導される凝集部分と、(ii)異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドが提供される。

20

【0027】

このように、タンパク質、例えばタウもしくはタウのコアフラグメント、または以下で論じるような対応するタンパク質を膜局在タンパク質の形態で合成でき、それは、それが誘導された実際のタンパク質の凝集をモデル化するのに適当なレベルで細胞内凝集および融合のタンパク質分解過程の種として作用できる。これはまた別の分子(例えば全長タウ分子)との、または別の分子間での凝集の種をまくこともでき、したがってタンパク質凝集物の形成を伝播させることができる。

【0028】

かかる膜随伴タンパク質凝集物を発現する細胞を、例えばアルツハイマー様疾患の細胞にてインビボで観察されるような、疾患関連タンパク質凝集のモデルとして用いることができる。このモデル系をさらなる研究、例えば以下に詳細に記載するような、可能性のある治療、予後または診断用物質のスクリーニングアッセイに用いることができる。

30

【0029】

したがって、本発明の一つの態様は、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴うタンパク質の凝集を誘導、モデル化または制御する方法であって、(a)(i)タンパク質で立体配座重合相互作用が誘導される疾患に伴う第1のタンパク質から誘導される凝集部分と、(ii)異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドを膜に導入すること；(b)融合ポリペプチドおよび別のポリペプチド間の立体配座重合相互作用の誘導を引き起こすまたは可能にする、例えば該別のポリペプチドの凝集を引き起こす工程をと含む方法が開示される。場合によっては凝集の程度をモニター観察してもよい。

40

【0030】

このおよび別の態様では、別のポリペプチドは、例えば別の融合タンパク質でよいか、または例えば上記の第1タンパク質との立体配座重合相互作用が誘導される第2のタンパク質を生じる、融合ポリペプチドのタンパク質分解性分解の結果物でよいか、または全く異なるポリペプチドでよい。

【0031】

したがって、本発明の別の好ましい態様では、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴う(第2の)タンパク質の凝集を誘導、モデル化または制御する方法が開示

50

され、方法は：

(a) (i) タンパク質で立体配座重合相互作用が誘導されるかまたは開始される疾患に伴う第 1 のタンパク質に由来する凝集部分と、(i i) 異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドを膜に導入することと；

(b) 融合タンパク質を、上記第 1 のタンパク質との立体配座重合相互作用が誘導される第 2 のタンパク質と接触させ、それにより第 2 のタンパク質と膜局在融合タンパク質との相互作用が第 2 のタンパク質の凝集を引き起こすことと；

の工程を含む。場合によっては凝集の程度をモニター観察してもよい。

【 0 0 3 2 】

好ましい第 1 および第 2 のタンパク質の実例を以下に開示し、これは疾患に伴う同一のまたは異なるタンパク質から誘導されてよい。とりわけ、第 1 のタンパク質は(立体配座変化の誘導の結果として)同一または異なる別のタンパク質の凝集を開始するおよび/またはそれに関与するものであり、第 2 のタンパク質は相当する疾患において実際に凝集するものである。

【 0 0 3 3 】

好ましい態様では、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴うタンパク質の細胞内凝集を誘導する細胞基盤の方法であって、例えば(a) (i) タンパク質で立体配座重合相互作用が誘導されるか、または開始される疾患に伴う第 1 のタンパク質から誘導される凝集部分と、(i i) 異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドを細胞の膜で局在化するように細胞に導入することと、(b) 上記第 1 のタンパク質との立体配座重合相互作用が誘導される第 2 のタンパク質を細胞に導入することであって、それにより第 2 のタンパク質と局在融合タンパク質との相互作用が細胞内凝集、場合によってはいずれかのタンパク質分解過程を引き起こすことと；の工程を含む方法が開示される。

【 0 0 3 4 】

再度、場合によっては凝集の程度および/または第 2 のタンパク質のタンパク質分解過程をモニター観察してもよい。これは凝集を調節(例えば阻害または逆行)できるとと思われる一つまたはそれ以上の作用物質の存在下でよい。

一般に、融合タンパク質および/または第 2 のタンパク質をコードする核酸を使用することにより方法は実施される。

いくつかの好ましい態様および本発明の具体例をここで更に詳細に記載する。

【 0 0 3 5 】

疾患およびタンパク質

前記したように、本発明は、立体配座重合相互作用が誘導される疾患に伴ういずれかのタンパク質、すなわちタンパク質の立体配座変化が自己伝播の様式で別のタンパク質分子の結合および凝集の種をまくことができるものを用いることができる。一度核形成が開始されると、立体配座変化が、凝集物に、別のタンパク質分解に対するさらなる抵抗性を与え得る、別のタンパク質分子の立体配座重合の誘導に関与する凝集カスケードが続いて起こる。このように形成されたタンパク質凝集物は、神経変性、臨床痴呆およびこの群の疾患のその他の病的症状の最も近い原因であると考えられる。純粹に簡略化のために、この群の症状を本明細書では「アルツハイマー病様」状態と称する。

【 0 0 3 6 】

本発明の好ましい具体例では、本発明はタウタンパク質に基づく。本明細書で用いる「タウタンパク質」なる用語は、一般にタウタンパク質ファミリーのいずれかのタンパク質を意味する。タウタンパク質は、集合および分解の反復サイクル中に微小管と同時精製される多くのタンパク質ファミリーのなかの一つとして特徴付けられ(Shelanskiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 765~768(1973))、微小管関連タンパク質(MAP)として公知である。タウファミリーのメンバーは、特徴的なN-末端セグメント、脳において発達中に制御されるN-末端セグメントに挿入されたおよそ50個のアミノ酸の配列、31から32個のアミノ酸の3または4タンデム反復から成る特徴的なタンデム反復領域、およびC-末端テールを共有する。このように用語をアルツハイマー病の脳においてPHF

10

20

30

40

50

(および最終的には神経原繊維濃縮体)を形成するタウ分子により例示するが、これに限定するものではない。実際に、PHFは細胞体樹状突起区分に蓄積し、ここで主要な微小管関連タンパク質はMAP2である(Matus, A., Microtubules(HyamsおよびLloyd編)155~166頁、ジョン・ウィレイ・アンド・サンズ、ニューヨーク)。MAP2アイソフォームはタンデム反復領域ではタウタンパク質とほとんど同一であるが、N-末端ドメインの配列および範囲で双方は実質的に異なる(図7および8; KindlerおよびGarner, Mol. Brain Res. 26: 218~224(1994))。それにもかかわらず、タンデム反復領域における凝集は、特異的なタウコアアミノ酸配列に選択的ではない。したがって本明細書におけるタウ-タウ凝集に関連するいずれかの論考は、タウ-MAP2凝集およびMAP2-MAP2凝集にも関連すると考えるべきである。

10

【0037】

図20は、本発明で用いることができる種々のその他の疾患随伴凝集タンパク質を列挙する表を示す。各々の場合で、(複数の)タンパク質の凝集および/または変異の開始が役割を果たし得る疾患または複数の疾患もまた列挙される。疾患の活性の原因となるドメインまたは変異が列挙され、そして好ましくは、少なくともタンパク質のこの最小部分のすべてまたは部分が、本発明において膜標的化「捕捉」または「種まき」タンパク質として用いられるタンパク質に含まれる。

【0038】

表から見られるように、病的タンパク質凝集により特徴づけられる疾患の実例には、運動ニューロン疾患およびレビ小体疾患が含まれる。更に、ニューロン変性障害例えばピック病および進行性核上性麻痺の病因は、各々新皮質の歯状回および星状錐体細胞における病的にトランケートされたタウ凝集物の蓄積に相関するようである(Wischikら、前出(2000))。

20

【0039】

特定の好ましい具体例では、発明は本明細書で論じられる型の疾患の最初の段階に関係し得るタンパク質を用いる。例えばWischik, C. M. ら、前出(1997)では、ADにおけるタウ捕捉の開始に関係し得る前記種々の膜タンパク質およびアミロイドタンパク質前駆体について論じられている。これにはプレセニリンおよびミトコンドリアタンパク質、例えばbc₁酵素複合体のコアタンパク質2(CP2)、ATPシンターゼサブユニット9(ATP-S-9)およびポリンなどがある。このように本発明の好ましい具体例は図21の表に示されるこれらの分子のこれらの領域を含む膜標的化タンパク質を利用できる。

30

【0040】

したがって、タウタンパク質またはタウ様タンパク質(例えばMAP2)に関して本発明の具体例が記載される前記の論考を鑑みて(そしてそれ以外を要求する局面は除く)、記載は、前記で論じた別のタンパク質(例えばアミロイド、シヌクレイン、プリオン、適当なミトコンドリアタンパク質等)または凝集の伝播に必須であるドメインにおける立体配座変化により類似の病的凝集が開始または行われ得る、またはこの形成された凝集物にタンパク質分解安定性を与えるその他のタンパク質に同等に適用されると考えるべきであると理解されよう(Wischikら、による文献(「Neurobiology of Alzheimer's Disease」第2版(2000)、Dawbarn, D. およびAllen, S. J. 編、分子および細胞神経生物学シリーズ、パイオス・サイエンティフィック・パブリッシャーズ、オックスフォード))。すべてのかかるタンパク質を本明細書では「凝集性疾患タンパク質」と称し得る。

40

【0041】

本明細書で「タウ-タウ凝集」等の記載を行ったのと同様に、これはまた別の「凝集タンパク質凝集」、例えばアミロイド凝集、プリオン凝集およびシヌクレイン等にも適用できると考えられる。「タウタンパク質分解性分解」等も同様である。

【0042】

前記で記載した方法で使用するためのタンパク質は、適当な場合(例えばタウ-タウ結合の研究において)技術分野の当業者に公知の方法により、例えば各々の参照文献において記載されるように、脳組織から単離することができる。可溶性タウをヒト脳組織または

50

動物脳組織のいずれかから死後 2 4 時間以内の遅れで単離することができる (Wischikら、前出 (1988)、(1995a))。微小管タンパク質は、Shelanskiら (前出 (1973)) にしたがって温度依存的な集合・分解の 3 サイクルにより得ることができる。W O 9 6 / 3 0 7 6 6 に記載される方法に類似してタンパク質のリポフェクションを実施することができる。更に好ましくは、例えばタウタンパク質およびそのフラグメントの生成は、以下に記載されるような慣用される組換え DNA 技術により達成される。

【 0 0 4 3 】

フラグメント、誘導体および対照

発明が全長タンパク質を用いるという要件はなく、実際にこれは、特定の局面では望ましくない。同様に、用いるタンパク質は、N - または C - 末端伸長を含み得る。

10

後記の実施例に示すように、融合体の凝集部分の特性は、別の分子の不在下でさえも適当なレベルの凝集 (および可能なタンパク質分解性プロセッシング) が達成されることである。

または、または加えて、凝集に関与する別の分子 (例えば全長疾患タンパク質分子) を提供できる。

【 0 0 4 4 】

本発明の好ましい具体例では、細胞基盤の方法かまたは本明細書に記載されるインビトロの方法のいずれかで合成されるような融合ポリペプチドは、トランケートされたフラグメントを含むかまたは本質的にトランケートされたフラグメントからなる。かかるフラグメントは一般に「コアフラグメント」であり、この用語は別のタンパク質 (これは同一または異なっていてよい) に結合して凝集を開始または伝播させることができるタンパク質のその部分を意味する。凝集する疾患タンパク質の場合、かかるコアフラグメントは、また凝集物のタンパク質分解の安定性に寄与する可能性がある。

20

【 0 0 4 5 】

したがって、例えば「タウコアフラグメント」はタンデム反復領域 (「コアタンデム反復領域」) に由来するトランケートされたタウタンパク質配列を含むタウフラグメントであり、これは適当な条件下で、別のタウタンパク質または M A P 2 タンパク質のタンデム反復領域に高い親和性で結合できる。

【 0 0 4 6 】

融合ポリペプチドが、タウから誘導される場合、好ましくはトランケートされたフラグメントが全長タンパク質の約 1 8 6 ~ 2 9 6 から約 3 9 0 ~ 4 4 1 に伸びるフラグメントを含み、更に好ましくは以下の部分のいずれかを含む: 1 8 6 から 3 9 0 または 3 9 1 または 4 4 1 ; 2 9 6 から 3 9 0 または 3 9 1 または 4 4 1 (図 5 および 1 0 参照)。本明細書にて後記する実施例では、タウフラグメントのシグナル配列へのライゲーシオンによりアミノ酸 1 8 6 ~ 1 8 9 が破壊され、それにより出発アミノ酸が 1 9 0 に相当した。

30

【 0 0 4 7 】

A P P (アミロイド前駆体タンパク質) の場合、例えば融合タンパク質として 1 ~ 4 0 または 1 ~ 4 2 アミノ酸の A ドメインを含む A P P のフラグメントの発現が好ましい。

その他のコアフラグメントは例えば図 2 0 および 2 1 に関して論じられたドメインに基づいてよい。

40

融合ポリペプチドの全長は、アッセイおよび用いられている凝集性疾患タンパク質コアフラグメントに適しているいずれの長さでもよいが、一般に 3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0 または 5 0 0 個のアミノ酸の長さ以上である。

【 0 0 4 8 】

指定したタンパク質 (例えばコアフラグメント) または列挙した核酸配列について論じる本明細書の全例において、対応する参照タンパク質 (または核酸) の誘導体またはその他の変種が参照配列の適当な特性を保持する場合、必要に応じてそれを用いてよい。かかる誘導体は、また参照配列と配列同一性を共有する。

【 0 0 4 9 】

原則的に、誘導体は、技術分野で公知の手段により残基または N B もしくは C - 末端基

50

の側鎖として生じる官能基から調製され得る化学的誘導体でよい。これらの誘導体にはカルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは1級もしくは2級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部分で形成されたアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体（例えばアルカノイルまたは炭素環式アロイル基）またはアシル部分とで形成された遊離ヒドロキシル基のO-アシル誘導体（例えばセリル-またはセロニル残基のO-アシル誘導体）などが含まれ得る。

【0050】

更に一般的には、誘導体は、参照配列のアミノ酸挿入、欠失または付加の方法によるものである。例えば、タウタンパク質またはタウコアフラグメント、誘導体は少なくともタウタンパク質のタンデム反復領域に類似する部分アミノ酸配列を含むが、天然のタウもしくはそのフラグメントの一つもしくはそれ以上のアミノ酸が置換されているか、もしくは削除されているか、または別のアミノ酸が挿入されている。

10

【0051】

結合活性を増強するかまたは除去するために、かかる変化を作ることができる（後者の場合は対照実験に有用である）。対照は、配列またはドメインの欠失を含有し、これらが有する凝集に及ぼす影響を調べることができる。

好ましい誘導体は、病態に伴うことが解っているか、または推測されるものに対応する変異を組み込むものでよい。これらは、タウ配列内にP301Sに対応する変化を含有できる（図5参照）。別の変異には、G272V、G389R、P301L、N279K、S305N、V337M、G272V、K280、R406W（Wischikら、前記（2000）をも参照）などがある。

20

【0052】

別の好ましい誘導体には、前記で論じたコアフラグメントのタンデム反復、またはこれらのフラグメント内の結合ドメインなどがある。

更に別の誘導体は、配列が混合されているかまたは組み合わせられている複数の関連する疾患タンパク質に基づくキメラ生成物に基づくことができる。例えばタウの制限酵素フラグメントは、MAP2のフラグメントまたは関連性のない遺伝子のフラグメントとでさえライゲートして組換え誘導体を作製することができる。コアフラグメントを修飾するための代替の試験計画は、Hoら、Gene 77: 51~59(1989)に記載されるようなPCR、またはDNAシャフリング（Cramerら、Nature 391(1998)）を用いる。

30

【0053】

膜局在配列

融合の異種性膜局在または標的部分は、いずれかの適当なタンパク質からのいずれかの適当なシグナル配列、例えばラットアルブミンから誘導されるシグナル配列でよい。または、これは元来の局在部分から誘導される修飾された配列でよい。しかしながら、各々の場合、これは「天然には」凝集部分と共に生じない配列である。タンパク質におけるシグナル配列の存在は、新生ポリペプチド/リボソーム複合体をER膜に志向させ、そこで複合体は、膜に挿入され得る。次いでERの膜を通り、そしてER内腔への移動は、タンパク質の疎水性に依存して生じ得る。

【0054】

シグナル配列は、タンパク質の膜局在形態の発現のために選択された宿主細胞に依存して、原核細胞シグナル配列、例えばアルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーでよい。酵母発現のためには、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロミセス（*Saccharomyces*）およびクルイベロミセス（*Kluyveromyces*） - 因子リーダーを含み、後者は、米国特許第5,010,182号に記載されている）または酸ホスファターゼリーダー、*C. albicans*（*C. albicans*）グルコアミラーゼリーダー（EP362,179）、またはWO90/13646に記載されるシグナルでよい。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列、例えばラットアルブミンに由来するものを用いることができ、またはウイルスリーダー配列を用いることができる。

40

50

【 0 0 5 5 】

この膜局在部分は、また膜アンカー配列および/または輸送停止配列をも含むことができる。一般にこれはタンパク質に好ましく、そうでなければ固有の(疎水性)特性により、シグナルペプチドに融合された場合にタンパク質が分泌または細胞外に配置される。膜アンカードメインを組み込んで、タンパク質全体がERの内腔に移され、最終的に分泌されるのを防御することができる。概して、タンパク質は、随伴するいずれかのタンパク質が細胞質で外来性のタンパク質と相互作用できるように、サイトゾル表面に指向されなければならない。

【 0 0 5 6 】

その他の結合パートナー

本発明の一つの態様では、タンパク質、例えばタウまたはタウのコアフラグメントの膜局在発現を用いてそのタンパク質またはフラグメントの特異的結合パートナー、例えばタウまたはそのフラグメントの膜局在化形態に結合できるタウまたはタウのコアフラグメント以外のタンパク質をスクリーニングできる。

【 0 0 5 7 】

したがって、本発明は、またタンパク質の膜局在化発現を引き起こすかまたは可能にすることと、そのタンパク質を一つまたはそれ以上の可能性のある結合パートナーと接触させることと、および可能性のある結合パートナーが膜局在タンパク質に結合しているかどうかを決定することを含む、目的のタンパク質(例えばタウ)の特異的結合パートナーをスクリーニングする方法にも関する。

【 0 0 5 8 】

目的のタンパク質および可能性のある結合パートナー間の結合の検出を、前記で詳細に記載したいずれかの適当な方法を用いて実施できる。

方法にはこのように同定された特異的結合パートナーを回収するさらなる工程を含めることができる。

このように、本発明によりタンパク質、例えばタウの特異的結合パートナーの同定が可能になり、これはアルツハイマー病様凝集におけるかかるタンパク質の別の病的結合パートナーを表すことができる。

【 0 0 5 9 】

核酸構築物の使用

一つの好ましい態様では、前記の(工程(a)の)(結合)融合ポリペプチドは、構成プロモーターの転写制御下で細胞内に発現させることにより細胞に導入されるが、一方(工程(b)の)第2の(「遊離」)タンパク質は、適当な誘導物質の存在下、誘導プロモーターの転写制御下で細胞内に発現させることにより導入される。または、逆に、(a)および(b)タンパク質を各々誘導的におよび構成的に発現させることができる。

【 0 0 6 0 】

この系を用いて細胞における凝集のレベルまたは時期を制御することができる。

とりわけ好ましいのは、細胞基盤のタウ-タウ結合アッセイのための以下の立体配座である: コアPHFのトランケートされたタウユニットに相当するタウフラグメントは、タンデム反復領域内の高親和性タウ-タウ結合部位に暴露されるように、宿主細胞において、そして細胞を殺さないレベルで、すなわち安定した細胞系にて膜局在形態で構成的に発現される。好ましくはタウフラグメントは、コア反復ドメインフラグメントよりも長く(適当には全長タウの186~390または186~441のアミノ酸残基)、これは凝集および毒性の間でバランスをとることができる。

【 0 0 6 1 】

本発明の核酸、または本発明で使用するための核酸は、実質的に純粋もしくは均質な形態で、または元来の種の別の核酸を含まずに、もしくは実質的に含まずに、その天然の環境から単離および/または精製された形態で提供され得る。本明細書で用いる場合、「単離された」なる用語はこれらの可能性をすべて含む。

融合ポリペプチドをコードする核酸は、それが天然で一緒に見出されない(隣接して作

10

20

30

40

50

動しない)が、人工的にライゲートされているかそうでなければ組み合わされている核酸配列を含むという点で、少なくとも部分的に合成性である。

【0062】

本発明による核酸は、cDNA、RNA、ゲノムDNAおよび修飾された核酸または核酸アナログの形態であるか、またはそこから誘導され得る。DNA配列が、例えば図を参照して指定されている場合、局面がそれ以外を要求するのでなければ、そこでTがUに置換されているRNA等価物は含まれる。

【0063】

とりわけ、核酸は、本明細書で開示されるいずれかの配列を含む、その配列から成る、または本質的にその配列から成ってよい(これは遺伝子、ゲノムクローン、またその他の配列、cDNA、またはこれらのいずれかのORFもしくはエクソン等でよい)。本明細書で発明の核酸(ヌクレオチド配列)について言及する場合、その核酸(またはヌクレオチド配列)の相補体もまた本発明に包含される。各々の場合、「相補体」は、参照と同一の長さであるが、参照と100%相補的であり、それにより各々のヌクレオチドでその相手と、すなわちGはCと、AはTまたはUと塩基対形成する。

【0064】

したがって、本発明は、また別の態様で、シグナル配列、および、必要な場合、膜アンカードメインまたは輸送停止配列をコードする配列に連結され、それによりコード化されたポリペプチドがER膜に挿入されるようになる、前記で論じた融合タンパク質、例えば凝集性疾患タンパク質をコードするヌクレオチド配列またはそのタンDEM反復ドメイン(すなわち神経変性障害、例えばアルツハイマー病に關係するタンパク質またはそのフラグメント)を含む核酸分子にも関する。

【0065】

シグナル配列に連結された目的のタンパク質をコードする核酸分子は、場合によって外来性3 非翻訳領域配列、例えばラットグロビンから誘導される配列を含んでもよい。3 非翻訳領域の特性は、細胞のERへのタンパク質の標的化の効率に影響するようであり、そして3 非翻訳領域の配列は、そのために選択され得る(Partridge, K. A. ら、Cytotechnology 30: 37~47(1999))。

【0066】

前記したように、核酸は、問題の参照配列と相同性を共有する誘導体またはその他の変種をコードできる。好ましくは、問題の核酸および/またはアミノ酸配列は、変種に基づく配列の約50%、または60%、または70%、または80%、最も好ましくは少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を共有する。類似性または相同性は、技術分野で標準使用であるAltschulら、J. Mol. Biol. 215: 403~410(1990)のTBLASTNプログラム、または、そしてこれが好ましいのであるが、デフォルト・パラメーターを用いる標準的なプログラムBest Fit(ウィスコンシン・パッケージ、バージョン8、1994年9月(ジェネティクス・コンピューター・グループ、575サイエンス・ドライブ、マジソン、ウィスコンシン、米国、ウィスコンシン53711)の一部である)により定義および決定できる。特定の配列相同性の核酸分子間のハイブリダイゼーションを達成するのに必要なストリンジェンシー条件を算出するための一般式は： $T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41(\% G + C) - 0.63(\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{二重鎖の} \# \text{bp}$ 。

【0067】

本明細書に含まれる情報および参照ならびに技術分野で公知の技術(例えばSambrook、FritschおよびManiatis、Molecular Cloning、A Laboratory Manual(1989)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、ならびにAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology(1992)、ジョン・ウェレイ・アンド・サンズ、参照)を用いて技術者は、本発明にしたがってシグナル配列に連結されたポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸配列を容易に調製できる。これらの技術には、(i)適当な核酸、例えばゲノム供給源からのサンプルを増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応の使用、(ii)化学的

10

20

30

40

50

合成、または (i i i) c D N A 配列の調製などがある。このように調製された核酸を次いで適当なシグナルペプチドをコードする配列に連結できるか、またはかかるシグナルペプチドコード化配列を含むベクター構築物に挿入することができる。組換え脊椎動物細胞培養における膜局在タンパク質の合成に適用するのに適した別の方法はGethingら、Nature 293: 620 ~ 695(1981); Manteiら、Nature 281: 40 ~ 46(1979) ; E P 1 1 7 , 0 6 0 ; および E P 1 1 7 , 0 5 8 に記載されている。

【 0 0 6 8 】

例えば、タウコアフラグメントをコードする D N A を作製でき、これを、コード化 D N A を取ることで、発現される部分のいずれかの側の適当な制限酵素認識部位を同定すること、および D N A から上記部分を切断することによることなどの、技術分野の当業者に公知のいずれかの適当な方法に用いることができる。タンパク質 (例えばタウ) コード化配列への修飾を、例えば位置指定変異誘発を用いて作製することができる。

10

【 0 0 6 9 】

構築物

本発明の細胞基盤のアッセイの態様では、シグナル配列および、必要とする場合、アンカーまたは輸送停止配列に連結された規定のタンパク質をコードする核酸を含み、そして場合によっては外来性 3' 非翻訳領域の配列を含んでもよい発現構築物またはベクターの細胞中での発現を誘導または可能にすることにより、目的のタンパク質、例えばタウまたはタウのフラグメントの膜局在形態の構築を達成できる。

【 0 0 7 0 】

概して、新生タンパク質分子が連結されるシグナル配列をコードする核酸は、ベクターそのものの成分でよいが、またはベクターに挿入された外来性タンパク質コード化 D N A の一部分でよい。

20

構築物は、かかる系に一般に含まれるような、そして以下に記載されるような、いずれかその他の制御配列または構造エレメントを含むことができる。シグナル配列と同様に、ベクター成分には、通常、非限定例としては一つまたはそれ以上の複製起点、一つまたはそれ以上のマーカー遺伝子、一つまたはそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終止配列などがある。一つまたはそれ以上のこれらの成分を含有する適当なベクターの構築には、技術者に公知の標準的なライゲーション技術を用いる。

30

【 0 0 7 1 】

ベクターが一つまたはそれ以上の選択された宿主細胞において複製されることを可能にする核酸配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスに関して公知である。例えば、種々のウイルス起源 (S V 4 0 、 ポリオーマ、アデノウイルス、 V S V または B P V) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターとして有用である。

とりわけ好ましいのは、本明細書に記載する核酸を含む発現ベクターである。ベクターは、例えば細胞により取り込まれ得るプラスミド、コスミド、ウイルス粒子、ファージ、またはいずれかその他の適当なベクターもしくは構築物の形態でよく、そしてこれを用いて凝集性疾患タンパク質、例えばタウまたはタウコアフラグメントの膜局在形態を発現させる。

40

【 0 0 7 2 】

発現ベクターは、mRNA合成を志向するように、通常目的のタンパク質コード化核酸配列に作動可能に連結されるプロモーターを含有する。種々の可能性のある宿主細胞により認識されるプロモーターは、公知である。「作動可能に連結された」とは、同一の核酸分子の一部として結合され、適当に配置され、そして転写がプロモーターから開始されるように配向されていることを意味する。プロモーターに作動可能に連結された D N A は、プロモーターの「転写制御下」にある。哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの転写は、ウイルス例えばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2) 、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) のゲノムから、異種

50

性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、および熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより、かかるプロモーターが宿主細胞系に適合する場合に制御される。

【 0 0 7 3 】

真核宿主細胞（酵母、菌類、昆虫、植物、動物、ヒト、またはその他の多細胞生物からの有核細胞）において用いられる発現ベクターは、転写の終止およびmRNAの安定化に必要な配列をも含有する。

【 0 0 7 4 】

プロモーターは、技術分野の当業者によりよく理解されている、いわゆる「誘導可能」でよく、発現は、適用された刺激に応答して「スイッチ・オン」または増加する。刺激の特性は、プロモーター間で変化する。ある誘導プロモーターは、適当な刺激の不在下ではわずか、または検出不能なレベルの発現（または発現しない）しか引き起こさない。また別の誘導プロモーターは、刺激の不在下で検出可能な構成的発現を引き起こす。刺激の不在下での発現のレベルにかかわらず、いずれかの誘導プロモーターからの発現は、正確な刺激の存在下で増加する。以下の実験では、Lac誘導プロモーターを使用している。

【 0 0 7 5 】

本発明の発現ベクターは、一つまたはそれ以上の選択遺伝子をも含有できる。典型的な選択遺伝子は、（a）抗生物質またはその他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メソトレキセート、またはテトラサイクリンに対する抵抗性を付与する、（b）栄養要求欠損を補足する、または（c）複合培地から利用できない必須栄養を供給するタンパク質をコードし、例えば桿菌のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。哺乳動物細胞に適した選択マーカーの実例は、規定の膜標的タンパク質コード化核酸を取り込む受容能力のある細胞の同定を可能にするもの、例えばDHF Rまたはチミジンキナーゼである。野生型DHF Rを用いる場合、適当な宿主細胞は、DHF R作用が欠如したCHO細胞系であり、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216(1980)に記載されるように調製および増殖される。酵母での使用に適した選択遺伝子は、酵母プラスミドRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcombら、Nature 282: 39(1979); Kingsmanら、Gene 7: 141(1979); Tschemperら、Gene 10: 157(1980)]。trp1遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠いた酵母の変異株のための選択マーカー、例えばATCC: 44076またはPEP4-1を提供する[Jones, Genetics 85: 12(1977)]。

【 0 0 7 6 】

形質転換

したがって、前記で言及された方法は、更に核酸を宿主細胞に導入することを含む。一般に「形質転換」として限定されないで言及され得る（とりわけインビトロ導入に関する）導入は、いずれか利用可能な技術を用いることができる。真核細胞では、適当な技術には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン、電気泳動、リボソーム媒介トランスフェクションおよびレトロウイルスもしくはその他のウイルス、例えばワクシニアまたは昆虫細胞に関してはバキュロウイルスを用いる形質導入などがある。

【 0 0 7 7 】

Sambrookら、前記塩化カルシウムを用いるカルシウム処置、またはエレクトロポレーションは、一般に原核細胞または実質的な細胞壁を含有するその他の細胞に関して用いられる。アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)での感染は、Shawら、Gene 23: 315(1983)および1989年6月29日発行のWO 89/05859に記載されるように、特定の植物細胞の形質転換に関して用いられる。

【 0 0 7 8 】

かかる細胞壁を有さない哺乳動物細胞に関しては、Grahamおよびvan der Eb、Virology 52: 456~457(1978)のリン酸カルシウム沈殿法を用いることができる。哺乳動物細胞宿主系形質転換の一般的な態様は、米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母への形質転換は典型的にはVan Solingenら、J. Bact. 130: 946(1977)およびHsiaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 3829(1979)の方法にしたがって実施する。しかしな

10

20

30

40

50

から、細胞へのDNAの導入のためのその他の方法、例えば核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷細胞との細菌性プロトプラスト融合、またはポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチンによる方法をも用いることができる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々技術に関しては、Keownら、Methods in Enzymology 185: 527(1990)およびMansourら、Nature 336: 348~352(1988)を参照されたい。

【0079】

宿主細胞

発明に用いるのに適当な宿主細胞には、細菌、真核細胞、例えば哺乳動物および酵母細胞、ならびにバキュロウイルス系などがある。

異種性ポリペプチドの発現のために技術分野で利用可能な哺乳動物細胞系には繊維芽細胞3T6細胞、HeLa細胞、ベビー・ハムスター腎臓細胞、COS細胞、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1系(COS-7、ATCC CRL1651)、チャイニーズハムスター卵巣細胞/ - DHFR (CHO、UrlaubおよびChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216(1980))；マウスセルトリ細胞(TM4、Mather、Biol. Reprod. 23: 43~251(1980))；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL75)；ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB8065)；マウス乳腺癌細胞(MMT 060562、ATCC CCL51)；および多くのその他のものなどがある。好ましいものは、いずれかの範囲の公知の神経芽腫細胞系、例えばN2A、N1E、SY5Yである。

【0080】

適当な原核細胞宿主には、非限定例としては、真性細菌、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物、例えばエンテロバクテリアシー(Enterobacteriaceae)、例えば大腸菌(E. coli)などがある。種々の大腸菌株は公に入手可能であり、例えば大腸菌K12 MM294株(ATCC 31446)；大腸菌X1776(ATCC 31537)；大腸菌W3110(ATCC 27325)およびK5 772(ATCC 53635)である。真核性微生物、例えば糸状菌または酵母もまたベクターに適したクローニングまたは発現宿主である。サッカロミセス・セルビジエ(Saccharomyces cerevisiae)は一般に用いられる下等真核性宿主微生物である。適当な宿主細胞の選択は、技術分野の技術範囲内であると考えられる。

【0081】

別の態様では、本発明は、前記で記載された本発明の異種性核酸を含有する宿主細胞を提供する。本発明の核酸を宿主細胞のゲノム(例えば染色体)に組み込むことができる。標準的な技術にしたがってゲノムとの組換えを促進する配列を封入することにより組み込みを促進できる。または、核酸を細胞内の染色体外ベクター上にあるか、またはそうでなければ細胞に対して認識可能な異種性もしくは外来性であってよい。概して、細胞系は、タンパク質例えばタウまたはその誘導体の膜局在形態を発現でき、細胞系は、タンパク質またはその誘導体をコードする核酸で形質転換されている。好ましい細胞系は、繊維芽細胞系、例えば3T6に基づくものでよい。

【0082】

発現産物

膜局在タンパク質の生成に関して本明細書に記載された発現またはクローニングベクターでトランスフェクトまたは形質転換された宿主細胞を、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または望ましい配列をコードする遺伝子を増幅するのに適当なように修飾された、慣用される栄養培地中で培養することができる。培養条件、例えば培地、温度、pH等は、過度な実験を行わないで技術者により選択され得る。概して、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコル、および実施技術を「Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach」M. Butler編、JRLプレス(1991)およびSambrookら(前記)に見出すことができる。

【0083】

遺伝子発現を、例えばサザン・ブロットイング、mRNAの転写を定量化するための慣用されるノーザン・ブロットイング[Thomas、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201~5

10

20

30

40

50

205(1980)]、ドットブロッキング (DNA 分析)、またはインサイチュー・ハイブリダイゼーションにより、凝集性疾患タンパク質の配列に基づいて、適当に標識されたプローブを用いてサンプル中で直接確認することができる。または、DNA 二重鎖、RNA 二重鎖、および DNA - RNA ハイブリッド二重鎖または DNA - タンパク質二重鎖などの特異的二重鎖を認識できる抗体を用いることができる。

【 0 0 8 4 】

または、遺伝子発現を免疫学的方法、例えば細胞または組織切片の免疫組織学的染色により、および細胞培養のアッセイにより測定して、遺伝子生成物の発現を直接定量化することができる。サンプル液の免疫組織学的染色および/またはアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかによく、いずれかの哺乳動物において調製することができる。便利なことには、凝集疾患ポリペプチドの元来の配列に対する抗体を調製することができる。

10

【 0 0 8 5 】

このように本発明の一つの態様は、遺伝子発現のための条件下で、コードされたポリペプチド (またはペプチド) が生成されるように、例えば宿主細胞 (これは実際に形質転換された細胞を含むが、より可能性があるのは細胞が形質転換された細胞の子孫である) を培養することにより、本明細書で論じられた核酸からの発現を引き起こすかまたは可能にする必要がある。

本発明は、また前記の態様の膜局在ポリペプチドまたはペプチドを作製する方法をも包含し、方法は、前記した核酸からの発現を含む。ポリペプチドの発現を引き起こすかまたは可能にする適当な条件下で、かかるベクターを含有する宿主細胞を培養物中で成長させることの代替として、本明細書で前記したインビトロ系、例えば網状赤血球ライゼート系でポリペプチドおよびペプチドを発現させることができる。

20

【 0 0 8 6 】

概して、発現による産生の後、コードされた融合ポリペプチドをそれが発現される環境下で、すなわち融合ポリペプチドをそれが局在している膜から単離しないで利用する。このように、前記で論じたように、驚くべきことにタンパク質の膜局在形態を用いてアルツハイマー様タンパク質凝集を擬似する様式で、別のタンパク質分子の凝集の種をまくことができることが本発明者らにより見出された。このように、膜局在アルツハイマー病様タンパク質凝集をその膜 (例えば ER 膜) において展示する細胞を、別のスクリーニングアッセイ (その論考に関しては以下を参照) に用いることができる。

30

【 0 0 8 7 】

それにもかかわらず、発明のポリペプチドを、場合に応じて、膜分画の形態、または膜自体から単離された形態のいずれかで、宿主細胞および/または培養培地から単離および/または精製することができる。公知の方法、例えば異なる速度での遠心により、硫酸アンモニウムでの沈殿により、透析 (正常圧で、または減圧下で) により、分離用等電点電気泳動により、調製用ゲル電気泳動により、または種々のクロマトグラフィー法、例えばゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーおよび親和性クロマトグラフィー (例えばセファロース (商標) ブルー CL - 6B で、またはキャリア結合モノクローナル抗体で) によりタンパク質を実質的に均質になるまで精製できる。

40

【 0 0 8 8 】

したがって、本発明は、別の態様では、前記の態様で提供されるような核酸によりコードされるポリペプチド、例えばシグナルペプチドおよび (必要な場合) アンカーおよび/または輸送停止配列に連結されたポリペプチドまたはそのフラグメントに関する (例えば、タウまたはタウのコアフラグメントに基づいて)。好ましい具体例では、ポリペプチドは凝集性疾患タンパク質、例えばタウタンパク質またはその誘導体を含む。更に好ましくは、タンパク質は前記したタウコアフラグメントを含む。

【 0 0 8 9 】

インビトロモデル

50

前記した目的のタンパク質の膜局在形態をインビトロモデルで用いることができる。

例えば、相互参照により本明細書に組み込まれるWO 96 / 30766のアッセイにおいて用いられるタウフラグメントに類似してこれを用いることができる。前記したように、タウ凝集およびそのインヒビターに関するこのアッセイでは、コア反復ドメインに対応するタウのフラグメントを固相基質に吸収させる。これにより可溶性全長タウを捕捉し、高い親和性でタウを結合させることが可能になる。これらの二つの方法（膜局在化、インビトロ固相）の組み合わせが特定の局面では有利である。

【0090】

前記した細胞基盤の方法の別の代替として、目的のタンパク質の膜局在形態のインビトロタンパク質発現系において発現を引き起こすことによる、モデル化法を実施できる。例えば、マイクロソーム（小胞体のフラグメント化により容易に生成できる）、リボソーム、tRNA分子、ならびにシグナル配列およびタンパク質合成および転移に必要ないずれかその他の可溶性因子に連結された目的のタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードするmRNAを含有するインビトロ培地を用いてタンパク質の膜結合形態を合成することができる。本明細書では、前記した細胞基盤の系に類似した方法で、リボソームはマイクロソーム膜（これは細胞基盤の系のER膜に等しい）に付着し、コードされたポリペプチド分子の合成を引き起こすようになる。

【0091】

この後者の具体例では、凝集性疾患タンパク質をコードする構築物、シグナル配列ならびにアンカーおよび/または輸送停止配列（必要な場合）はすべてコードされたタンパク質分子の大部分が、マイクロソーム膜に挿入された場合に、内腔によりむしる膜のサイトゾル表面から突き出るように設計されるのが好ましい。このように、タンパク質分子は別のタンパク質分子（それによりアルツハイマー病様凝集がマイクロソームのサイトゾル表面で生じるのが可能になる）およびかかる凝集の可能性のあるインヒビターまたはモジュレーターをスクリーニングするためのスクリーニングアッセイにおける被検物質の双方と接近できるようになる。

【0092】

技術者は望ましいタンパク質トポロジーを達成するために適当な構築物の設計に精通している。更にこの点の論考については、以下で提示する。

したがって、本明細書で提供される細胞基盤およびインビトロモデル系を関連づける共通の特徴は、凝集性疾患タンパク質またはタンパク質フラグメントの膜局在形態の合成である。この共通の特徴により、例えば神経原繊維濃縮体の形成中のタウのごとき、タンパク質の病的凝集を擬似する方法で別のタンパク質分子の凝集を伝播させ得る種分子を作製する方法が生み出される。

【0093】

重合化相互作用の誘導の検出

種々の具体例では、以下の種のいずれか一つまたはそれ以上の濃度またはレベルをモニター観察することにより、凝集の進行（または凝集の変調）を直接または間接的に検出することができる：融合体および/または第2のタンパク質（例えば沈降係数に基づいて）の凝集、またはこれらのいずれかのタンパク質分解フラグメント（これは概して凝集で増加する）；非凝集融合ポリペプチドおよび/または第2のタンパク質に対応する種（低下し得る）。

【0094】

したがって、特定のタウ融合体およびタンパク質（40 kDの190～441フラグメントおよびT40に基づく）で実例を示すように、融合および長いタンパク質の双方から誘導される25 kD処理した種のレベル増加に基づいて凝集をモニター観察できる（図1参照）。

方法で用いられた第2の（「遊離の」）タンパク質は、タンパク質分子の凝集の程度を検出するのを補助するために、標識されているか、またはそうでなければ膜結合タンパク質から区別できる、例えば免疫学的に識別されるのが望ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 5 】

例えば、凝集性疾患タンパク質の遊離形態をレポーター分子に連結できる。本明細書で用いられる「レポーター分子」なる用語は、その化学的特性により抗原結合抗体の検出を可能にする、分析的に検出可能なシグナルを提供する分子を意味することを意図する。好ましくは検出を定量化して、サンプル中の抗原の量を決定することを可能にできるべきであり；これは定数項で算出できるか、または正常レベルの公知の抗原を含有する標準（または一連の標準）と比較して実施することができる。実例は技術分野の当業者に公知であり、例えば酵素または蛍光体である。

【 0 0 9 6 】

したがって、タンパク質の遊離形態は直接修飾される（例えば放射活性または酵素的に検出可能な標識でマークした）か、または分子のドメイン、例えば高親和性タウ - タウ結合部位に関与しないことが解っているN - 末端セグメントで抱合され、それにより、それはタウ - タウ結合アッセイにおけるリガンドおよびレポーター分子の双方として機能するようになる。

【 0 0 9 7 】

抗体またはそのフラグメントは、本発明の方法の態様において用いられる場合、慣用される技術により生成され得る。ポリクローナル抗体は、例えば対応するタウ抗原を動物、好ましくはウサギに注射し、そしてイムノアフィニティ精製により抗血清を回収することにより上昇され、ここでポリクローナル抗体は、抗原が結合するカラムに通され、次いで慣用される様式で溶出される。好ましくは、本発明は、タウエピトープに選択的であり、KohlerおよびMilsteinの方法により調製できるモノクローナル抗体を使用する。タウエピトープに対する適当なモノクローナル抗体を公知の方法により修飾してFabフラグメントまたは(Fab)₂フラグメント、キメラ、ヒト化または一本鎖抗体具体例を提供することができる。本発明による抗体を多くの方法で修飾することができる。実際に、「抗体」なる用語は、結合ドメインを有するいずれかの結合物質を必要な特異性で補っていると解釈すべきである。このように本発明は、抗体フラグメント、誘導體、機能的等価物および、その形状が抗原またはエピトープに結合するのを可能にする抗体の形状を擬似する合成分子および分子などの抗体の相同体に及ぶ。

【 0 0 9 8 】

概して、抗体が検出に用いられる場合、抗体は、レポーター分子を担持できる。または、未標識のタウ特異的1次抗体に結合できる2次抗体の使用により結合の検出を実施できる。この場合、2次抗体はレポーター分子に連結されている。

【 0 0 9 9 】

非限定例としてラジオイムノアッセイ、「サンドウィッチ」アッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)；蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ等の技術分野で公知のいずれかのイムノアッセイにおいて抗体を用いることができる。典型的には、免疫プロット法が使用される。好ましくは、イムノアッセイは、技術者に公知であるように、固相で実施される。例えば、抗体を例えばアッセイカラムに吸収させ、そして、次いで細胞の膜に存在する目的のタンパク質のいずれかの凝集、例えばタウ - タウ凝集の固相抗体への結合を可能にするのに適した条件下で、細胞サンプルをカラムを通して洗浄することができる。過剰の試薬を洗い流し、例えば前記および後記で実例を示すようないずれか適当な手段により、凝集タンパク質のカラムへの結合を検出することができる。

【 0 1 0 0 】

好ましいモノクローナル抗体は、以下のとおりである：

・トランケートされたタウ種および全長のタウ種間の結合の測定を可能にするタウエピトープのN - 末端またはC - 末端を認識するもの。とりわけ有用なものは、ヒト特異的エピトープを認識する抗体である。かかるモノクローナル抗体の一つ(27/499と称する)は、タウのGly - 16およびGln - 26間の領域に位置するヒト特異的エピトープを認識し、そしてヒト以外の供給源から誘導される場合、それにより全長のタウ種間の

10

20

30

40

50

結合の測定が可能になる（「アルツハイマー病の神経原繊維病理の進行におけるタウタンパク質のリン酸化異常の役割」PhD Thesis、ケンブリッジ大学）。

【0101】

・G1u-391でランケートされたコアタウフラグメントを認識するもの。実例は、mAb423（Novakら、前出(1993)）。この抗体は、mAb423により認識されない、G1u-391で終止するランケートされたコアタウフラグメントの、Ala-390で終止する類似のフラグメントへの結合の検出を可能にする。このランケーションは、アルツハイマー病のPHF集合の過程で天然に生じる（Menaら、前出(1995)、(1996)；Novakら、前出(1993)；Menaら、前出(1991)）。更に、タウが、インピトロで反復ドメインを介して結合する場合、プロテアーゼ（例えばプロナーゼ）での消化によりmAb423で検出可能なフラグメントを生じる（Wischikら、前出(1996)）。図17は、本発明によるアッセイで生じ得る種々のタウ誘導種、および各々のおおよそのランケーション点を示す。このようにmAb423を用いて、本明細書で提供される膜局在モデル系で生じるタウ-タウ結合相互作用の分子立体配座が、脳で病的に生じるものに対応する、そして、したがって本発明によるかかるモデル系がアルツハイマー病様タンパク質凝集の実行可能なモデルを提示することを示すことができる。

10

【0102】

・反復ドメインにおける一般的なタウエピトープを認識するもの。好ましい具体例は、抗体（例えばmAb7.51）を利用する。タウ-MAP2またはMAP2-MAP2凝集を検出すべき場合、一般的なMAP-2エピトープを検出する抗体を用いることができる。抗体7.51は終わりから3番目のタウの反復に位置する一般的なタウエピトープを認識し（Novakら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5837~5841(1991)）、これは、タウがPHF様免疫化学的立体配座で結合する場合に塞がれるが、ギ酸処理の後暴露され得る（Harringtonら、前出(1990)、(1991)；Wischikら、前出(1995a)）。正常な可溶性タウまたは微小管に結合したタウをギ酸処理を行わずにmAb7.51を用いて検出することができる（Harringtonら、前出(1991)；Wischikら、前出(1995a)）。タウ-タウ結合アッセイにおける全長タウの結合は、mAb7.51エピトープの部分的閉塞に関連する。

20

【0103】

抗体27/342は、タウ-タウ相互作用の過程で部分的に塞がれるSer-208およびSer-238間に位置する種非特異的一般的タウエピトープを認識する（Lai、前出）。

30

いくつかのモノクローナル抗体の結合部位を図4に示す。

【0104】

モジュレーターおよびインヒビターに関するスクリーニング

前記したように、発明は好ましくは、本明細書で提供されるような、アルツハイマー病様タンパク質凝集のモデル化の方法における核酸分子、ポリペプチドもしくはその誘導体、宿主細胞、またはインピトロタンパク質発現系に関する。本発明の方法は、細胞基盤またはマイクロソーム基盤の発現系において核酸分子の発現を引き起こす工程を含むことができ、そのようにしてコードされたポリペプチドが各々細胞の膜（例えばER膜）またはマイクロソーム膜で局在化されるようになる。

40

【0105】

好ましい態様では、本明細書で論じられた疾患の処置のための治療薬を同定する方法が開示され、その方法は、融合ポリペプチド（および、好ましくは前記で論じられた第2のタンパク質）を提供する、および膜局在タンパク質を疾患に伴うタンパク質凝集のインヒビターまたはモジュレーターであることが推測される被検物質と接触させる工程を含む。とりわけ、前記で記載したモデル化法により生成されるような融合ポリペプチドを用いてアルツハイマー病様タンパク質凝集、例えば病的タウ-タウ会合の可能性のあるインヒビターまたはモジュレーターを研究し、スクリーニングすることができる。

【0106】

したがって、前記した種々の方法は、更に（c）融合ポリペプチドおよび/または第2

50

のタンパク質を、凝集を変調または阻害する能力に関して評価するのが望ましい一つまたはそれ以上の作用物質と接触させることと；(d)凝集の程度をモニター観察し、そして場合によっては凝集と(複数の)作用物質の変調活性とを相関させてもよいことと；の工程を含むことができる。

【0107】

したがって、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴うタンパク質の(好ましくは細胞内)凝集のモジュレーターを同定する方法は、凝集を変調(阻害または逆転)できることが推測される一つまたはそれ以上の作用物質の存在下で前記した凝集を誘導する方法を実施することを含むことができる。作用物質の存在下または不在下で凝集の程度(および場合によってはタンパク質分解性プロセッシング)を観察でき、相対値はモジュレーターとしてのその活性に相関した。

10

【0108】

好ましくは、スクリーニング法が目的のタンパク質、例えばタウの膜局在形態を発現する細胞を用いる場合、これらは例えば神経細胞系、例えば神経芽細胞腫細胞系からの細胞、または繊維芽細胞系からの細胞を含んでよい。好ましい態様では、細胞は繊維芽細胞3T6細胞系に由来する。

【0109】

一つの実例では、本発明は、アルツハイマー病様タンパク質凝集、例えば病的タウ-タウ会合を変調または阻害できる作用物質をスクリーニングする方法に関し、方法は：
(1)凝集性疾患タンパク質(例えばタウまたはMAP2)、またはそのコアフラグメント(例えばタウまたはMAP2のコアタンデム反復ドメイン)の膜局在形態の合成を引き起こすかまたは可能にすること；

20

(2)上記ポリペプチドまたは誘導体を：

(A)凝集性疾患タンパク質分子の凝集を変調または阻害できると推測される一つまたはそれ以上の作用物質；および

(B)工程(1)の膜随伴タンパク質に結合できる、別の凝集性疾患タンパク質またはそのコアフラグメント；

と接触させること；ならびに

(3)存在する場合、工程(2)(b)のタンパク質の工程(1)の融合ポリペプチド結合との結合を検出すること；

30

を含む。

【0110】

前記の工程(2B)で用いられるタウ様タンパク質は、特定の具体例において、タンパク質の「遊離」形態でよく、この用語は本明細書において工程(1)の膜結合凝集性疾患タンパク質から区別するために用いられる。しかしながら、「遊離」は凝集性疾患タンパク質が別の分子または部分、例えば炭水化物部分またはその他のペプチドと複合体形成しているか、そうでなければそれに随伴されている可能性を排除することを意図するものではない。

【0111】

例えば被検物質を前記した細胞の系に添加し、そして結合を可能にし、そして結合の阻害を実証するのに十分な時間、細胞をインキュベートしてよい。次いで例えば適当に標識した抗体、例えばMAb7.51を全細胞抽出物のイムノプロットで用いることにより、またはいずれかその他の適当な検出方法を用いることにより結合タウ複合体を検出することができる。所望する場合、例えば膜結合タウタンパク質をアミノ酸390で終止させることにより、膜結合タウタンパク質を凝集した遊離のタウタンパク質から区別することができる。凝集した遊離のタウはアミノ酸Gly391でタンパク質分解的に切断され、これはそのエピトープに特異的な抗体により検出できる(例えばMAb423)。

40

【0112】

スクリーニング法がこの目的で、すなわち、変調/阻害化合物の同定のために用いられる場合、非競合または競合アッセイを用いることができる。例えば、技術分野で公知の型

50

の競合アッセイでは、アルツハイマー病様凝集に及ぼす公知のインヒビターまたはモジュレーターの影響を、別の被検物質または作用物質の存在下または不在下で比較して、被検物質が目的のタンパク質に対する結合に関して公知のインヒビター/モジュレーターと競合する能力を決定することができる。

【0113】

被検化合物の選択

試験される化合物は、適切な活性に関して評価するのが望ましいいづれかのものでよい。

方法を新規インヒビター/モジュレーターを同定するための1次スクリーニングとして、または公知のインヒビター/モジュレーターを更に詳細に研究するための2次スクリーニングとして提供することができる。

10

作用物質は、天然または合成化学化合物でよい。アルツハイマー病様タンパク質を認識する、および/またはアルツハイマー病様タンパク質凝集を変調する抗体は、凝集過程に関して、推定の阻害または変調化合物の一つのクラスを形成する。より通常的には、相対的に小型の、好ましくは血液脳関門通過できる化学化合物が試験される。

【0114】

本発明のこの態様によるスクリーニングアッセイにおいて添加される被検物質または化合物の量が、用いる化合物の型に依存して通常試行錯誤により決定されることは、技術者には理解されよう。治療の局面において現実的に用いることができる、すなわち患者に対して非致死的であるレベルを選択できる。

20

【0115】

阻害の特異性

本発明のこの態様によるスクリーニング法を用いて、病的なアルツハイマー病様タンパク質凝集（例えばタウ-タウまたはタウ-MAP2結合）の選択的競合阻害の特性を示す化合物に関して、例えば分子の同一の領域を介してタウまたはMAP2のチューブリンへの正常な結合と干渉することなく、スクリーニングすることができる（WO96/30766参照）。

【0116】

アルツハイマー病様タンパク質凝集の可能性のあるインヒビター/モジュレーターにより、タウ、MAP2またはその誘導体のチューブリンへの結合のいずれか可能な干渉を決定するための適当な方法は、脱重合化チューブリン/MAP2またはタクソール安定化微小管の調製物を、工程(2)(b)で前記したタンパク質またはその誘導体と一緒に、タウ-タウまたはタウ-MAP2会合を変調または阻害できると推測される作用物質と接触させ、続いてタウ-チューブリンまたはMAP2-チューブリン結合を検出することを含む。またタウ-チューブリン結合を、例えばWO96/30766に記載されるように、例えば正常な細胞骨格分布により実証することもできる。

30

【0117】

チューブリンタンパク質またはそのフラグメントの調製方法を、結合パートナーと組み合わせることが可能であり、これは技術分野で公知であり、そして例えばSlobadaら(Cell Mobility(1976)(R. Goldman, T. PollardおよびJ. Rosenbaum編)コールド・スプリング・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1171~1212頁)により記載されている。

40

【0118】

細胞生存性

方法が細胞基盤の系を利用する場合、これは更に、例えば乳酸塩デヒドロゲナーゼアッセイキット(シグマ)を用いることによる、膜局在凝集性疾患タンパク質を発現する細胞の生存性を試験する工程を含むことができる。

タウ-タウ、タウ-MAP2またはMAP2-MAP2凝集が研究される場合(前記の「特異性」の項目を参照)、タウ-チューブリンまたはMAP2-チューブリン結合の阻害または干渉が、細胞が分割する能力の低下、そしてしたがって細胞生存性の低下とある

50

程度相関するので、この工程は、タウまたはMAP2のチューブリンへの結合の、被検物質によるいずれかの干渉の指標をも提供できる。

【0119】

治療および投与様式

前記の種々の態様によるスクリーニングアッセイの実施の後に、疾患関連タンパク質凝集を干渉するかまたは変調する能力に関して陽性であると試験された化合物、物質または分子の単離および/または製造および/または使用を続けてよい。

このように同定された化合物をアルツハイマー病等（実際にはアルツハイマー病様タンパク質凝集を生じるいずれかの症状）の診断、予後または治療的処置において使用するための組成物に処方できる。したがって、本発明また、別の態様において、本明細書で提供されるスクリーニング法により入手できる一つまたはそれ以上の阻害または変調化合物を含む医薬用処方にも及ぶ。

10

【0120】

かかるタンパク質凝集を変調するかまたはそれに影響する物質の同定の後、物質または作用物質を更に研究することができる。別の阻害/変調候補化合物は、ポリペプチドまたはペプチドフラグメントの3次元的構造のモデル化、ならびに特定の分子形状、大きさおよび電荷特性を有する、可能性のある阻害化合物を提供するための合理的な薬物設計の使用に基づいてよい。したがって本発明は、本明細書で提供されるスクリーニング法を用いて同定される、アルツハイマー病様タンパク質凝集を阻害または変調できる作用物質、またはその誘導体、活性部分、アナログ、変種または擬似物質の、アルツハイマー病様凝集の別のインヒビター/モジュレーターのスクリーニングまたは設計における使用をも提供する。

20

【0121】

前記したように同定された化合物を製造でき、そして/または調製物、すなわち、組成物、例えば医薬品、医薬用組成物または薬物の製造または処方において使用できる。

一般に、本発明によるインヒビターまたはモジュレーターは、単離および/または精製された形態、すなわち実質的に純粋な形態で提供される。これは、少なくとも90%、更に好ましくは少なくとも約95%、更に好ましくは少なくとも約98%の活性成分を示す組成物中に存在することを含んでよい。しかしながら、かかる組成物は、不活性担体またはその他の医薬的および生理学的に許容される賦形剤を含むことができる。以下で指摘されるように、本発明による組成物は開示される阻害/変調化合物に加えて、治療用途の一つまたはそれ以上の別の分子を含むことができる。

30

【0122】

このように、本発明による物質、例えばタウ-タウ凝集またはアルツハイマー病様タンパク質凝集のごとき別の凝集のインヒビターを、アルツハイマー病様タンパク質凝集を生じる症状のヒトまたは動物の肉体の処置の方法において使用するために提供できる。

したがって、本発明は、種々の態様において、前記した本発明の物質を含む医薬用組成物、医薬品、薬物またはその他の組成物、かかる組成物を患者に投与することを含む、例えばアルツハイマー病またはアルツハイマー病様症状の処置または予防のための方法、例えばアルツハイマー病の処置または類似の処置のために投与するための組成物の製造におけるかかる物質の使用、ならびにかかる物質を医薬上許容できる賦形剤等と混合することを含む医薬用組成物の作製方法にも及ぶ。

40

【0123】

とりわけ本発明は、細胞においてアルツハイマー病様タンパク質凝集を変調する方法であって、かかる凝集を阻害またはそうでなければ変調する作用物質を投与することを含み、したがってアルツハイマー病またはアルツハイマー病様タンパク質凝集が関連しているその他の疾患もしくは障害の処置において有用である方法を提供する。本発明は、更にタンパク質のアルツハイマー病様凝集と干渉する、またはそうでなければ変調する作用物質を患者に投与することを含む、アルツハイマー病様症状を処置する方法を提供する。

【0124】

50

個体に投与されるのがポリペプチド、抗体、ペプチド、核酸分子、小型分子、擬似物質または本発明による医薬的に有用なその他の化合物であっても、投与は（場合によっては、予防は、治療であると考えられ得るが）「予防的に有効な量」または「治療的に有効な量」であるのが好ましく、これは、個体に利益を示すのに十分である。実際に投与された量ならびに投与の速度および時間的経過は、処置されるべきものの特性および重篤度に依存する。処置の処方箋、例えば投与量等の決定は、一般の開業医およびその他の医師の責任の範囲内である。

【0125】

組成物を単独で、またはその他の処置と組み合わせて、処置すべき症状に応じて同時にまたは連続的に投与することができる。

10

本発明による、および本発明により使用するための医薬用組成物は、活性成分に加えて、医薬上許容される賦形剤、担体、バッファー、安定化剤または技術分野の当業者に公知のその他の材料を含んでよい。かかる材料は、無毒性であり、そして活性成分の効果に干渉してはいけない。担体およびその他の材料の正確な特性は、投与経路に依存し、投与経路は、経口、または例えば皮膚、皮下または静脈内注射によるものでよい。

【0126】

経口投与のための医薬用組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体の形態でよい。錠剤は、個体担体、例えばゼラチンまたはアジュバントを含むことができる。液体医薬用組成物には、一般に液体担体、例えば水、石油、動物または植物油、鉱油または合成油などがある。生理学的食塩水、デキストロースまたはその他の糖類溶液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどが含まれ得る。

20

【0127】

静脈内、皮膚もしくは皮下注射、または患部の注射用には、活性成分は、非経口的に許容される、ピロジェン不含で、そして適当なpH、等張性および安定性を有している水性溶液の形態である。適切な技術分野の当業者は、例えば等張賦形剤、例えば塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、乳酸塩リンガー注射液を用いて適当な溶液を十分調製できる。保存剤、安定剤、バッファー、抗酸化剤および/またはその他の添加剤を必要に応じて含むことができる。

前記した技術およびプロトコルの実例は、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Osol, A. (編)(1980)において見出すことができる。

30

【0128】

脳またはその他の望ましい部位に局在化様式で作用物質を投与することができるか、またはそれが脳またはその他の細胞を標的化するような様式で全身的に分配することができる。例えば、標的化治療を用いて、標的化系、例えば抗体または細胞特異的リガンドを使用することにより、活性物質をより特異的に特定の型の細胞に分配することができる。種々の理由で、例えば作用物質が許容し難い毒性である場合、またはそうでなければ非常に高量を必要とする場合、またはそうでなければ標的細胞に入ることができない場合、標的化が望ましい。

【0129】

40

これらの作用物質を直接投与する代わりに、処置すべき細胞中で生成されるか、またはその細胞に標的化される活性化物質により活性形態に変換するために、それらを前駆体の形態で投与することができる。

アルツハイマー病様タンパク質凝集で干渉できる作用物質を、例えばその内容物を外部環境から保護する適当な容器中で密封されたキットで提供することができる。かかるキットには、使用のための指示書が含まれてよい。

【0130】

動物

前記の論考の多くは、細胞系またはインビトロ基盤のアッセイに関連しているが、本明細書で開示された本発明は、動物基盤のアッセイで特に有用である。

50

したがって、本発明による宿主細胞は、トランスジェニック動物に含まれることができ、そして本発明は、更に前記の態様による融合ポリペプチド、例えばタウコアフラグメントの膜局在形態を発現する細胞を含むトランスジェニック動物を提供する。米国特許第5,912,410号および第5,898,094号(その開示を相互参照により本明細書に組み込まれる)で論じられるものに類似の様式でかかる動物が準備される、および/または用いられる。

【0131】

本発明のトランスジェニック生物は、すべて多くのその細胞内に、タンパク質凝集の疾患の病因に関連すると考えられるクローン化された組換えまたは合成DNA配列を含む。より具体的には、トランスジェニック生物は、外来性遺伝物質、例えば組織特異的プロモーター配列および膜標的化タンパク質の生成をコードする配列を含む、前記で詳細に記載した配列を含有する。一つまたはそれ以上の前記の配列を利用する本発明のトランスジェニック生物を生成することができるので、一般的に外来性遺伝物質を参照することによりトランスジェニック生物の生成についての一般的な記載が得られる。当業者はこの一般的な記載を適用して、前記した特定のDNA配列を生物に組み込み、以下に記載される方法および材料を利用して、これらの配列の発現を得ることができる。トランスジェニック生物、とりわけトランスジェニックマウスの生成に関してより詳細には、1989年10月10日発行の米国特許第4,873,191号(トランスジェニックマウスを生成する方法を開示するために出展明示により本明細書に組み込まれる)およびそこで参照され、そして引用されている多くの科学文献を参照されたい。

【0132】

外来性遺伝物質を雄または雌のいずれかの接合子の前核に配置することができる。より好ましくは、それを精子が卵に侵入した後、できるだけ早くに雄性前核に配置する。換言すれば、前核の輪郭が明確化され、十分に分離される、雄前核の形成直後に、各々は、接合子膜の近くに存在している。マウス受精卵の雄前核は、本発明の外来性遺伝物質の添加に好ましい部位である。

卵核または接合子の雌前核によりプロセッシングされる前に、接合子の雄DNA相補体に外来性遺伝物質を添加するのが最も好ましい。卵核または雌性前核は、おそらく雄DNAのプロタミンをヒストンで置換することにより、雄DNA相補体に影響する分子を放出し、それにより雌および雄DNA相補体の組み合わせを促進して二倍体接合子を形成すると考えられている。

【0133】

したがって、雌性前核により影響される前に、外来性遺伝物質を雄のDNA相補体またはDNAのいずれか別の相補体に添加するのが好ましい。例えば、雄性および雌性前核が、十分に分離されていて、双方が、細胞膜に接近して位置している、雄性前核の形成後、できるだけ早くに外来性遺伝物質を初期雄性前核に添加する。または、精子の核を非凝集化されるように誘導した後、それに外来性遺伝物質を添加できる。外来性遺伝物質を含有する精子を次いで卵に添加できるか、または外来性遺伝物質を添加された卵に、その後できるだけ早くに非凝集化精子を添加できる。

【0134】

本発明の目的のために、完全生物に成長することができる二倍体細胞の形成に接合子は必須である。一般に、接合子は、天然にまたは人工的に、一つまたは複数の配偶子からの二個の一倍体核の融合により形成された核を含有する卵に含まれる。したがって、配偶子核は、自然に適合可能なもの、すなわち機能性生物に分化および成長できる生存可能な接合子に至るものでなければならない。一般に、正倍数体接合子が好ましい。異数性の接合子が得られた場合には、染色体数は、いずれかの配偶子が起源する生物の正倍数体数について1以上変化すべきでない。

【0135】

類似の生物学的考察に加えて、物理学的な考察もまた接合子の核に、または接合子核の一部を形成する遺伝物質に加えることができる外来性遺伝物質の量の決定基準となる。遺

10

20

30

40

50

伝物質が除去されない場合、次いで、添加できる外来性遺伝物質の量は、物理学的に分解されないで吸収される量に限定される。一般に、挿入される外来性遺伝物質の容量は、約10ピコリットルを超えない。添加の物理学的影響は余りに大きく、物理学的に接合子の生存性を破壊してはならない。外来性遺伝物質などの、得られた接合子の遺伝物質は、接合子の機能的生物への分化および成長を生物学的に開始し、かつ、維持することができなければならないので、DNA配列の数および種類の生物学的限界は特定の接合子および外来性遺伝物質の機能に依存して変化し、当業者には容易に明らかになる。

【0136】

接合子に添加されるDNA配列のコピー数は、添加される外来性遺伝物質の全量に依存し、形質転換が生じるのを可能にする量である。理論的には、ただ一個のコピーが必要であるが；一般に一個のコピーが機能するのを確実にするために、多くのコピー、例えば1000~20000個の遺伝子のコピーを用いる。本発明に関しては、一般に、外来性DNA配列の表現型発現を増強するために、挿入された外来性DNA配列の各々の一個以上の機能的コピーを有しているのが有利である。

10

【0137】

外来性遺伝物質を核遺伝物質への添加を可能にするいずれかの技術を、それが細胞、核膜またはその他の存在する細胞性もしくは遺伝的構造に対して破壊的でない限り利用できる。外来性遺伝物質は、マイクロインジェクションにより核遺伝物質に優先的に挿入される。細胞および細胞性構造のマイクロインジェクションは、公知であり、技術分野で用いられている。

20

【0138】

したがって本発明は、適当な膜標的化配列をコードするクローン化された組み換えDNA配列を、受精した哺乳動物の卵（好ましくはマウスの卵）に注入できる方法を提供する。注入された卵を偽妊娠した雌に移植し、細胞が関連する疾患の病理学に関連するタンパク質を発現するトランスジェニックマウスを提供する期間まで成長させる。注入された配列は、トランスジェニック哺乳動物の特定の組織において（最も顕著には神経組織において）望ましいタンパク質を発現するように連結されたプロモーター配列を有して構築されている。例えば現在ヒト脳において生じることが解っているアルツハイマー病様凝集を生成するようにベクターをニューロン特異的発現に適合させるのが適している。事例にはLewisら(2000)のプリオン特異的プロモーターまたはThunckeら(2000)の神経特異的エノラーゼプロモーターなどがある。

30

【0139】

本発明のヒト以外の動物は融合ポリペプチドのためのホモ接合体またはヘテロ接合体でよい。哺乳動物には、ヒト以外の霊長類、げっ歯類、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタなどが挙げられる。げっ歯類にはマウス、ラットおよびモルモットなどが挙げられる。具体的には：

・増強された、または加速された病理を伴う、タンパク質凝集の疾患に関するトランスジェニック動物モデルの調製方法、およびかかる方法により作製されたトランスジェニック動物；

・いずれかの性別の創始動物（ F_0 世代）と、本明細書で論じたタンパク質に関してトランスジェニックでない動物であって、そして野生型であるのが好ましい動物との交配により F_1 世代を生成する方法。次いで子孫（ F_1 世代）をスクリーニングし、導入遺伝子を担持し、疾患の病理が増強されているものを選択する；

40

・適当な性別の2匹の F_1 動物を交配させることにより F_2 世代を作製する方法。次いで子孫（ F_2 世代）をスクリーニングし、適当な用量で導入遺伝子を担持し（すなわちヘテロまたはホモ接合体）、疾患の病理が増強されているものを選択する；

・トランスジェニック動物モデルの疾患表現型の変調の方法、および前記するように変調された表現型を有するトランスジェニック生物が提供される。

【0140】

本発明のヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を実験用の目的でアルツハイマー病様

50

疾患の研究に、およびかかる症状の徴候または進行を緩和するように設計された治療の開発に用いることができる。「実験用の」とは、かかる実験が行われる研究施設に適用できる現行の法律の下で動物実験または試験目的で使用が許可されていることを意味する。

【0141】

アルツハイマー病様タンパク質凝集の可能性のある診断、治療または予後用物質をスクリーニングまたは試験するために動物を使用できる（さらなる論考のためには以下を参照）。したがって、本発明の以下の態様は、アルツハイマー病およびアルツハイマー病様症状の研究の助けとなり得る動物モデルを提供する。インビボモデル系では、細胞で合成される膜局在アルツハイマー病様タンパク質凝集を引き起こすかまたは可能にすることにより、動物においてアルツハイマー病様症状が誘導される。この動物モデル系を用いて、アルツハイマー病またはアルツハイマー病様症状に関連する治療効果を有することが推測される化合物を動物に投与でき、症状に及ぼすいずれかの効果（例えば徴候またはいずれかその他の指標の改善）を研究することができる。とりわけ、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、動物の脳内で形成される凝集の量を低下させる能力に関して医薬用薬物の有効性を決定するのに有用である。ヒトのADの測定において用いられる生化学的および/または組織学的技術によりこれらの凝集を測定することができる（例えばMukaetova-Ladinska, E. B. ら、前出(2000)）。

10

【0142】

最も好ましくは、凝集（またはその阻害）は、例えば内因性の、全長タウをタンパク質分解性プロセッシングの結果であるタウのトランケートされたフラグメントの生成（または阻害、または廃止、または生成）により評価される。好ましい態様では、タウの凝集は、実際のAD PHFコアにおいて見出されるものに対応するトランケートされたコアフラグメントへのタンパク質分解性プロセッシングにより示される。しかしながら、この方法の診断生成物または副産物である一つまたはそれ以上のその他のフラグメントのいずれかの生成物をも用いることができる。

20

したがって哺乳動物は、薬物動態の局面で、かかる薬物の有効性を試験するのに、形成を防御するかまたは形成された凝集の量を低減させるのに、および既に形成された凝集を排除するかまたは低減させるのに有用である

【0143】

概して、試験される薬物を対照動物、または本発明のトランスジェニック動物ではない動物の群に、および同時に本発明のトランスジェニック動物に投与する。動物の脳において凝集の形成に影響するのに通常十分な時間、薬物を連続的に投与するのが好ましい。十分な時間薬物を投与した後、（複数の）トランスジェニック動物と共に（複数の）対照動物を屠殺した。動物の脳の試験は、前記のとおり行った。

30

【0144】

かかる系では、例えばタウ、またはタウ様凝集、例えばWischikら（前出(1995)）Laiら（前出(1995)）またはMukaetova（前出(2000)）の方法によりヒト脳組織で検出されるものの、形成の阻害を観察するために、例えばイムノアッセイにより、タンパク質凝集の可能性のあるインヒビターまたはモジュレーターの影響を前記のとおり決定または検出でき、ここでタウタンパク質の凝集した形態の測定は、脳組織において行われる。

40

例えば細胞内での凝集の生成は、組織学的に、および電子顕微鏡により可視化することができ、そしてこれらの凝集の防御は同様に評価される。

【0145】

（複数の）対照動物内の凝集沈着物の量を本発明の（複数の）トランスジェニック哺乳動物内に沈着する量と比較することにより、薬物の有効性に関する測定を行うことができる。当業者に公知の比較薬物試験プロトコルを、薬物を試験するために本発明のトランスジェニック哺乳動物と関連させて用いることができる。薬物の最終的な細胞内濃度を選択して、正確な疾患タンパク質および問題の薬物に対して適切にすることができるが、究極的に毒性、摂取等の点で臨床使用に相当である範囲にできる（例えば1 μ M ~ 1 mM、より好ましくは4 ~ 600 μ M）。

50

【 0 1 4 6 】

本発明のインピボスクリーニングアッセイは、試験される化合物により引き起こされるアルツハイマー病様タンパク質凝集の阻害または変調の程度を直接測定する必要はない。病的状態そのものに及ぼす下流の影響の代わりに、例えばアルツハイマー病を測定することができる。例えば、動物における行動影響、例えば運動、活力または活動状態の欠損、反射異常、環境の合図に対する記憶または応答の欠損の証拠があることは予測される。

【 0 1 4 7 】

本発明のトランスジェニック動物を用いて、疾患随伴タンパク質凝集の防御に関する薬物の有効性を試験することができるという点で、研究者が、疾患、例えばアルツハイマー病の処置におけるかかる薬物の有効性を試験することを可能にすることに関して、動物は 10
 貴重な研究手段である。症状自体に及ぼすいずれかの影響は、アルツハイマー病様タンパク質凝集の阻害の結果であり、そして単に一般毒性の影響ではないということを確認するために、好ましい場合、全例で、例えば本発明の前記の態様にしたがって、トランスジェニック動物アッセイをインピトロまたは細胞基盤アッセイと平行して、またはそれに続いて行うことができる。

【 0 1 4 8 】

したがって、前記で詳細に記載するように、本発明は、とりわけ、すべて本明細書で提供される核酸分子、ポリペプチドもしくはその誘導体、宿主細胞、トランスジェニック動物またはインピトロ膜局在モデル系の、アルツハイマー病様タンパク質凝集に及ぼす阻害 20
 または変調効果を有する被検物質をスクリーニングする方法における使用に関する。別の態様では、本発明は、前述の態様のスクリーニング法を用いて得られる阻害または変調化合物に及ぶ。

本発明の種々の別の態様および具体例は、本開示に鑑みて当業者に明白であろう。本発明の特定の態様および具体例は以下の図および実施例を参照して実例によってのみここで説明される。

【 実施例 1 】

【 0 1 4 9 】

膜結合タンパク質の生成

導入

通常、遊離のリボソームで翻訳されるタンパク質の mRNA を分泌タンパク質のシグナル配列 (S S) の封入により膜結合リボソームに標的化できる ; 3 非翻訳領域の特性も 30
 また標的化の効率に影響する (Partridge, K. A. ら、Cytotechnology 30: 37 ~ 47 (1999)) 。したがって通常可溶性であるタンパク質を小胞体の膜内に挿入できる。本発明者らは、この研究法を用いて、凝集を促進するのに必要とされるタウの局所濃度を生み出すタウの膜随伴形態を構築した。

【 0 1 5 0 】

タウのこれらの膜随伴形態を安定して発現する細胞系は、組織学の基準、細胞抽出物からのタウタンパク質の不溶性形態の沈殿、およびイムノプロットティングによるタンパク質 40
 分解性生成物の分析により、タウ凝集およびタンパク質分解性プロセッシングの証拠を示す。

【 0 1 5 1 】

発現系の概観

膜随伴タウフラグメントの生成のために用いられる発現系を図 9 にまとめる。系は、ラットアルブミンのシグナル配列が、cDNA の 5 末端で挿入されている場合、ウサギグロブリン mRNA が、膜結合リボソームで翻訳されるという観察に基づいている (Partridge, K. A. ら、前出) 。グロブリンの発現に関して前記されたベクター (図 9 a) を修飾して、シグナル配列の下流のタウ配列のフラグメントを組み込んだが、同時にグロブリンの 3 非翻訳領域は維持した (図 9 b) 。

【 0 1 5 2 】

タウの三つのトランケーション変異体 (アミノ酸 2 9 6 ~ 3 9 0 、 1 9 0 ~ 4 4 1 およ 50

び190~390)を各々SSタウ296~390、SSタウ190~441およびSSタウ190~390と称し、この系を用いて発現された。三つの変異体の構造は、全長タウおよび対照として用いた同等の溶解性のタウフラグメントと一緒に図5および10にまとめている。IPTG誘導プロモーターの制御下で全長タウ配列をも発現する3T6細胞でタンパク質を構成的に発現させた。

【0153】

SSタウ構築物の構築

図9aで示され、Partridgeら、前出(1999)により記載されたpcKSSSGG。

AgeI部位をグロブリン出発コドンで導入し、pcKSSSGGAgeIを作製するためのpcKSSSGGでのPCR基盤の変異誘発。

正プライマー：5 - g c c t t t t c a c c g g t g c a t c t g t c c a - 3

逆プライマー：5 - t g g a c a g a t g c a c c g g t g a a a g g c - 3

htau40 cDNA (Goedertら、Neurone 3: 519~526(1989) 参照)

【0154】

pcKSSタウ190~441

htau40のヌクレオチド1128(アミノ酸186)でAgeI部位を導入するためのPCR基盤の変異誘発。EcoRIで切断し(停止コドンを越えてタウ配列を切断する)、平滑末端化し、次いでAgeIを用い、psKSSSGGAgeIにライゲートし、BamHIで切断し、平滑末端化し、次いでAgeIでpcKSSタウ190~441を作製するためのフラグメント。ライゲーションは、アミノ酸186~189間でタウ配列を破壊し、それでアミノ酸190が、タウ配列の出発点である。

正プライマー：5 - t c t g g t g a a c c g g t a a a t a c g g g g - 3

逆プライマー：5 - c c c c g t a t t t t a c c g g a a c a c c a g a - 3

【0155】

pcKSSタウ190~390

ヌクレオチド1740でBamHI部位および停止コドンを導入するためのpcKSSタウ190~441におけるPCR基盤の変異誘発(タウ配列をアミノ酸390で終わらせる)。AgeIおよびBamHIで切断し、同一部位でpcKSSSGGAgeIにライゲートし、pcKSSタウ190~390を作製するためのフラグメント。

正プライマー：5 - c t t g t a c t c g a g c t a c g c c c c g t g g - 3

逆プライマー：5 - c g g g g c g t a g g a t a a g t a c a a g t c g - 3

【0156】

pcKSSタウ296~390

pcKSSタウ190~390のヌクレオチド1450(アミノ酸293)でAgeI部位を導入するためのpcKSSタウ190~390におけるPCR基盤の変異誘発。AgeIおよびBamHIで切断し、同一部位でpcKSSSGGAgeIにライゲートし、pcKSSタウ290~390を作製するためのフラグメント。

正プライマー：5 - g g c t c a c c g g t t a a t a t c a a a c - 3

逆プライマー：5 - g t t t g a t a t t a a c c g g t g a g c c - 3

これらの構築物は、発現ベクターpcDNA3.1中にあり、これはG418抵抗性マーカーを含有する。T40誘導細胞系にトランスフェクトするために、ゼオシン抵抗性マーカーを含有するpcDNA3.1zeoベクターにすべてをサブクローン化した。

【0157】

T40誘導構築物の構築

これは、p3SSベクター(lacI遺伝子を構成的に発現し、そしてヒグロマイシンを用いて選択される)をpOPRSVICAT(これは、Lacオペロンからのオペレーター配列と共に強力なRSVプロモーターを含み、そしてネオマイシンで選択される)と共に用いるストラットジーン系を基盤にした。簡単には、二つのベクターを細胞、例えば3T3または3T6繊維芽細胞に組み込む。lacIによるオペロンの抑制は、IPTGの添加により緩和される。T40構築物を調製するために、製造者の指示書にしたが

10

20

30

40

50

って、タウタンパク質フラグメントを p O P R S V I C A T ベクター（これは N o t I 部位を含有する）にクローン化した。

【 0 1 5 8 】

結果

コア凝集ドメインに対して指向する抗体、m A b 7 . 5 1 を用いる免疫蛍光標識により細胞を分析した (Novak, M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5837 ~ 5841(1991))。対照として、可溶性タウフラグメント 1 8 6 ~ 4 4 1 を発現する、安定してトランスフェクトされた 3 T 3 細胞を二つの異なる固定条件：(a) パラホルムアルデヒドまたは (b) グルタルアルデヒドおよびトリトン X - 1 0 0 で固定し、タウの反復ドメインに対して指向する m A b 7 . 5 1 で標識した。パラホルムアルデヒド固定の後、タウに関する標識は、細胞質中に拡散し (Schliwa ら、PNAS USA 78: 1037 ~ 1041(1981)) により以前に報告された)、一方、グルタルアルデヒドおよびトリトン X - 1 0 0 で固定された細胞は、微小管に沿ったタウの標識を示す。この標識パターンは、タウの可溶性フラグメントに典型的であるが；しかしながらタウ凝集の証拠は観察されていない。

10

【 0 1 5 9 】

安定してトランスフェクトされ、膜標的化最小凝集ドメイン、S S タウ 2 9 6 ~ 3 9 0 を発現する 3 T 6 細胞を酪酸ナトリウム 5 m M と共に 2 0 時間インキュベートし、タンパク質発現を増加させ、パラホルムアルデヒドで固定した。これらは、細胞質の至る所で小胞体との会合に合致する網様のパターンで m A b 7 . 5 1 により標識される (データは示していない)。しかしながら、このタンパク質は、細胞の小部分で検出可能なレベルまで発現されるだけであり、そしてタンパク質の凝集はめったに見られない。

20

対照的に、S S タウ 1 9 0 ~ 4 4 1 または S S タウ 1 9 0 ~ 3 9 0 で安定してトランスフェクトされ、それを発現する細胞の標識により大きな凝集が示され、そのいくつかは、直線状の外観を有する。これらの凝集は、しばしば核周囲の部分に密集し、そして時には繊維状の形態を有する (図 1 1)。

【 0 1 6 0 】

これらの凝集を発現する細胞の比率は、酪酸ナトリウムの添加により増加し、これは、タンパク質の発現レベルを増加させる (Gorman, C. M. ら、Nuc. Acids Res. 11: 7631 ~ 7648(1993); Kruh, J. Mol. Cell. Biochem. 42: 65 ~ 82(1982)) が、凝集は、タンパク質を構成的に発現する細胞においても見出すことができる。

30

また S S タウ 1 9 0 ~ 3 9 0 で安定してトランスフェクトされ、それを発現する細胞をトリトン X - 1 0 0 0 . 2 % の存在下グルタルアルデヒドで固定した後、7 . 5 1 で標識した。この固定プロトコルにより微小管結合タウタンパク質の可視化が可能になるが、タウの凝集もまた見られ、これは、それらがデタージェント抽出に安定である、すなわちその安定性自体が膜随伴に依存しないことを実証している (データは示していない)。

【 0 1 6 1 】

これらの細胞系で発現されるタンパク質を m A b 7 . 5 1 を用いるイムノブロットイングにより分析し、そしてタウ誘導およびブチラート処置の影響を試験し、全長タウおよびタウの可溶性フラグメントを発現する細胞系と比較した。

m A b 7 . 5 1 を用いるイムノブロットイングにより分析した S S タウ 1 9 0 ~ 4 4 1 タンパク質は、~ 4 0 K の見かけの R M M を有し、~ 2 5 K で特徴的な分解生成物、および ~ 3 0 K で余り優勢でない生成物を示す。タンパク質の発現レベルを酪酸ナトリウムでの処理により増加させることができ、これは、三つすべての生成物の量を増加させる (図 1 6)。ブチラートは、~ 1 8 および ~ 1 4 K で二つの小さな生成物の出現をも時折誘導する (図 1 7 参照)。

40

【 0 1 6 2 】

S S タウ 1 9 0 ~ 4 4 1 の存在下での全長タウタンパク質の誘導は、3 0 K、および 2 5 K での生成物の量を増加させるが、小さい生成物は、出現しない。

したがって、図 1 6 a を考慮して、ブチラートおよび I P T G 誘導の影響を比較した場合、ブチラートは、構成的に発現された組み込まれた遺伝子生成物の生成を非特異的に増

50

加させるように作用するようである（そのメカニズムは、十分には理解されていない）。これは、全長タウのみを特異的に誘導するIPTG誘導の対照として提供される。第1のパネルでは、ブチラートまたはIPTGでの処理の後の膜非標的化186~441フラグメントの発現に及ぼす影響を比較する。ブチラート（「B」）はより多くの186~441フラグメント、および非常に関連する推定トランケーション生成物を生成するが、IPTG（「I」）は生成しない。

【0163】

第3のパネルでは、前記したIPTG対照下誘導T40のみを単純に発現する細胞において同一条件を試験する。ここで、IPTG（「I」）のみがT40およびおよそ45kDの自然分解生成物のレベルを上昇させる。ブチラートは、効果を有さない。

10

【0164】

中央のパネルは、IPTG誘導プロモーターの下でSS190~441を構成的に、およびT40の双方を発現する細胞における双方の誘導法の影響を示す。誘導なしでは、低レベルのT40ならびにSS190~441に由来する特徴的な40kDおよび25kDのバンドが存在する。ブチラート（「B」）は、高レベルの40、30kDおよび25kDのバンドを誘導する。IPTG（「I」）によるT40の誘導は、40kDのバンドの構成的発現には影響せず、凝集依存性メカニズムにより40kDおよび25kD種双方を高レベルで生じる（図1参照）。したがって、低レベルのSS190~441が予め存在している場合、誘導されたT40は、40kD経路を介してプロセシングされ、25kDのトランケーション生成物を生じる。

20

【0165】

図16bを考慮すると、mAb7.51でのイムノプロットングにより分析されたSS190~390タンパク質は見かけのRMMが30Kであり、そして~18Kで分解生成物を示し、これは、PHFの最小凝集ドメインの大きさにほぼ対応する。タンパク質の発現レベルおよびその特徴的な18kDの分解生成物は、実質的には酪酸ナトリウムでの処理により増加する。再度、同等の可溶性のタウフラグメントは、同一の方法で分解されず、そして18kDの分解生成物の生成を引き起こさない、すなわちSS190~390の存在下全長タウタンパク質の誘導により30Kタンパク質の量がわずかしか増加しないが、小さな生成物の出現は、増加しない（図16b）。

【0166】

30

双方の場合で、膜標的化タウフラグメントで認められる分解パターンは同等の可溶性タンパク質で認められるものとは異なっている。膜標的化タンパク質をPHFのコアドメインに等しい~12/14Kフラグメントに分解できる（図17(a)参照）。したがって膜随伴により誘導されるタウフラグメントの凝集により、PHFで見られるようにコアドメインに対するタンパク質分解安定性が付与される。

膜局在タウフラグメントの不在下で誘導される全長タウタンパク質は、いくらか~45Kのフラグメントへの分解を示すが、小さなフラグメントの生成は存在しない。全長タウがSS190~441と共に発現される場合に認められる、小さなタウフラグメントの生成の増強（図16a）は、SS190~441凝集との相互作用により誘導されるタウのプロセシングを実証する。

40

【0167】

SS190~441を発現する細胞で生成された分解生成物を、凝集ドメインに対してNBおよびC-末端の双方であるエピトープに特異的な抗体を用いて分析した。この分析により、タンパク質ではN-およびC-末端の双方のトランケーションが起きることが示される（図17）。生成された最小のフラグメントは、PHFのコアドメインに対する抗体と反応するだけであり、類似の大きさである（~12~14K）。したがって、これらの細胞におけるタウタンパク質は、コアフラグメントまでPHF様プロセシングを行うようである。

【0168】

デタージェントトリトンX-100の存在下でさえ、SSタウタンパク質の双方をその

50

分解生成物と共に細胞抽出物から沈殿でき、これは、タンパク質が膜に随伴されているというよりむしろタンパク質が凝集していることを示唆している（図18）。比較的遅い速度（12,000g）でのタンパク質沈殿の分画、および残留物は、少なくとも50SのS値を有する粒子として挙動するが、300Sでは沈殿せず、MW ~ 1 - 2 × 10⁶の複合体への凝集と合致する。

【0169】

これらの結果は、事象の以下の経路を示している：最初に膜局在タンパク質により種まきされ、ERのサイトゾル表面で生じる凝集。タンパク質は、そのN-末端で切断され、シグナル配列が除去され、そして凝集を生じなかった場合、次いでこの形態がサイトゾル中の凝集物として、または微小管結合タンパク質として自由に現れる。本明細書で教示するタウ様タンパク質の膜標的化は、例えば誘導プロモーターの制御下で生成される全長タウの捕捉を促進する。次いで、全長タウの誘導の後の25kD単位の生成により示されるように、更に全長タウを同一のタンパク質分解性プロセッシング経路に導く（図1）。

【0170】

結論

膜局在タンパク質としてタウフラグメントを発現することにより、可溶性タンパク質を用いることが見出されている細胞における凝集に対するバリアが打破される。例えばSSタウ190~390フラグメントは12~14Kフラグメントを含む短いフラグメントに効果的にプロセッシングされ、これはPHFのコアで見出されるものに類似している。

【0171】

したがって本発明者らは、シグナル配列を用いてタウの膜局在形態を作製することができ、このように膜局在タンパク質として発現されたタウフラグメントが凝集を形成し、そしてこれらのタウ凝集が、その大きさおよび7.51エピトープの存在の双方に関してPHFのものに匹敵するタンパク質分解安定性コアを有することを見出した。本発明者らは、またプロセッシングされたフラグメントの出現が全長タウタンパク質の誘導の後に増加することを確認し、可溶性タウが凝集に捕捉されることを解明した。

したがって、タウ凝集およびプロセッシングは、細胞において達成され、そして凝集を阻害または変調する化合物に関して試験するアッセイにおいて凝集を分析することができる。

【実施例2】

【0172】

インヒビターをスクリーニングする

IPTG制御下、SSタウ190~441フラグメントおよび誘導T40を発現する細胞を6ウェル皿にプレートした。プレートした1日後、試験薬物を指示された濃度で、そして9時間後に添加し、IPTGを5mMで添加した。IPTG添加の15時間後に細胞をPBSで洗浄し、次いでゲルバッファー中で可溶化した。SDS-PAGEによりサンプルを分離し、抗体7.51を用いてイムノプロットングを行った。これらの細胞におけるT40誘導により分解生成物の増加が導かれる（図1および図16cに示す）。試験薬物のこの増加に及ぼす影響をイムノプロットの数量化により分析した。

【0173】

図2は、チオニン、クロロプロマジンおよびタクリンの阻害活性が膜標的化細胞モデルでどのように比較されたかを示している。活性および不活性化化合物間には明確な差異がある。標準的な阻害モデルを用いてデータをより詳細に数学的に分析した（図3）。

モデルが生じた値は、タウがリン酸化されたインビボ系で予測されたものに合致し、その結合親和性は、結果的に低下し、そしてタウ凝集インヒビターの見かけの阻害強度は、同時に増加した。

【0174】

これは、神経病的疾患において誘導された立体配座重合化を行うタンパク質の凝集現象のインヒビターに関するスクリーニングにおける本発明の有用性を実証している。とりわけ、凝集インヒビターにより凝集を修飾でき、そしてその活性を特徴的な分解生成物の生

10

20

30

40

50

成によりモニター観察することができる。

【実施例 3】

【0175】

トランスジェニック動物の調製および使用

トランスジェニック動物を以下のように調製した。

動物：

多くの受精卵母細胞を得るために、4週齢のNMRIマウスをゴナドトロピンで処理して過剰排卵を誘導する。妊娠した雌ウマの血清(PMS)を卵胞刺激ホルモン(FSH)を擬似するために用い、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を黄体形成ホルモン(LH)を擬似するために用いる。PMSを交配の2日前に腹腔内投与し、46時間後にhCGを投与する。hCGの投与の後、雌マウスを種付け用雄と交配させる。同じ日に10週齢のNMRIマウスを精管切除した雄と交配させ、注射された卵母細胞の再移植のための養母を得る。翌朝、膈栓を有するマウスから受精した卵母細胞を収集する。

10

【0176】

卵母細胞の収集：

頸部脱臼によりマウスを屠殺し、そして卵管を切開した。新たに排卵された卵母細胞が卵丘細胞により取り囲まれて、卵管の上部のパン(膨大部)で見出される。同時に一つの卵管をM2培地およびヒアルロニダーゼの入ったペトリ皿に移す。一對の時計修理用ピンセットを用いて卵母細胞を卵管から取り出す。ヒアルロニダーゼは、卵を卵丘細胞から分離する。次いで、二つの連続した清浄工程でM2培地により、卵母細胞をいずれかその他の細胞および材料から分離する。必要とされる時まで卵母細胞をCO₂5%インキュベーター内のM16培地中に37℃で保存する。

20

収集した卵母細胞が初期前核段階にある場合、そこで雄性および雌性前核を分離し、細胞質から区別できる。

【0177】

マイクロインジェクションのためのDNA構築物の調製(図6参照)：

構築物は、導入遺伝子の脳での発現を指示するThy1プロモーターの制御下の適当なcDNAを含有する。プラスミドを宿主細菌から抽出し、キアゲン・プラスミド・精製キット(キアゲン(ヒルデン、ドイツ)より販売)により精製した。適当なエンドヌクラーゼ(Not1)により構築物を直線状にした。キアゲン(商標)ゲル抽出キット(キアゲン(ヒルデン、ドイツ)より販売)を用いて望ましいフラグメントをアガロースゲルから単離した。構築物をマイクロインジェクションバッファー中2μl/μlに希釈した。

30

【0178】

マイクロインジェクション：

倒立顕微鏡のステージの各々の側に一つのマイクロマニピュレーターをマウントし；一つのマイクロマニピュレーターは、ホールディング・ピペットを制御し、他方は、インジェクション・ピペットを制御する。卵をパラフィンオイルで被覆したM2培地を伴うデプレッション・スライド・インジェクション・チャンバーに配置する。一つの卵をホールディング・ピペットに置き、雄性前核をDNA溶液を含有するインジェクション・ピペットで注入する。注射後、卵母細胞を再度CO₂5%インキュベーター内でM16培地中37℃で再移入するまで培養する。

40

【0179】

再移入：

偽妊娠のマウスを麻酔し、無傷の注入された卵母細胞をマウスの卵管に再移入させる(10~15個の卵母細胞を一つの卵管に)。これらの養母は出産まで移植された胚を担持した。

トランスジェニックマウスの同定：

トランスジェニックマウスを同定するために二つの異なる研究法を用いた。

【0180】

PCR：

50

導入遺伝子特異的プライマーを用いてPCRでトランスジェニックマウスを検出した。

Thy 1F2 : g C A g g A g g T g C T C A g g g A C A g c

TautxR : C A C T g C C g C C T C C C g g g A C g T g

このプライマーの組み合わせによりThy I - s s t a u 2 9 6 ~ 3 9 0 導入遺伝子を担持するマウスにおいてのみ4 1 5 b pのPCRフラグメント、およびThy I - s s t a u 1 8 6 ~ 4 4 1 導入遺伝子を担持するマウスにおいてのみ7 1 1 b pのPCRフラグメントを生じる。

D N e a s y (商 標) 組 織 キ ャ ッ ト (キ ア ゲ ン (ヒ ル デ ン 、 ド イ ツ)) を 用 い て 0 . 5 c m の マ ウ ス の 尾 か ら ゲ ノ ム D N A を 調 製 し た 。

【0181】

サザンプロット：

PCR陽性被験動物の10 μgゲノムDNAをEcoRIで消化し、そしてアガロースゲル1%上で電気泳動に供した。サザンプロットを準備し、プロモーターからの2つの³²P標識フラグメントでハイブリダイズした。これは、XbaIおよびNcoIでの消化により得られた。内因性シグナルを導入遺伝子シグナルと比較してコピー数を推測できる。

組み込みの様式を試験するためにゲノムDNAをXbaIで消化した。創始動物1およびF1動物は、単一の組み込みを示した。創始動物86およびF1動物は二重の組み込みを示し、そして二つの独立した系統に分けられた。

プロットを65 で20時間ハイブリダイズし、65 で2回、1時間洗浄した。

【0182】

RNA発現：

RNA発現を研究するために、ノーザンプロット分析を行った。Trizol(商標)(ギブコBRL、ペイズレイ、スコットランド)を用いて脳全体からRNAを調製した。RNA 20 μgを電気泳動に供し、そしてプロットングした。247 bp PCRフラグメントに対してハイブリダイゼーションを実施した。プライマーは、導入遺伝子特異的であった：g l o b 5 7 8 ~ 5 9 7 (A A g A A C A A T C A A g g g T C C C C)、o l i g o 2 0 (A T T A g g C A A C A T C C A T C A T A A A C C)。プロットを65 で20時間ハイブリダイズし、65 で2回、1時間洗浄した。

【0183】

図12~15は、マウスモデルで得られた結果を示し、そして図1(E)で示すものに対応すると考えられる経路を介して内因性マウス脳タウの凝集依存的タンパク質分解性プロセッシングにより、どのように18 kD種を生じるかを記載する。

【図面の簡単な説明】

【0184】

【図1a】図 図1は、実施例1(細胞基盤)および実施例3(動物モデル)に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。(A)(1:)膜標的化配列、この場合シグナル配列+トランケートされたタウ(SSタウ190~441)単独の構成発現に基づくアッセイ。膜随伴分子が組み合わさって25 kDフラグメントの形成に至る。図17(a)で示すように、25 kDフラグメントが反復ドメインおよびC末端に伴う免疫反応性を含有するが、208~238残基間に位置するエピトープは含有しない。フラグメントの長さは、~175残基であり、適当なN末端切断部位は、~266残基であり、位相変化したN末端の最初の反復は、PHFコアから単離されたタウタンパク質で見出される。(A)(2:)第2のタンパク質(T40-全長タウ)に基づくアッセイで、そのタンパク質分解性切断は、シグナル配列により小胞体に標的化されたSSタウ190~441の低いバックグラウンドレベルの存在により「種まき」される。IPTGにより誘導されたT40は、膜でまたはSSタウ190~441誘導凝集のサイトゾルへの放出後のいずれかで、SSタウ190~441種に結合する。この捕捉されたT40は、ここで更に最初にプロセッシングされ、SSタウ190~441誘導種と同等のゲル移動度および免疫反応性を有す

10

20

30

40

50

る種のレベルまで上昇する。次いで更に同一経路でプロセシングされ、25 kDの分解生成物のレベル増加を生じる。タウ凝集インヒビターは、IPTG存在下で25 kDフラグメントのT40誘導による生成を遮断する。

【図1 b】図1は、実施例1（細胞基盤）および実施例3（動物モデル）に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。（B）SSタウ190～441の第2の切断パターンに基づくアッセイ。この場合、膜随伴分子はわずかに異なる様式で反復領域を介して組み合わせられ、ゲル移動度30 kD（～200残基）、18 kD（～125残基）および12/14 kD（～95残基）を有する更にトランケートされた三つの生成物を生じる。

【図1 c】図1は、実施例1（細胞基盤）および実施例3（動物モデル）に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。（C）SSタウ190～390の構成発現および凝集に基づくアッセイ。この場合、タンパク質分解性プロセシングにより18 kD（～125残基）のゲル移動度を有する単一の優勢な種を生じる。これは、反復ドメインを介するSSタウ190～390分子の凝集により生じ、反復ドメインからすべて誘導されるタンパク質分解的に保護されたフラグメントが得られる（すなわち～266～～390）。図17（b）で説明される反復ドメイン結合パターンの変種では、わずかに異なる18 kD種が、T40の低いバックグラウンドレベルを有するSSタウ190～390の随伴により生じ、4反復に等しい長さのフラグメントを得ることができるが、分子のC末端テール内で390を越える1反復との等価物により伸長する（すなわち～295～～422）。図16 dで説明される異なるスキームでは、三個の反復のみから成る少量のフラグメント（すなわち～95残基）が、～19/22 kDに対応する非定型のゲル移動度を有する少数の二量体形態を形成できる。

【図1 d】図1は、実施例1（細胞基盤）および実施例3（動物モデル）に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。（D）T40バックグラウンドの存在下でのSSタウ296～390の構成的発現に基づくアッセイ。この場合、二つの優勢な種が形成され、一つは、SSタウ296～390フラグメントそのものに対応する12/14 kDであり、別の種は、18 kDのゲル移動度を有する。後者はSSタウ296～390の分解生成物ではあり得ない。24 kDに相当する優勢なゲル移動度を有する二量体の主要な形態（図16 d参照）である可能性もない。したがって、SSタウ296～390凝集により捕捉されているT40のトランケーションにより18 kDを生じる可能性が最も高い。この種は、また4反復の等価物に対応し（すなわち～125残基）、示すように、T40およびSSタウ296～390凝集間の可能な二つの結合相互作用により生じ得る。このモデルでは、T40からの18 kD種の形成の律速段階は、系内の凝集する、トランケートされたタウの量により決定され得る。

【図1 e】図1は、実施例1（細胞基盤）および実施例3（動物モデル）に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。（E）トランスジェニックマウスの脳内のSSタウ296～390の構成発現に基づくアッセイ。（D）に記載の系でのように、優勢な生成物は、SSタウ296～390そのものではなく、より高分子量の18 kDの種である。前記で論じた理由のために、動物に遺伝子組換えにより導入されたSSタウ296～390の種の二量体または分解生成物である可能性はない。むしろ、捕捉および内因性のマウスのタウのタンパク質分解性プロセシングにより生じる可能性が最も高い。この場合、マウスの脳は、3反復アイソフォームのみを発現することが解っている。この場合に生じた18 kDフラグメントは、4反復の長さに等しい種が得られるC末端伸長を伴う形態である可能性が最も高い（～125残基、または3反復アイソフォームの～266および～422残基の間のフラグメント）。しかしながら、わずかに異なる結合パターンもまた可能であり、ここで伸長は、N末端においてである（すなわち3反復アイソフォームの～235および～390残基の間のフラグメント）。

【図2】図2。チオニン、クロルプロマジンおよびタクリンの阻害活性を膜標的化された細胞モデルで比較した（25 kD種の生成）。活性および不活性化化合物間に明らかな区別が存在する（実施例2参照）。

【図3】図3。図2からのデータを標準的な阻害モデルを用いて更に詳細に数学的に分析

10

20

30

40

50

し、そして数量的処理（ガウス - ニュートン法）して K I を解いた。細胞内のタウ - タウ結合の K d 値を ~ 5 0 0 n M、および対応する K I 値を ~ 3 3 n M と仮定することにより、データは、非常に近似する。これらの値の有意性は、インビトロのタウ - タウ結合に及ぼすリン酸化の影響について公知であることと比較することにより理解できる（Wischik, C. M. ら、前出(1997)参照）。

【図 4 a】図 4 (a) は、対化されたらせん状フィラメントの構造（上図）およびアルツハイマー病の進行中の神経原繊維濃縮体の免疫化学（下図）を示す。

【図 4 b】図 4 (b) は、種々モノクローナル抗体の結合部位の、異なる形態の N - および C - トランケートされたタウへの結合部位の概略図を示す。

【図 5 a】図 5 (a) は、ヌクレオチドおよびヒトタウタンパク質アイソフォームの予測されるアミノ酸配列を示す。配列は c D N A クローン h t a u 4 0 から誘導された。

【図 5 b】図 5 (b) は、本発明のいくつかの構築物の配列を示す。

【図 6 a】図 6 (a) は、トランスジェニックマウスを準備するためのマイクロインジェクションで使用した構築物を示す。(i) T h y 1 - s s タウ 2 9 6 ~ 3 9 0 および (i i) T h y 1 - s s タウ 1 8 6 ~ 4 4 1 がある。

【図 6 b】図 6 (b) は、より詳細な T h y 1 - s s タウ 2 9 6 ~ 3 9 0 構築物を示す。これは、T h y - 1 発現ベクターにクローン化され、次いで「マウス胚の操作」、a labo tayoty manual 第 2 版、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、C S H、ニューヨーク、Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. 編(1994)からの方法を用いて、N M R I マウスの受精卵母細胞にマイクロインジェクションを行った。

【図 7】図 7 はタウ、M A P 2 (成熟型)、M A P 2 C (幼若型)および高分子量タウ (P N S および神経芽腫細胞系で見出される) の概略図を示す。これらのタンパク質は、類似の微小管結合ドメインを共有するが、実質的には、配列および N - 末端突出ドメインまでの伸びで異なっている。タウおよび M A P 2 の幼若型は、タンデム配列を三個だけ有している。4 反復型の M A P 2 も存在する。

【図 8】図 8 は、ヒトタウ (上列) およびヒト M A P 2 (下列) のタンデム反復領域における配列差異を示す。縦の矢印は、G l u - 3 9 1 で終わるトランケートされた P H F コアフラグメントの限界を示しており、チュープリン結合セグメントは、下線で示す。

【図 9】図 9 は、本発明の一つの具体例による構築物を示す。(a) は、ラットアルブミンのシグナル配列を、ウサギグロブリンをコードする c D N A の出発コドンの前に挿入してグロブリン m R N A の膜標的化を達成した。図 9 (b) は、アミノ酸 1 9 0 ~ 4 4 1 をコードするヒトタウ c D N A のフラグメントが挿入されてグロブリン配列の一部を置換し、N - 末端シグナル配列を有するタウフラグメントを発現したことを示す。グロブリン 5 および 3 非翻訳領域は、構築物中で保持された。

【図 1 0】図 1 0 は、宿主細胞において発現される本発明のタウフラグメントの概要を示す。タウの三つのフラグメントは、すべてコア凝集ドメインを含有し、N 末端シグナル配列を伴って発現された。比較のために、全長タウと同様に二つのフラグメントの可溶性形態をも発現させた。

【図 1 1】図 1 1 は、3 T 6 細胞の安定したトランスフェクションの後の S S タウ 1 9 0 ~ 3 9 0 の局在化を示す。N - 末端シグナル配列に連結されたヒトタウの最長のアイソフォームのアミノ酸 1 9 0 ~ 3 9 0 をコードする c D N A でトランスフェクトした後に安定したクローンとして単離された 3 T 6 細胞を、5 m M 酪酸ナトリウムと共に 2 0 時間インキュベートしてタンパク質発現を増加させ、バラホルムアルデヒドで固定し、タウの反復ドメインに対し m A b 7 . 5 1 で標識した。これらの細胞は、S S タウ 1 9 0 ~ 4 4 1 を発現する細胞に類似の形態学を示すが、S S タウ 1 9 0 ~ 3 9 0 での安定したトランスフェクションの後に単離された細胞は、一貫して、大きなタウ凝集を示す比率がより高い、タウフラグメントの高レベル発現を示した (実施例 1 参照)。

【図 1 2】図 1 2 は、野生型 (「W t」) およびトランスジェニックマウス 1 系列 (「1」) R N A の特異的プローブを用いるノーザンプロット分析を示し、トランスジェニックマウス 1 系列でのトランスジェニック R N A の高レベル発現が示された。S 2 6 対照は、

10

20

30

40

50

同一の負荷量を示す（実施例3参照）。

【図13】図13は、mAb7.51を用いる免疫沈降によるSSタウ290～391の精製を示す。マウス脳0.1gを溶解バッファー（150mM NaCl、0.01% SDS、0.1% NP40、50mM トリス、100μg/ml PMSF、1mM DTT、1μg/ml ロイペプチン）500μlを用いて均質化した。次いで懸濁液を氷上で1分間超音波処理し、ベンチトップ（エッペンドルフ）遠心で14000rpmで4分間遠心した。これにより「S1」上澄分画が導かれる。第1の免疫沈降をmAb342を用いて行い、内因性マウスタウの調製物を枯渇させた。S1分画を抗体342の1/10容量（1:10）と共にインキュベートし、振盪しながら4℃で2時間インキュベートし、次いでプロテインAセファロースビーズ（溶解バッファー中10容量/容量%）100μlを加え、4℃で1時間インキュベートし、ベンチトップ遠心で、14000rpmで1時間遠心した。mAb7.51を用いる別の免疫沈降のために上澄を採取した。1/10容量/容量% mAb7.51を加え、振盪しながら4℃で2時間インキュベートした。プロテインAセファロースビーズ40μlを加え、4℃で1時間インキュベートし、14000rpmで15秒間遠心し、前記した溶解バッファーで3回洗浄した。次いでラエムリサンプルバッファー30μlを加え、85℃で5分間加熱し、30秒間遠心した。次いで上澄を15% SDS-Pageゲルに負荷した。IP751レーンは、1系列からのトランスジェニック動物におけるSSタウ290～391タンパク質生成物の存在に対応する～12～14kDでの差異を示している。高分子量での暗い背景は、免疫プロットの展開の過程で検出された内因性マウス免疫グロブリンの存在による（実施例3参照）。

10

20

【図14】図14は、免疫沈降を行わずに、前記で指示した溶解バッファー中に調製したS1分画を示す。mAb7.51を用いる免疫プロットングにより、導入遺伝子に対応する～12～14kDに加えて、～18kDのゲル移動度を有する新規なより優勢な種が示された。これは、1系列の全個体で15か月までの動物の年齢にしたがって異なった程度で認められた。各々5か月、4か月および4か月の月齢の三つを示している。エピトープマッピング（示していない）は、18kDの種が、mAb7.51（反復ドメインにおけるエピトープ）およびポリクローナル抗血清K9JA（「DAKO A/S」、またタウの反復ドメインに位置するエピトープをも認識する）により認識されることを実証した。18kD種は、208～238残基間に位置するエピトープを認識するC-末端ポリクローナル抗血清T46.1またはmAb342により認識されなかった。18kD種は、導入遺伝子生成の生成物の分解として生じることができず、SSタウ296～390の二量体としても生じることができない。したがって18kD種は、図1に示す内因性マウス脳タウの凝集依存的なタンパク質分解性プロセッシングにより生じる可能性がある。

30

【図15】図15は、2次元ゲル電気泳動（2DE）、銀染色および免疫プロットングを示す。マウス脳500mgを溶解バッファー（前記参照）2ml中で均質化し、氷上で超音波処理し、14000rpmで遠心した。S1分画を採取し、95℃で5分間沸騰し、14000rpmで5分間遠心し、上澄を取り、そしてセントリコン3000を用いて10倍に濃縮した。この20% タンパク質懸濁液を2-DEゲルに負荷した。第1の次元は、等電点電気泳動であり、第2の次元は、15% SDS-PAGEである。ゲルを銀染色し、平行してゲルを同一条件下で作動させ、そしてプロットングし、次いで7.51抗体（前記参照）と共にインキュベートした。黒色の矢印は、12～14kD遺伝子生成物を示し、そして二重線は、18kDの種に相当する。加えて、これもまた野生型からトランスジェニック動物を区別するゲル移動度の低い、未だ特性化されていないスミアが在る。このスミアは、これもまた内因性のマウスタウに由来するいくつかの高分子量タウ生成物を含有する可能性がある。用いた調製用プロトコルに依存して、その他の単離された高分子量タウ免疫反応性スポットもまた変動的に観察される（実施例3参照）。

40

【図16a】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(a)は、免疫プロットングによる、タウフラグメントを発現する細胞の分析を示す。タウフラグメントを安定して発現し、そしてIPTG誘導プロモーターの制御下全長タウをも発現

50

する細胞を、5 mM IPTGまたは5 mM 酪酸ナトリウムと共に24時間インキュベートした後、15% SDSゲル上で分析し、続いてタウの反復ドメインのエピトープに結合するmAb 7.51で免疫プロットした。SSタウ190~441タンパク質は、ゲル上で~40Kの見かけのRMMを有し、そしてそれは、~25Kのフラグメントに分解される。対照的に、可溶性タウ186~441フラグメントおよび可溶性T40は異なる分解プロファイルを示す。SSタウ190~441を発現する細胞における全長タウ(I)の誘導により40K、25Kタンパク質、および、ことによると少量の30Kフラグメントの出現の増加が引き起こされる。酪酸ナトリウムの添加によりトランスフェクトされたタンパク質の発現が、増加し、(B)は、また双方のフラグメントの量をも増加させ、そして30Kフラグメントの出現を誘導する。

10

【図16b】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(b)。SSタウ190~390タンパク質は、~30Kの見かけのRMMを有し、これは、~18Kで少量の分解生成物を伴う。全長タウの誘導により30Kタンパク質の量がわずかに上昇する。ブチラート処理により30Kフラグメントの量が大きく増加し、そして18kDaのフラグメントの量も増加する。この分解パターンは、可溶性186~391フラグメントまたは全長T40では認められない。

【図16c】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(c)は、イムノプロットによるタウフラグメントを発現する細胞の分析を示す。IPTG誘導プロモーターの制御下で安定してタウフラグメントSSタウ296~390を発現し、そして全長タウをも発現する細胞を5 mM IPTG(「I」)または5 mM 酪酸ナトリウム(「B」)と共に24時間インキュベートした後、15% SDSゲルで分析し、続いてタウの反復ドメインのエピトープに結合するmAb 7.51でイムノプロットを行った。未標識レーンは、18kDに対応するゲル移動度を伴う小さなバンドのみを示す。「B」と称したレーンは、18kDに対応する移動度を有する優勢なゲルバンドおよび14kDに対応する小さなバンドを示す。「I」と称したレーンは、18kDに対応するゲル移動度を有する小さなバンドを示す。この細胞系における18kDバンドの誘導を図1(d)にて説明する。タウフラグメントSSタウ296~390は、~14kDのゲル移動度を有するので、18kD種は、導入されたタウフラグメントの分解生成物として現れることができず、例えば図16(d)で認められる24kD二量体の形成の証拠もない。

20

30

【図16d】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(d)は、インビトロ凝集で細菌により発現されたタウdGAEフラグメント(残基297~391)が、その主要な形態が、~24kDのゲル移動度を有している一連の高いオーダーのオリゴマーをどのように自発的に形成するのかを示す。~19/22kDのゲル移動度を有する、二量体が部分的に分解されている可能性が最も高い、少量の不定型オリゴマーが存在する。

【図16e】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(e)の左側のパネルは、(a)で示された効果の複写であり、ここでIPTGは、比較のために25K、30Kおよび40Kタンパク質のレベル増加を生じている。同一の実験を25Kタンパク質のチオニン遮断生成物の存在下で実施し、これもまた30Kタンパク質の生成を低減した。しかしながらチオニンは、ブチラートで認められる25Kおよび30Kバンドの検出レベルを低下させない。したがってチオニンは、25Kバンドを生じる全長タウの捕捉およびプロセッシングを遮断することが示される。

40

【図17a】図17(a)は、SSタウ190~441のタンパク質分解性プロセッシングを示す。SSタウ190~441を発現し、そしてIPTGでの処理により全長タウの発現が誘導される細胞(右側レーン)を、タウの長さに沿って位置するエピトープを認識する四つの抗体で分析した。ゲルは、タウの反復ドメインを認識するmAb 7.51を用いた分析を示し、これによりコア凝集ドメインを含有するすべてのタウフラグメントが表される。残りのカラムは、mAb 7.51陽性フラグメントとその他の三つの抗体との反応性の概要を示す。その結果もまた、全長タウおよびSSタウ190~441のプロセッシン

50

グにより生成されたフラグメントの概略図において示される。全長タウのみが、四つすべての抗体により認識される。SSタウ190~441よりもわずかに大きいフラグメントは、全長タウのN-末端トランケーションにより生成される。SSタウ190~441よりも小さな二つのフラグメントは、N-末端またはC-末端プロセシングのいずれかにより生成される。二つの最も小さなフラグメントは、コアドメインに対する抗体とのみ反応し、これは、このドメインのタンパク質分解安定性を実証している。

【図17b】図17(b)は、SSタウ190~390のタンパク質分解性プロセシングを示す。SSタウ190~390を発現し、そして酪酸ナトリウムで処理された細胞(右側レーン)は、SSタウ190~390および~18kDaの単一のタンパク質分解性生成物を生成する、表および右側の図で示されるように、18kD種は、mAb7.51とのみ免疫反応性である。図1の記載で示す理由で、考えられるフラグメントの境界を右側に示す。

10

【図18】図18は、細胞抽出物からのタウ凝集物の沈殿を示す。(a)SSタウ190~441または(b)SSタウ190~390を発現し、そして全長タウを発現するように誘導された細胞を均質化し、そして720gで3分間遠心し、核後上澄(pns)を生成した。pnsを12,000gで2分間遠心し、膜および大きな凝集物を沈殿させ、そしてこの遠心からの上澄を200,000gで22分間遠心した。0.1%トリトンX-100で処理し、膜タンパク質を可溶化したpnsで同一の分析を実施した。デタージェントを伴わないまたは伴う12K上澄の比較(レーン3,7)は、デタージェント抽出後の上澄により多くのタンパク質が存在することを示している。双方の場合で、ペレットに有意な量のタンパク質も現れる(レーン4,8)。12K上澄の200Kgでの遠心により残りのタンパク質が沈殿する(レーン6,10)。

20

【図19a】図19(a)は、重要な核形成因子がタウ捕捉を開始し、次いで自己触媒性になる「種」を提供する概念図を示す。

【図19b】図19(b)は、アルツハイマー病の推定される病原モデルを示す。タウ凝集は、軸索輸送の失敗およびその結果であるニューロン死の前に、タウ凝集が最も近い過程である。タウ凝集カスケードは、タウ遺伝子の上流変化から、または1次変異から生じる種まき/核形成事象のいずれかにより誘発される。

【図20】図20は、タンパク質凝集の疾患において役割を果たすタンパク質を列挙する表を示す。疾患それ自体、関与すると考えられる凝集ドメインおよび/または変異、および推定(最大)フィブリルサブユニットの大きさをも列挙している。各タンパク質に関する一つまたはそれ以上の文献参照を提示する。

30

【図21】図21。酸可溶性PHF-タウの除去後のPHFコア調製物中のタンパク質の配列分析。Stahlら(Biochemistry 29: 8879~8884(1990))のスクラピー・フィブリルプロトコールにしたがって残留物を可溶化した。単一のADの脳からの典型的な調製物に関して収量を示す。見かけのゲル移動度のバンドにおけるPHFコアタウタンパク質と同時精製されると見なされるタンパク質フラグメントおよび対応する残基をkDで示す。SDS-または電気泳動抵抗性複合体の形態で同時精製されるタウ以外のタンパク質は:ユビキチン、ポリリンおよびミトコンドリア複合体IIIのコアタンパク質-2(「core-2」)である。ATPシンターゼサブユニット9(「ATP-9」)はブランクのAプロテインと同時精製される形態で見出された。ポリリン配列もまた34kD種のAsp-N*およびCNR**消化物から同定された。

40

【表 1】

References

- Arendt *et al.* (1995) *Neuroscience* 69, 691-698.
- Braak *et al.* (1994) *Neuroscience letters* 171, 1-4.
- Brion *et al.* (1999) *American Journal of Pathology* 154, 255-270. 10
- Cork *et al.* (1988) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 49, 629-641.
- Duff *et al.* (2000) *Neurobiology of Disease* 7, 87-98.
- Geula *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4, 827-834.
- Gotz *et al.* (1995) *EMBO Journal* 14, 1304-1313. 20
- Harada *et al.* (1994) *Nature* 369, 488-491.
- Ikegami *et al.* (2000) *Neuroscience letters* 279, 129-132.
- Ishihara *et al.* (1999) *Neuron* 24, 751-762.
- Janus *et al.* (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1502, 63-75. 30
- lewis *et al.* (2000) *Nature Genetics* 25, 402-405.
- Nelson *et al.* (1995) *Neurobiology of Aging* 16, 315-323.
- Roertgen *et al.* *Neurobiology of Aging* 17, 243-247.
- Schultz *et al.* (2000) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 59, 39-52. 40
- Spittaels *et al.* (1999) *American Journal of Pathology* 155 2153-2165.

Sturchler-Pierrat et al. (1997) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 13287-13292.

Thuncke et al. (2000) unpublished.

Additional References

- Abrahamson, M., Jonsdottir, S., Olafsson, I. & Grubb, A. (1992) 10
Hereditary cystatin C amyloid angiopathy identification of the
disease-causing mutation and specific diagnosis by polymerase chain
reaction based analysis. *Human Genetics* 89, 377-380.
- Booth, D.R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C.V., Hutchinson,
W.L., Fraser, P.E., Hawkins, P.N., Dobson, C.M., Radford, S.E.,
Blake, C.C.F. & Pepys, M.B. (1997) Instability, unfolding and
aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid
fibrillogenesis. *Nature* 385, 787-793. 20
- Carrell, R.W. & Gooptu, B. (1998) Conformational changes and disease
- serpins, prions and Alzheimer's. *Current Opinion in Structural
Biology* 8, 799-809.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi,
G. & Dobson, C. (1999) Designing conditions for in vitro formation
of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National
Academy of Sciences, USA* 96, 3590-3594.
- Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. (2000) Presenilins and 30
Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms.
Progress in Neurobiology 60, 363-384.
- Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin,
D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M.,
Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerby,
M.S., Shaw, C.-M., Gooptu, B., Elliott, P.R., Finch, J.T., Carrell,
R.W. & Lomas, D.A. (1999) Familial dementia caused by polymerization 40
of mutant neuroserpin. *Nature* 401, 376-379.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P.,
Vonsattel, J.P. & Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in

neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.

Dische, F.E., Wernstedt, C., Westermark, G.T., Westermark, P., Pepys, M.B., Rennie, J.A., Gilbey, S.G. & Watkins, P.J. (1988) Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 31, 158-161.

Gasset, M., Bladwin, M.A., Lloyd, D.H., abriel, J.-M., Holtzman, D.M., Cohen, F.E., Fletterick, R. & Prusiner, S.B. (1992) Predicted a-helical region of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 10940-10944. 10

Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterisation of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885-890. 20

Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.

Gorevic, P.D., Casey, T.T., Stone, W.J., DiRaimondo, C.R., Prelli, F.C. & Frangione, B. (1985) b-2 Microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *Journal of Clinical Investigation* 76, 2425-2429. 30

Gustavsson, A., Engström, U. & Westermark, P. (1991) Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form amyloid-like fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 1159-1164.

Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., 40

Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J.Q., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B.J., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in *tau* with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.

Johansson, B., Wernstedt, C. & Westermark, P. (1987) Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 1087-1092.

10

Lomas, D.A., Evans, D.L., Finch, J.T. & Carrell, R.W. (1992) The mechanism of α_1 -antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357, 605-607.

Maury, C.P. & Baumann, M. (1990) Isolation and characterization of cardiac amyloid in familial amyloid polyneuropathy type IV (Finnish): relation of the amyloid protein to variant gelsolin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1096, 84-86.

20

Paulson, H.L. (1999) Human genetics '99: trinucleotide repeats. *American Journal of Human Genetics* 64, 339-345.

Pepys, M.B., Hawkins, P.N., Booth, D.R., Vigushin, D.M., Tennent, G.A., Soutar, A.K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C.C.F., Terry, C.J., Feast, T.G., Zalin, A.M. & Hsuan, J.J. (1993) Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362, 553-557.

30

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papaetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. & Nussbaum, R.L. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.

40

Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.

Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.X.,

Hung, W.Y., Kato, T. & Asayama, K. (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 481-490.

Sletten, K., Westermark, P. & Natvig, J.B. (1976) Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *Journal of Experimental Medicine* 143, 993-998.

10

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 6469-6473.

Uemichi, T., Liuepnicks, J.j. & Benson, M.D. (1994) Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation* 93, 731-736.

20

Westermark, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermark, G.T. & Betsholtz, C. (1990) Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87, 5036-5040.

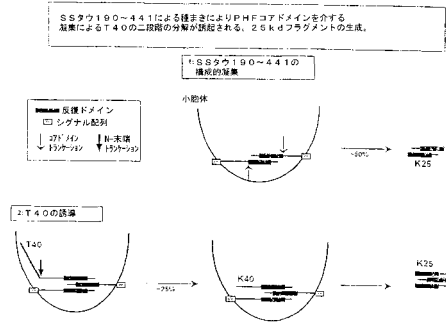
Westermark, P., Johnson, K.H., O'Brien, T.D. & Betsholtz, C. (1992) Islet amyloid polypeptide - a novel controversy in diabetes research. *Diabetologia* 35, 297-303.

Westermark, P., Johnson, K.H. & Pitkanen, P. (1985) Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis. *Applied Physiology* 3, 55-68.

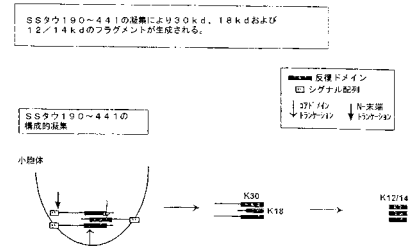
30

Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., M., R. & Klug, A. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 4506-4510.

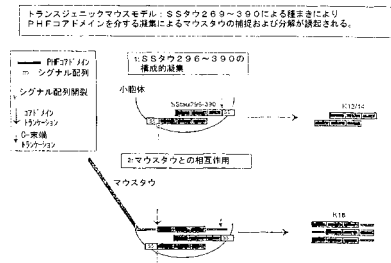
【図1a】



【図1b】

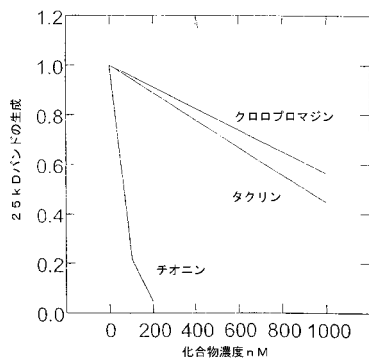


【図1e】

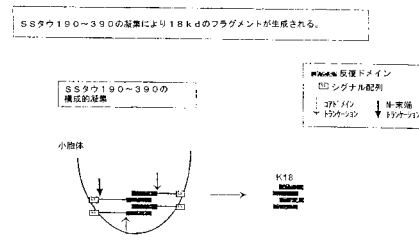


【図2】

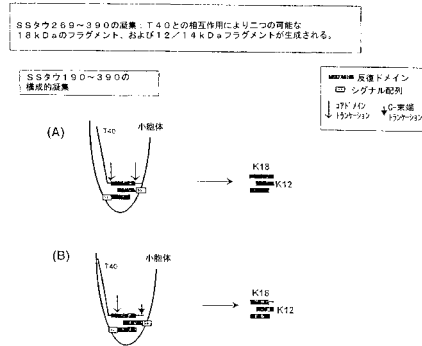
T40+40kD → 25kD細胞アッセイにおける化合物の活性。
結果は25kDバンドの相対的生成として示す。



【図1c】



【図1d】

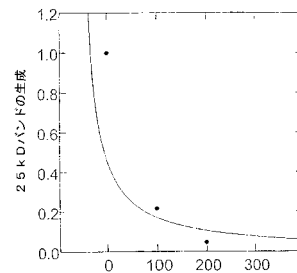


【図3】

チオニン：膜-タウモデル
T40+40kD → 25kD細胞アッセイ

標準的な阻止モデルにより予測される細胞活性：

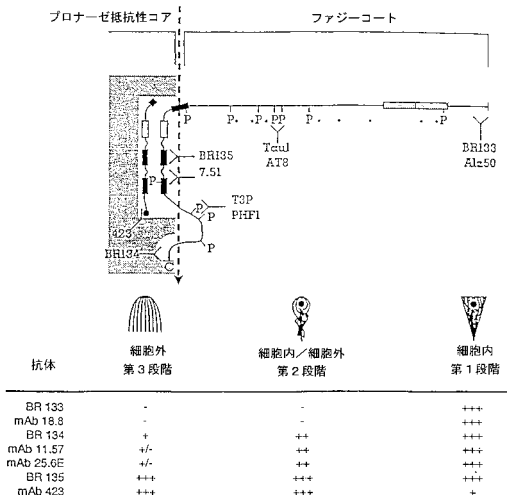
$$\text{活性} = \frac{[\text{タウ}]}{([\text{タウ}] + K_d * (1 + [\text{チオニン}] / K_I))}$$



観察された活性対予測された活性 $r = 0.999$

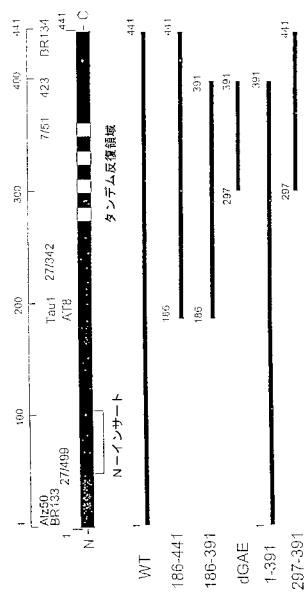
| | |
|---------------------|--------|
| 細胞内タウ濃度 | 415 nM |
| タウ-タウ結合親和性 | 500 nM |
| チオニン K _I | 33 nM |

【図4a】



【図4b】

タウのN-およびC-末端トランケーション



【図5a】

```

ANG GCC GAG CCC GCG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT GAC GCT GGG ACC TAC GGG TTC
Met ala glu pro arg gln gln phe glu val met glu asp has ala gly thr tyr gly leu
1 5 10 15 20
GCG GAC AGG AAA GAT GAG CGC GCG TAC ACC ATG GAC CAA GAG GGT GAC ACC GAC
gly asp arg lys asp gln gly lys thr met his gln asp gln gly asp thr asp
25 30 35 40
GCT GGC CTG AAA GAA TCT CCG CTG CAG ACC ACC ACT GAG GAC CGA TCT GAG GAA CCG GCG
ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
45 50 55 60
TCT GAA ACC TCT GAT GCT AAG GGC ACT CGA ACA GCG GAA GAT GCG ACA GCA CCC TTA CGG
ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr ala glu asp val thr ala pro leu val
65 70 75 80
GAT GAG GGA GCT CCG GGC AAG CAG GCT GCG GCG CAG CCC CAC AGC GAG ATC CCA GAA GGA
asp glu gly ala pro gly lys gln ala ala ala gln pro his thr glu ile pro glu gly
85 90 95 100
ACC ACA GCT GAA GAA GCA GGC ATT GSA GAC ACC CCC AGC CTG GAA GAA GAT GCT GCT GGT
thr ala glu glu ala val ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly
105 110 115 120
CAG GTG ACC CAA GCT CCG ATG GTC ADP AAA GAG AAA GAC GGG ACT GGA AGC GAT GAC AAA
his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys
125 130 135 140
AAA CCG AAG GGG GCT GAT GGT AAA ACG AAG ATC GCC ACA CCG CCG GGA GCA CCG CCG CCA
lys ala lys gly ala asp gly lys thr lys ile ala thr pro arg gly ala ala pro pro
145 150 155 160
GCG CAG AAG GGC CAG GCC AAC CCG ACC AGS ATT CCA GCA AAA ACC CCG CCG GCT CCA AAG
gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys
165 170 175 180
ADA CCA CCG AGC TCT GGT GAA CPT CCA AAA TCA GGG GRT CCG AGC GGC TAC AGC AGC CCG
the pro pro ser ser gly gln pro pro lys asp gly asp arg ser gly tyr ser ser pro
185 190 195 200
GGC TCC CCA GGC ACT CCC GGC AAG CCG TCC CCG ACC CCG TCC CTT CCA ACC CCA TCC ACC
gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser asp thr pro ser leu pro thr pro pro thr
205 210 215 220
GAG GAG CCG AAG AAG GTG CCA GTG CTC GGT ACT CCA CCG AAG TGG CCG TCT TCC GGT AAG
arg glu glu lys lys val ala val arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys
225 230 235 240
AGC CCG CTG CAG ACA GCG CCC GTC CCC AGS CCG GAC CTG AAG AAT GTC AAG TCC AAG ATC
ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile
245 250 255 260
GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG GAC CAG CCG GGA GGC GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG
gly ser thr gla asn leu lys his gln pro gly gly lys val gln ile ile asn lys
265 270 275 280
AAG CTG GAT CTT AGC AAC GTC CAG TCC AAG GGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAC GTC
lys leu asp leu ser asn val gln ser lys cys gly ser lys asp asn ile lys his val
285 290 295 300
CCG GGA GCG GCG AAG CTC CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC TCC
pro gly gly ser val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser
305 310 315 320
AAG TGT GCG TCA TTA GGC AAC ATC CAT CAT AAA CCA GGA GGT GGC CAG GTG GAA GTA AAA
lys cys gly ser leu gty asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
325 330 335 340
TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAG AGA GTC CAG TCG AAG APT GGG TCC CTG GAG AAT ATC
ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
345 350 355 360
ACC CAG GTC CCG GCG GGA RAT AAA AAG APT GAA ACC CAC AAG CTG ACC TTC CCG GAG
thr his val pro gly gly asp lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu

```

Figure 5a

Figure 5a cont ...

【 図 5 b 】

角括弧 シグナル配列を示す
太字 チューブリン結合セグメントを示す

SS*ウ186-441

[MKWVTFLLLLFISGSFAFSPV]KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPLTPP
TRFPKVAVVRTPKSPSSAKSRLQTAPVPMFDLKNVKSIGSTENLKHQP
GGKVKQIINKLIDLNSVQSKCGSKDNKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSK
CGSLGNHHKPGGGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE
THKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVWGDTSRPHLSNVSSISIDMVDSF
QLATLADEVSAASLAKQQL

SS*ウ186-390

[MKWVTFLLLLFISGSFAFSPV]KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPLTPP
TRFPKVAVVRTPKSPSSAKSRLQTAPVPMFDLKNVKSIGSTENLKHQP
GGKVKQIINKLIDLNSVQSKCGSKDNKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSK
CGSLGNHHKPGGGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE
THKLTFRENAKAKTDHGA

SS*ウ296-390

[MKWVTFLLLLFISGSFAFSPV]NIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG
NIHHKPGGGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
RENAKAKTDHGA

【 図 6 a 】

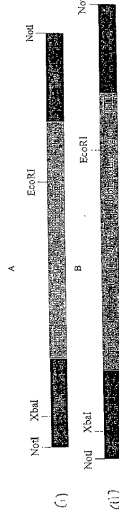
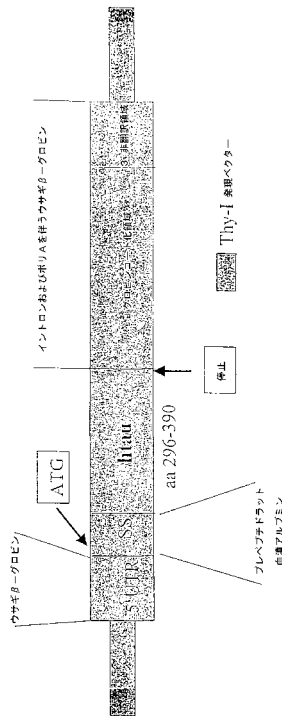


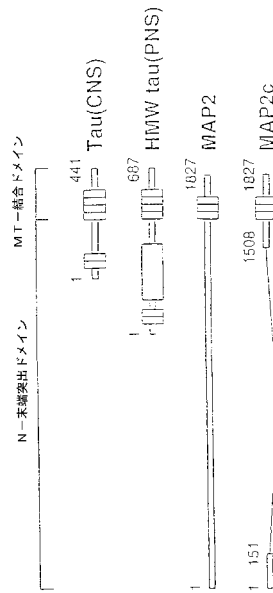
Figure 6a

【 図 6 b 】

マウスの受精卵母細胞へのDNAマイクロインジェクションのために
用いられるアミノ酸296~390を構築する



【 図 7 】



D L R H V K S K I G S T E N tau
 S MSF2
 ↓
 I K H Q P G G G F V Q I I N F K L D L S I V Q S K C C S K D N tau
 I X K Q R L I F K R MSF2
 ↓
 I E H V P G G G V Q I V Y F K P V D L S R V T S K C C S I G N tau
 S A H N K I H MSF2
 338 340 342
 I H H P G G G Q V E V K S E K L D F K E N V O S K I S L I D N tau
 R R K I E V E R A V MSF2
 ↓
 I E H V P G G G K K I E I K L I I e n a k a k e h g a e tau
 A H N M N D D Q K H H MSF2

Figure 8

【 9 】

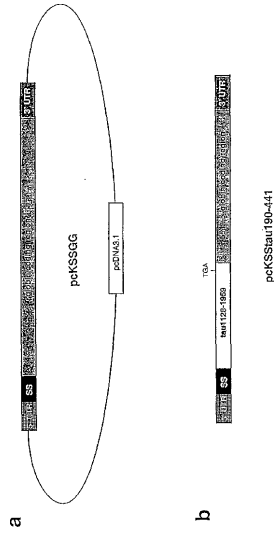
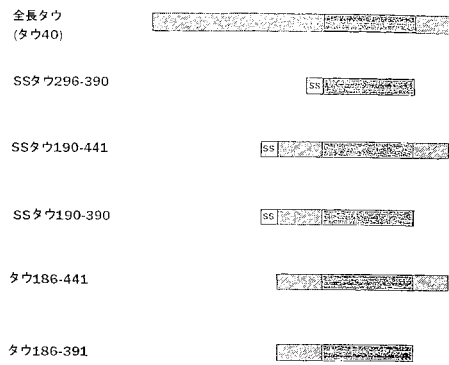


Figure 9

【 10 】



PHFコアドメイン
 シグナル配列

【 11 】

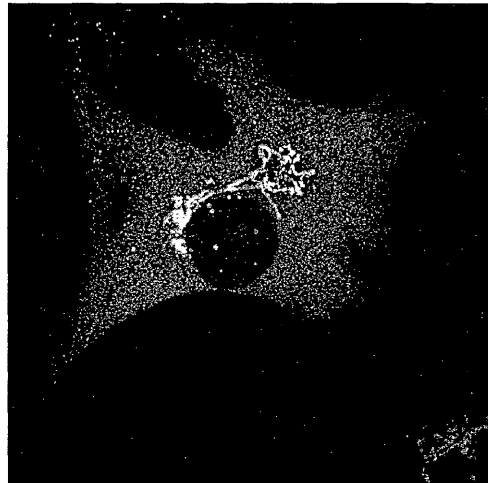
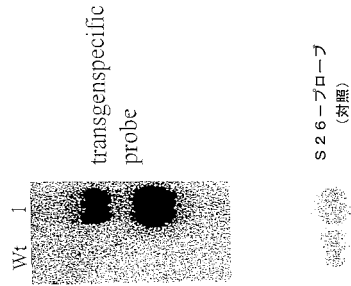


Figure 11

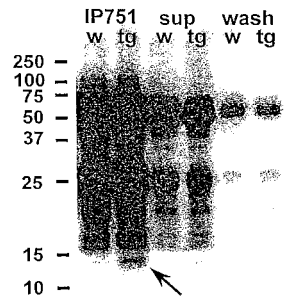
【 図 1 2 】

アミノ酸296~390 (ライン1) 構築物のノーザンブロット分析により
高レベル発現が示される導入遺伝子特異的プローブ



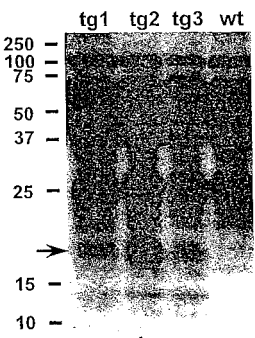
【 図 1 3 】

IP7. 51が後続するPre-IPにより
12kDでwtおよびtg間の顕著な差異が示される。



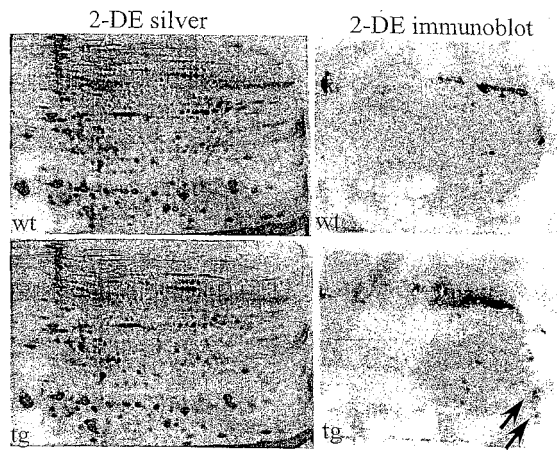
【 図 1 4 】

ライン1の三つの異なるマウスからの
S1分画が18kDを示す。



【 図 1 5 】

マウス脳 (6か月) ライン1 (アミノ酸296~390)
からの煮沸および濃縮S1の2-DE



【 図 1 6 a - b 】

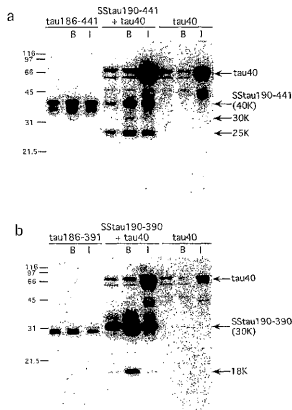


Figure 16a and 16b

【 図 1 6 c 】

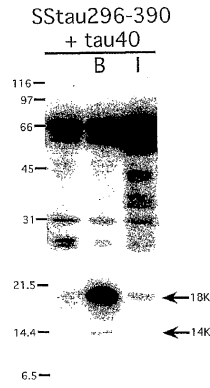
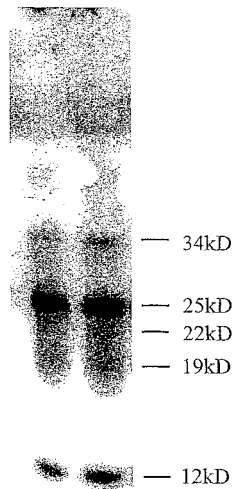


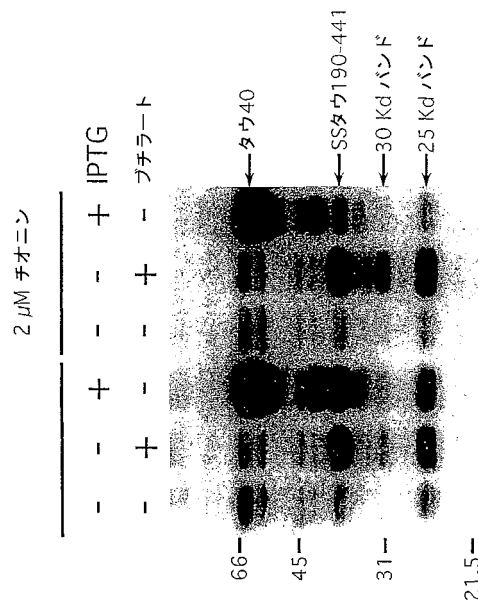
Figure 16c

【 図 1 6 d 】

細菌により発現された dGAE のインビトロ凝集



【 図 1 6 e 】



【 図 17 】

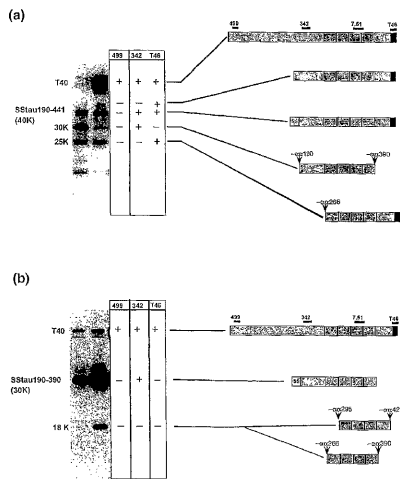
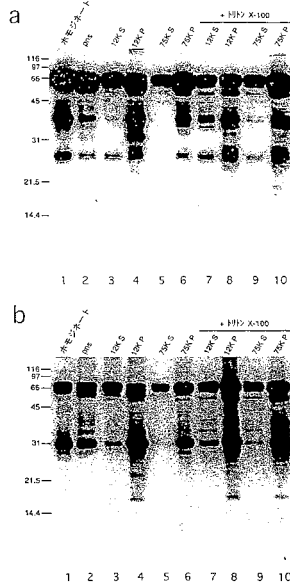
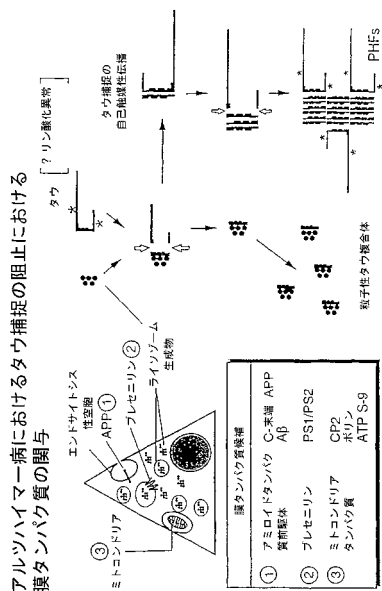


Figure 17

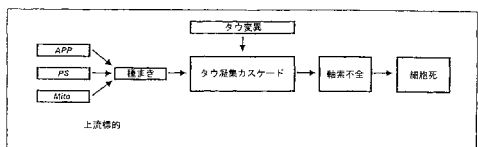
【 図 18 】



【 図 19 a 】



【 図 19 b 】



【 図 20 - 1 】

| 抗体名 | 抗体種別 | 抗体濃度 | 抗体メーカー |
|-------|-----------|-----------|-------------------|
| 7 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | PharMingen (1998) |
| 8 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Gibco (1992) |
| 9 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Wako (1998) |
| 10 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Hyalone (1998) |
| 11 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Copier (1998) |
| 12 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 13 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 14 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 15 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 16 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 17 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 18 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 19 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 20 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 21 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 22 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 23 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 24 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 25 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 26 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |
| 27 抗体 | モノクローナル抗体 | 100 µg/ml | Genex (1998) |

【 20 - 2 】

| 項目 | 内容 | 参考文献 |
|-------|---------------------|-------------------------|
| 1225 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | 10-14 |
| 10-14 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Geneston et al. (1991) |
| 10-14 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Guarison et al. (1997) |
| 8-5 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Marty & Shabane (1990) |
| 1225 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Genest et al. (1995) |
| 9 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Born et al. (1995) |
| 14 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Pepys et al. (1993) |
| 3-9 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Vestermak (1999) |
| 7-10 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Quaranta et al. (1994) |
| 3-4 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Silber et al. (1970) |
| 3-5 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Johansson et al. (1987) |
| | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Chen et al. (1998) |
| | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Chiu et al. (1999) |

【 21 1 】

| 項目 | 内容 | 参考文献 |
|------|---------------------|---|
| 4644 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Q ¹⁰ P G G K V Q I V Y P ¹¹ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | F ¹ V T L ¹ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Q ¹⁰ P G G K V I V Y P ¹¹ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | F ¹ V T L ¹ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | A ¹ V P T Y D L G ¹⁰ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | D ¹⁰ L K T K E ¹⁰ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | N ¹⁰ F E N L A ¹⁰ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | Q ¹⁰ P G G K V Q I V Y K P ¹¹ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | F ¹ V T L ¹ |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | V ¹ T L G T |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | G ¹⁰ A P P Q P Q D L E F J K L P |
| 7-2 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | D ¹⁰ I D A K I A A ¹⁰ |
| 4-0 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | H ¹⁰ Q ¹⁰ P G G K S V Q I V E Y K P V D L S K V ¹¹ |
| 5 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | A ¹⁰ R ¹⁰ H D S G Y E V H Q K L V F F A D V ¹⁰ |
| 5 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | H ¹⁰ D S G Y E V H L L A ¹⁰ |
| 5 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | V ¹⁰ E V H Q L F ¹⁰ |
| 5 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | V ¹⁰ E V H Q L F ¹⁰ |
| 5 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | T A A F I G A G A A G ¹⁰ |
| 2-6 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | P ¹⁰ K V O V Y K P V D ¹⁰ |
| 2-6 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | F ¹ V L T G T L ¹⁰ |
| 2-6 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | H D I A A K F I G A G A A T V ¹⁰ |
| 2-6 | 多量性汗腺 (全身性) (多量性汗腺) | H D I A A K F I G A G A A T V ¹⁰ |

フロントページの続き

| | | | |
|---------------|-----------|---------------|---|
| (51) Int.Cl. | | F I | |
| C 1 2 P 21/02 | (2006.01) | C 1 2 P 21/02 | C |
| G 0 1 N 33/15 | (2006.01) | G 0 1 N 33/15 | Z |
| G 0 1 N 33/50 | (2006.01) | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/53 | (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | D |

(72)発明者 ヴィスシック, クロード・ミシェル
イギリス国、アバディーンシャー エービー25 2ゼットディー、アバディーン、フォレスター
ヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デ
パートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72)発明者 リッカード, ジャネット・エリザベス
イギリス国、アバディーンシャー エービー25 2ゼットディー、アバディーン、フォレスター
ヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デ
パートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72)発明者 ホースレイ, デービッド
イギリス国、アバディーンシャー エービー25 2ゼットディー、アバディーン、フォレスター
ヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デ
パートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72)発明者 ハリントン, チャールズ・ロバート
イギリス国、アバディーンシャー エービー25 2ゼットディー、アバディーン、フォレスター
ヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デ
パートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72)発明者 テーリング, フランツ
ドイツ国、10117 ベルリン、ドロシーンシュトラッセ 94、インスティテュート・オブ・
ファーマコロジー・アンド・トキシコロジー、ユニバーシティ・ホスピタル・チャリテ

(72)発明者 シュタメル, カルステン
ドイツ国、10117 ベルリン、ドロシーンシュトラッセ 94、インスティテュート・オブ・
ファーマコロジー・アンド・トキシコロジー、ユニバーシティ・ホスピタル・チャリテ

(72)発明者 ツアブケ, クラウディア
ドイツ国、10117 ベルリン、ドロシーンシュトラッセ 94、インスティテュート・オブ・
ファーマコロジー・アンド・トキシコロジー、ユニバーシティ・ホスピタル・チャリテ

審査官 高 美葉子

(56)参考文献 特開2001-352860(JP, A)
特表平11-502925(JP, A)
国際公開第00/068416(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
A01K 67/027
C07K 14/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq

| | | | |
|---------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 神经退行性疾病中蛋白质聚集的材料和方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP4580618B2 | 公开(公告)日 | 2010-11-17 |
| 申请号 | JP2002559452 | 申请日 | 2002-01-02 |
| 申请(专利权)人(译) | 阿伯丁大学的大学学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | Uisuta实验室有限公司 | | |
| [标]发明人 | ヴイスシッククロードミシエル リッカードジャネットエリザベス ホースレイデービッド ハリントンチャールズロバート テーリングフランツ シュタメルカルステン ツアブケクラウディア | | |
| 发明人 | ヴイスシック,クロード・ミシエル リッカード,ジャネット・エリザベス ホースレイ,デービッド ハリントン,チャールズ・ロバート テーリング,フランツ シュタメル,カルステン ツアブケ,クラウディア | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 A01K67/027 C07K14/47 C07K19/00 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 A61K45/00 A61P25/28 A61P43/00 C12N15/12 C12N15/85 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | A01K67/0275 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2217/05 A01K2217/20 A01K2227/105 A01K2267/0312 A01K2267/0318 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/4711 C07K2319/00 C12N15/8509 G01N33/6896 G01N2500/00 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNAA A01K67/027 C07K14/47 C07K19/00 C12N5/00.102 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D | | |
| 代理人(译) | 津国 肇 | | |
| 优先权 | 2001000119 2001-01-03 GB | | |
| 其他公开文献 | JP2004531224A5 JP2004531224A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

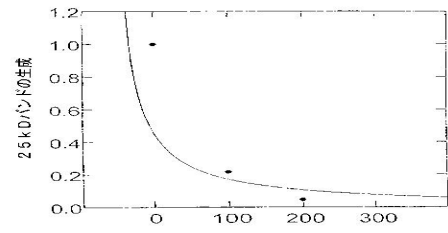
病理学上的聚集疾病蛋白 (ADP, 例如tau蛋白) 与病理状况 (例如, 阿尔茨海默病) 相关, 其中聚集疾病蛋白 (ADP, 例如, tau蛋白) 通过诱导构象聚合相互作用在病理上聚集。一种诱导或建模病症的方法, 其中: (i) 衍生自ADP或来自启动ADP病理性聚集的蛋白质的聚集蛋白质;公开了特征在于提供包含蛋白质的膜定位融合蛋白的步骤的方法。基于ADP的融合蛋白膜定位导致ADP蛋白的高亲和力捕获位点暴露, 以促进可能是系统天然或异源的另一种ADP的聚集。它被认为。该方法可以在体外, 或在细胞和动物模型中进行, 并用于监测聚集, 例如, 通过监测作为聚集结果的ADP相关的修饰产物的形成来监测聚集过程的调节剂。它可以屏幕。还提供了与该方法相关的方法, 材料或过程。

】

チオニン：膜-タウモデル
 $T + 40 + 40 \text{ kD} \Rightarrow T + 25 \text{ kD}$ 細胞アッセイ

標準的な阻止モデルにより予測される細胞活性：

$$\text{活性} = [\text{タウ}] / ([\text{タウ}] + K_d * (1 + [\text{チオニン}] / K_I))$$



| | |
|--------------------|-----------|
| 観察された活性対予測された活性 | r = 0.999 |
| 細胞内タウ濃度 | 415 nM |
| タウ-タウ結合親和性 | 500 nM |
| チオニンK _I | 33 nm |