

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/078633

発行日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(43) 国際公開日 平成15年9月25日(2003.9.25)

(51) Int. Cl.⁷

F 1

C 1 2 N 15/00
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 38/00
 A 6 1 K 39/395

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-576626 (P2003-576626)	(71) 出願人	000002831 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2003/003308	(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(22) 国際出願日	平成15年3月19日(2003.3.19)	(72) 発明者	横田 博 栃木県下部賀郡石橋町大字下石橋519番地 第一製薬株式会社 栃木研究センター内
(31) 優先権主張番号	特願2002-75551 (P2002-75551)	(72) 発明者	佐藤 一紀 栃木県下部賀郡石橋町大字下石橋519番地 第一製薬株式会社 栃木研究センター内
(32) 優先日	平成14年3月19日(2002.3.19)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, M W, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

(54) 【発明の名称】 ヒトシタキシン1 a結合ポリペプチド

(57) 【要約】

シタキシン1 aに結合する配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはシタキシン1 aと結合する該アミノ酸配列と少なくとも約90%以上の相同性をするポリペプチド、これらポリペプチドの部分ペプチド、並びにこれらをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖を提供し、さらに該ポリペプチドの生理学的作用の阻害剤・拮抗剤・賦活剤、これらを利用した医薬組成物を提供した。その他、遺伝子工学手法による該ポリペプチドまたはペプチドの製造法、該阻害剤・拮抗剤・賦活剤の同定方法、該ポリペプチドが関連する疾患の診断のための方法およびキットを提供した。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記の群より選ばれるヒトシntaxin 1 a (syntaxin 1 a) に結合する機能を有するポリペプチド；

(i) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(i i) 前記 (i) のポリペプチドを含有するポリペプチド、

(i i i) 前記 (i) のポリペプチドと少なくとも 90 % のアミノ酸配列上の同一性を有するポリペプチド、

および

(i v) 前記 (i) から (i i i) の何れかのポリペプチドにおいて 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入といった変異を有するポリペプチド。

10

【請求項 2】

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 5 個の連続するアミノ酸残基を含んでなるペプチド。

【請求項 3】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドであって、シナプス小胞とシナプス前膜との融合に関わる、ヒトシntaxin 1 a とシナプトソーム関連 25 k D a タンパク質 (25 k D a synaptosomal - associated protein) およびシナプトタグミン (synaptotagmin) との複合体形成を促進するポリペプチドまたはペプチド。

20

【請求項 4】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドを含む、ヒトシntaxin 1 a との結合機能による、シナプス小胞とシナプス前膜の融合を介するエキソサイトーシスの調整剤。

【請求項 5】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドをコードする塩基配列またはその相補的配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求の範囲第 5 項に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

30

【請求項 7】

請求の範囲第 5 項に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 8】

請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 9】

組換えベクターが組換え発現ベクターである請求の範囲第 8 項に記載の組換えベクター。

【請求項 10】

請求の範囲第 8 項または第 9 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

40

【請求項 11】

請求の範囲第 9 項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程を含む、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドの製造方法。

【請求項 12】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項 13】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと、該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害する請求の範囲

50

第 1 2 項に記載の抗体。

【請求項 1 4】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドとヒトシntaxin 1 a (s y n t a x i n 1 a) との結合を阻害する請求の範囲第 1 3 項に記載の抗体。

【請求項 1 5】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと、該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化する化合物、および/または請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチド、請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 8 項または第 9 項に記載のペクター、請求の範囲第 1 0 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 1 2 項から第 1 4 項の何れか 1 項に記載の抗体から選択される少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする同定方法。

【請求項 1 6】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質とが結合する条件下で、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドおよび該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質を被検物質と接触させ、次いで、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検物質が請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項 1 7】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドとヒトシntaxin 1 a (s y n t a x i n 1 a) との結合を阻害または安定化する化合物の同定方法であって、該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシntaxin 1 a (s y n t a x i n 1 a) との結合を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ペプチドおよびヒトシntaxin 1 a (s y n t a x i n 1 a) を被検物質と接触させ、次いで、該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシntaxin 1 a (s y n t a x i n 1 a) との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検物質が該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシntaxin 1 a (s y n t a x i n 1 a) との結合を阻害または安定化するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項 1 8】

請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、該ポリヌクレオチドと被検物質とを接触させ、次いで、該ポリヌクレオチドの発現により生じるシグナルの存在または不存在または変化を検出することにより、被検物質が該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項 1 9】

請求の範囲第 1 5 項から第 1 8 項の何れか 1 項に記載の方法で同定される化合物。

【請求項 2 0】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと相互作用して該ポリペプチドとヒトシntaxin 1 a (s y n t a x i n 1 a) との結合を阻害または安定化する化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物。

【請求項 2 2】

請求の範囲第 1 項のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチド、請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 8 項または第 9 項に記載のベクター、請求の範囲第 10 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 13 項または第 14 項に記載の抗体、および請求の範囲第 19 項から第 21 項の何れか 1 項に記載の化合物から選択される少なくとも何れか一つを有効量含んでなる医薬組成物。

【請求項 2 3】

請求の範囲第 2 2 項に記載の医薬組成物であって、神経伝達物質の放出を促進または阻害する作用を有する医薬組成物。

【請求項 2 4】

請求の範囲第 2 2 項に記載の医薬組成物であって、神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止剤および / または治療剤である医薬組成物。

【請求項 2 5】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドとヒトシンタキシン 1 a との結合を阻害するまたは安定化することを特徴とする神経伝達物質の放出の促進方法または阻害方法。

【請求項 2 6】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドとヒトシンタキシン 1 a との結合を阻害するまたは安定化することを特徴とする神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止方法および / または治療方法。

【請求項 2 7】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを定量的または定性的に測定する方法。

【請求項 2 8】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドの発現または機能の異常に基づく疾患の診断に使用するための測定方法であって、(A) 該ポリペプチドをコードしている核酸、および / または (B) 該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法。

【請求項 2 9】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドの量的異常に基づく神経伝達機能の異常に関する疾患の診断に使用するための測定方法であって、(A) 該ポリペプチドをコードしている核酸、および / または (B) 該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法。

【請求項 3 0】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチド、請求の範囲第 6 項から第 8 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチド、および請求の範囲第 13 項から第 15 項に記載の抗体から選ばれる少なくとも 1 つを含んでなる試薬キット。

【請求項 3 1】

請求の範囲第 15 項から第 18 項の何れか 1 項に記載の同定方法または請求の範囲第 27 項から第 29 項の何れか 1 項に記載の測定方法に使用するための請求の範囲第 30 項に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、小胞関連膜タンパク質 (Vesicle - associated membrane protein、以下、VAMP と訳すこともある。) 相同性領域を有し、シンタキシン 1 a と結合するポリペプチド、および該ポリペプチドの一部を有するペプチドに関する。また、シナプス小胞とシナプス前膜との融合に関わる、ヒトシンタキシン 1 a とシナプトソーム関連 25 kDa タンパク質 (25 kDa synaptosomal - associated protein、以下、SNAP - 25 と称することもある。) お

10

20

30

40

50

よびシナプトタグミン (synaptotagmin) とのコンプレックス形成を促進するポリペプチドまたはペプチドに関する。さらに、該ポリペプチドまたは該ペプチドを含む、ヒトシタキシン 1 a との結合機能による、シナプス小胞とシナプス前膜との融合を介するエキソサイトーシスの調整剤に関する。また、該ポリペプチドまたはペプチドをコードする塩基配列若しくはその相補的配列を含んでなるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを導入されてなる形質転換体に関する。さらに、該ポリペプチドまたはペプチドに対する抗体、該ポリペプチド若しくはペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、これらの 1 つ以上を含む医薬組成物、神経伝達物質の放出制御作用を有する該医薬組成物に関する。また、該ポリペプチドとヒトシタキシン 1 a との結合を制御することによる神経伝達物質の放出制御方法並びに神経伝達物質放出の異常に基づく疾患の防止方法および/または治療方法に関する。さらに、該ポリペプチド若しくはペプチドまたは該ポリヌクレオチドを測定することからなる診断のための測定手段、該形質転換体または該組換えベクターを使った該ポリペプチドまたはペプチドの製造方法、該ポリペプチドとヒトシタキシン 1 a との結合に作用する化合物または該ポリヌクレオチドの発現を調節する化合物の同定方法、該測定手段および該同定方法に使用する試薬キットに関する。

10

背景技術

シタキシン 1 は、主に脳中に存在し、神経伝達物質の放出機構に関与するタンパク質であり、シタキシン 1 a および 1 b のアイソフォームが知られている。神経伝達物質の放出 (exocytosis) 時に、シタキシン 1 はシナプトソーム関連 25 kDa タンパク質 (SNAP-25)、小胞関連膜タンパク質 (VAMP、synaptobrevin と称する。)、シナプトタグミン / p65 とコンプレックスを形成し、シナプス小胞とシナプス前膜とのドッキング (docking) および/または融合 (fusion) 過程に関与する。このコンプレックスにおいて、VAMP はシナプス小胞に局在して V-可溶性 N-エチルマレイミド・センシティブ・ファクター・アタッチメント受容体 (v-SNARE、vesicle-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) として機能し、シタキシン 1 と SNAP-25 は主にシナプス前膜に局在して t-SNARE (target-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) として機能する。SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) 形成は、シタキシン 1 と結合する MUNC-18 により阻害される。

20

30

シタキシンの中でも主要な分子として存在するシタキシン 1 a と m-トモシンとの結合は次のような点で重要な意味を持つ可能性を有する。神経伝達物質のエキソサイトーシスにおいてシナプス小胞のドッキングと膜融合に関わる多数のタンパク質の中でシタキシンは主たる役割を果たしている分子と考えられている t-SNARE である。シタキシン 1 がもう一つの t-SNARE である SNAP-25、そして VAMP、シナプトタグミンの 2 つの v-SNARE と共に 7 S (S:沈降係数) コンプレックスを構成し、最終的にこの中のシナプトタグミンが -SNAP (Soluble NSF-attachment protein)、NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) と置き換わって 20 S コンプレックスが構成されることが上記ドッキングと膜融合の開始において極めて重要であると考えられている。

40

フジタらはラット大脳 LP2 フラクションをグリセロールグラジェント分画したものについて、抗トモシン抗体を含む各 SNARE 構成タンパク質抗体を用いて各分画における構成タンパク質を解析した。そして、m-トモシンがシタキシン、SNAP-25、シナプトタグミンとともに 10 S コンプレックスを形成していることを明らかにし、さらに m-トモシンは、シタキシンと MUNC-18 からなるコンプレックスから MUNC-18 を解離させてシタキシンと結合することを示唆するデータを示した (非特許文献 1) 。また m-トモシンの PC12 細胞での高レベル発現はカルシウム依存的エキソサイトー

50

シスを約30%減少させた(非特許文献1)。MUNC-18とシナプトフィシン(syntaxin)は、シntaxin、VAMPとそれぞれ結合することでSNAREの形成を抑制的に制御していると考えられている。m-トモシンはMUNC-18にとって代わり、MUNC-18に比べ高親和性にシntaxin1aと結合することにより10Sコンプレックスを形成し、それが何らかのステップを経て7Sコンプレックス、さらに20Sコンプレックスへと順次変化し最終的にシナプス小胞とシナプス前膜が融合すると考えられている。

すなわち、シナプス小胞とシナプス前膜の融合において中心的役割を果たすと考えられているシntaxinとの結合親和性が高いタンパク質であるm-トモシンは、シナプス小胞のドッキングと融合において極めて重要な役割を果たしている可能性があると考えられている。

10

以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

特許文献1：組換えバキュロウイルス発現ベクターの製法「日本国特許第2129487号」。

特許文献2：ポリペプチドの合成方法「日本国特許第2644447号」。

非特許文献1：Fujita, Y. et al., Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process「Neuron」(1998)20, p.905-915。

非特許文献2：Yokoyama, S. et al., Three splicing variants of tomosyn and identification of their syntaxin-binding region「Biochemical and Biophysical Research Communications」(1999)256, p.218-222。

20

非特許文献3：Masuda, E. S. et al., Tomosyn binds to SNARE proteins via a VAMP-like coiled coil「Neuron」(1998)21, p.479-480。

非特許文献4：Lehman, K. et al., Yeast homologue of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9「Journal of Cell Biology」(1999)146, p.125-140。

30

非特許文献5：サムブルック等編[モレキュラークロニング, アラボラトリーマニュアル 第2版]コールドスプリングハーバーラボラトリー, 1989

非特許文献6：村松正實編[ラボラトリーマニュアル遺伝子工学]丸善株式会社, 1988。

非特許文献7：エールリッヒ, H. E. 編[PCRテクノロジー, DNA増幅の原理と応用]ストックトンプレス, 1989。

非特許文献8：Ulmer, K. M., 「Science」(1983)219, p.666-671。

非特許文献9：「Nature」(1957)179, p.160~161。

40

非特許文献10：Hata, Y. et al., Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin(1993)「Nature」(1993)366, p.347-351。

非特許文献11：Hata, Y. et al., A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins「Journal of Biological Chemistry」(1995)270, p.13022-13028。

非特許文献12：Kee, Y. et al., Distinct domains of syntaxin are required for synaptic vesic

50

le complex formation and dissociation「Neuron」(1995)14, p.991-998。

非特許文献13: Kee, Y. et al., Localization of synaptotagmin-binding domain on syntaxin「Journal of Neuroscience」(1996)16, p.1975-1981。

発明の開示

かかる現状において本発明は、ヒトシタキシン1aに結合するポリペプチドまたはペプチドを見出し、提供することを目的とした。また、ヒトシタキシン1aに結合するポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供し、遺伝子工学手法による、ヒトシタキシン1aに結合するポリペプチドまたはペプチドの製造法を提供することを目的とした。さらに本発明は、ヒトシタキシン1aに結合するポリペプチドまたはペプチドに対する抗体、ヒトシタキシン1aに結合するポリペプチドまたはペプチドとヒトシタキシン1aとの結合阻害剤・結合安定化剤を提供することを目的とした。さらにまた本発明は、上記のものを利用してヒトシタキシン1aに結合するポリペプチドまたはペプチドに対する抗体、ヒトシタキシン1aとヒトシタキシン1aと結合するポリペプチドまたはペプチドとの結合阻害剤・結合安定化剤の同定を行うこと、またこれらを利用した医薬組成物、並びに診断のための測定方法および試薬キットを提供することを目的とした。

そして上記目的を達成すべく本発明者らは鋭意努力し、かずさDNA研究所のヒト長鎖cDNA解析情報データベース(<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage>)にて公開されているKIAA1006クローン(GenBankアクセッション番号: AB023223)の一部がラットm-トモシンのVAMP相同性領域と高い相同性を有していることを見出した。より具体的には、かずさDNA研究所のヒト長鎖cDNA解析情報データベースに対して、ラットm-トモシンにおいてシタキシン1aとの結合に重要であることが指摘されているVAMP相同性領域についての相同性検索を行い、KIAA1006を選出した。そして、KIAA1006遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)全長を決定し、該遺伝子を昆虫細胞を用いた遺伝子発現系で発現させて該遺伝子がコードする遺伝子産物であるポリペプチドを得た。さらに、得られたポリペプチドがヒトシタキシン1aと結合することを実証した。また、該ポリペプチドの機能または生理学的作用を調節することによる該ポリペプチドに起因する疾患のための医薬用組成物および該疾患の診断のための測定手段を提供することによって本発明を完成した。

すなわち、本発明の一態様は、下記(i)から(iv)の群より選ばれるヒトシタキシン1aに結合するポリペプチドに関する；

- (i) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (ii) 前記(i)のポリペプチドを含有するポリペプチド、
- (iii) 前記(i)のポリペプチドと少なくとも90%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、

および

- (iv) 前記(i)から(iii)の何れかのポリペプチドにおいて1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入といった変異を有するポリペプチド。

また本発明の一態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を有するペプチドに関する。

さらに本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたはペプチドであって、シナプス小胞とシナプス前膜との融合に関わる、ヒトシタキシン1aとシナプトソーム関連25kDaタンパク質およびシナプトタグミンとのコンプレックス形成を促進するポリペプチドまたはペプチドに関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドを含む、ヒトシタキシン1aとの結合機能による、シナプス小胞とシナプス前膜との融合を介するエキソサ

10

20

30

40

50

イトーシスの調整剤に関する。

また本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドをコードする塩基配列またはその相補的配列を含んでなるポリヌクレオチドに関する。

さらに本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドに関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを有するポリヌクレオチドに関する。

また本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチドを含有する組換えベクターに関する。

さらに本発明の一態様は、組換えベクターが組換え発現ベクターである前記組換えベクターに関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記組換えベクターを導入されてなる形質転換体に関する。

また本発明の一態様は、前記組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程を含む、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドの製造方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドを免疫学的に認識する抗体に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドと、これらポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害する前記抗体に関する。

また本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドとヒトシンタキシン1aとの結合を阻害する前記抗体に関する。

さらに本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドと、これらポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化する化合物、および/または前記何れかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、前記ポリペプチドまたは前記ペプチド、前記ポリヌクレオチド、前記ベクター、前記形質転換体および前記抗体より選ばれる少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする同定方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドと、これらポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化する化合物の同定方法であって、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドと、これらポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質が結合する条件下で該ポリペプチドまたは該ペプチド、これらポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質、および被検物質とを接触させ、次いで、該ポリペプチドまたはペプチドと、該ポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検物質が該ポリペプチドまたは該ペプチドと、これらポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

また本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチドとヒトシンタキシン1aとの結合を阻害または安定化する化合物の同定方法であって、該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシンタキシン1aとの結合を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ペプチド、ヒトシンタキシン1a、および被検物質とを接触させ、次いで、該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシンタキシン1aとの結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検物質が該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシンタキシン1aとの結合を阻害または安定化するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記何れかのポリヌクレオチドの発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、該ポリヌクレオチドと被検物質とを接触させ、次いで、該ポリヌクレオチドの発現により生じるシグナルの存在または不存在または変化を検出することにより、被検物質が該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記何れかの同定方法で同定される化合物に関する。

10

20

30

40

50

また本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたはペプチドと相互作用して該ポリペプチドとヒトシタキシン 1 a との結合を阻害または安定化する化合物に関する。

さらに本発明の一態様は、前記何れかのポリヌクレオチドと相互作用して該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進する化合物に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチド、前記ポリヌクレオチド、前記ベクター、前記形質転換体、前記抗体および前記化合物より選択される少なくとも何れか一つを含有することを特徴とする医薬組成物に関する。

また本発明の一態様は、前記医薬組成物であって、神経伝達物質の放出を促進または阻害する作用を有する医薬組成物に関する。

さらに本発明の一態様は、前記医薬組成物であって、神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止剤および/または治療剤である医薬組成物に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記ポリペプチドとヒトシタキシン 1 a との結合を阻害するまたは安定化することを特徴とする神経伝達物質の放出の促進方法または阻害方法に関する。

また本発明の一態様は、前記ポリペプチドとヒトシタキシン 1 a との結合を阻害するまたは安定化することを特徴とする神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止方法および/または阻害方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記ポリペプチドの発現または機能の異常に基づく疾患の診断に使用するための測定方法であって、(A) 前記ポリペプチドをコードしている核酸、および/または (B) 該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記ポリペプチドの量的異常に基づく神経伝達機能の異常に関わる疾患の診断に使用するための測定方法であって、(A) 前記ポリペプチドをコードしている核酸、および/または (B) 該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法に関する。

また本発明の一態様は、前記ポリペプチドまたは前記ペプチド、前記ポリヌクレオチドおよび前記抗体から選ばれる少なくとも何れか一つを含んでなる試薬キットに関する。

さらに本発明の一態様は、前記同定方法または前記測定方法に使用するための試薬キットに関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、参照によりここに援用される場所の、日本国特許出願番号第 2 0 0 2 - 7 5 5 5 1 号からの優先権を請求するものである。

本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されていない限り、当業者により普通に理解される意味を持つ。本明細書中では当業者に既知の種々の方法が参照されている。そのような引用されている公知の方法を開示する刊行物等の資料は、引用により、本明細書中にそれらの全体が完全に記載されているものと見なす。

以下、本発明について、発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。以下の詳細な説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

(ポリペプチドまたはペプチド)

本発明において提供するポリペプチドは、ラット m - トモシンにおいてシタキシン 1 a との結合に関わることが指摘されている VAMP 相同性領域 (非特許文献 2 および非特許文献 3) についての相同性検索を行い、公開されているはずさ DNA 研究所のヒト脳由来長鎖 cDNA ライブラリーから選出した遺伝子、K I A A 1 0 0 6 がコードするものである。該ポリペプチドは、K I A A 1 0 0 6 の ORF 部分をバキュロウイルスと昆虫細胞 sf 9 とを用いた遺伝子発現系で発現させて可溶性タンパク質として得た。K I A A 1 0 0 6 遺伝子の ORF 全長は 3 5 5 8 塩基対、該遺伝子の遺伝子産物は 1 1 8 6 アミノ酸残基からなり、ラット m - トモシンとの相同性は、ヌクレオチドレベルで 5 7 . 6 %、アミノ酸レベルで 6 7 . 9 % であった。本発明においては、該ポリペプチドがヒトシタキシン 1 a に結合することを明らかにした。以下、K I A A 1 0 0 6 の ORF 部分を K I A A 1 0 0 6 ポリペプチドと称することもある。

K I A A 1 0 0 6 ポリペプチドは、上述の通り、ラット m - トモシンと高い相同性を示していることから、ヒトにおいて m - トモシンと同様に機能しているものと考えられる。

神経伝達物質のエキソサイトーシスにおいては、1) シンタキシンに結合した M U N C - 1 8 がトモシンに置き換わるステップ、2) 1 0 S コンプレックスの形成、3) 7 S コンプレックスの形成、4) 2 0 S コンプレックスの形成、を順次経て、シナプス小胞とシナプス前膜が融合する(図 1 参照)(非特許文献 2 および非特許文献 3)。コンプレックス形成の促進とは、1 0 S コンプレックス形成の促進であっても 7 S コンプレックス形成の促進であってもよく、ひいては 2 0 S コンプレックス形成促進も意味する。これらコンプレックスの形成過程でシンタキシンと結合するタンパク質の中で、m - トモシンはシンタキシンに対する親和性が最も高いタンパク質であり、したがって、神経伝達物質のエキソ

10

サイトーシスにおいて中心的な役割を担っている。本発明に係るポリペプチドおよびペプチドも、m - トモシンと同様、これらのコンプレックス形成を促進する作用を有すると考えられる。

m - トモシン高発現 P C 1 2 細胞においてカルシウム依存的エキソサイトーシスが 3 0 % 抑制される(非特許文献 1)。また、m - トモシンの酵母ホモログ欠損株においては、エキソサイトーシスが抑制され、増殖抑制がかかる(非特許文献 4)。これらの事実から、m - トモシンが、本ステップにおいて調整的役割を演じていることがわかる。すなわち、過剰発現したトモシンは 1 0 S コンプレックス形成に抑制的な効果を生じる。また、逆にトモシンが存在しない場合は、本ステップは進行せず、結果として、過剰発現した場合と同様にエキソサイトーシスの抑制がかかることになる。本発明に係るポリペプチドおよび

20

ペプチドも、シンタキシンと結合することにより、m - トモシンと同様に本ステップを調整する機能を有していると考えられる。

K I A A 1 0 0 6 は、脳において特異的に発現していることが、上記データベース上にて公開・報告されている。したがって K I A A 1 0 0 6 ポリペプチドは、ラット m - トモシンと同様、ヒトにおいてシンタキシンを介したシナプス小胞のドッキングと融合を調節する重要な因子であると考えられる。

本発明に係るポリペプチドは、K I A A 1 0 0 6 c D N A の塩基配列情報(G e n B a n k アクセッション番号: A B 0 2 3 2 2 3)に基づいて公知の遺伝子工学的手法により得ることが可能である。例えば、上述あるいは後述の実施例に記載したように、かずさ D N A 研究所より購入した K I A A 1 0 0 6 を含むプラスミド h k 1 0 0 8 4 をテンプレートとして用い、K I A A 1 0 0 6 遺伝子 O R F 部分をコードする遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応法(P C R)により増幅し、これを組み込んだバキュロウイルスを昆虫細胞 S f 9 に感染させ発現誘導することにより得ることができる。また、上記 K I A A 1 0 0 6 c D N A の塩基配列情報に基づき公知の方法で設計した適切なプライマーを用い、例えばヒト脳由来 c D N A ライブラリーをテンプレートとして用いて目的の遺伝子を増幅し、得られた遺伝子を公知の遺伝子工学的手法を用いて発現することにより、本発明に係るポリペプチドを取得することも可能である。

30

ここで、ポリペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している 2 個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドのうち、タンパク質等の長鎖ペプチドを意味し、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチドを単に

40

ペプチドという。

本発明に係るポリペプチドは、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなりヒトシンタキシン 1 a (s y n t a x i n 1 a) に結合する機能を有するポリペプチドである。

また、本発明に係るポリペプチドは、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有しヒトシンタキシン 1 a (s y n t a x i n 1 a) に結合するポリペプチドであってもよい。

また、本発明に係るポリペプチドは、配列表の配列番号 1 に記載のポリペプチドと、アミノ酸配列上で 9 0 % 以上の相同性を有し、かつヒトシンタキシン 1 a (s y n t a x i n 1 a) に結合するものであってもよい。アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体

50

公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法またはcDNAの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が有用である。ヒトシタキシン1a (syntaxin 1a)との結合の有無は、後述する実施例に記載した方法により判定することができる。

さらに、このように特定されたポリペプチドを基にして、ヒトシタキシン1aとの結合の有無を指標にすることにより、1個以上、例えば1~100個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に好ましくは1個ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加または挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供できる。かかる変異を有するポリペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。変異を導入する手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)等を単独でまたは適宜組み合わせる用いることができる。例えば成書に記載の方法(非特許文献5、非特許文献6および非特許文献7)に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、ウルマーの技術(非特許文献8)を利用することもできる。

上記のような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質(物性、機能、生理活性または免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えば

アミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。本発明に係るペプチドは、配列表の配列番号1に記載のポリペプチドの部分配列を含んでなるペプチドを包含する。該ペプチドは、その最小単位として好ましくは5個以上のアミノ酸、より好ましくは8個以上のアミノ酸、さらに好ましくは12個以上、とくに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸からなるものである。これらのペプチドは、自体公知のペプチドの製造方法を用いて、アミノ酸配列情報に従って製造することができる。例えば、ペプチドの化学合成方法としては固相合成方法、液相合成方法等が知られているが何れを用いることもできる。または、遺伝子工学的手法を用いて、上述のポリペプチドと同様の方法で取得することも可能である。あるいは、本発明に係るポリペプチドを、適当なペプチダーゼにより切断することによっても得ることができる。

これらの手法により得られたペプチドは、試薬または標準物質等として利用できる。これらのペプチドのうち、シタキシン1aに結合するものは、本発明に係るポリペプチドとシタキシン1aとの結合を阻害する物質として、または本発明に係るポリペプチドの活性を調節する物質のスクリーニング等において有用である。また、免疫学的に認識され得るペプチド、例えばエピトープペプチドは後述するように本発明に係るポリペプチドに特異的な抗体を作製するための抗原として単独でまたはキャリア(例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白アルブミン)と結合して使用できる。

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、さらに好ましくは、シナプス小胞とシナプス前膜との融合に関わるタンパク質のコンプレックス形成、例えば、シタキシン1aとSNAP-25およびシナプトタグミンとのコンプレックス形成を促進する機能を有するものであることが望ましい。かかる機能を有するポリペプチドまたはペプチドは、ヒトシタキシン1aとの結合機能による、シナプス小胞とシナプス前膜との融合を介するエキソサイトーシスの調整を可能にする。すなわち、該ポリペプチドまたはペプチドを含むエキソサイトーシスの調整剤も本発明の範囲に含まれる。

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの機能、例えばシタキシン1aとの結合が阻害されない限りにおいて、N末端側やC末端側に別のタンパク質やペプチド等を直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的手法等を用いて付加することにより標識化したもので

10

20

30

40

50

あってもよい。好ましくは、該ポリペプチドまたは該ペプチドの基本的な性質が阻害されないような標識化が望ましい。付加するタンパク質やペプチド等としては、例えばグルタチオン S - トランスフェラーゼ、 α - ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼ (HRP) またはアルカリホスファターゼ等の酵素類、His - tag、Myc - tag、HA - tag、FLAG - tag または Xpress - tag 等のタグペプチド類、グリーン蛍光タンパク質、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) またはフィコエリスリン (phycoerythrin) 等の蛍光物質類、マルトース結合タンパク質、免疫グロブリンのFc断片、ビオチン、あるいは放射性同位元素等が挙げられるが、これらに限定されない。これら標識化に用いたタンパク質またはペプチド等の物質自体、またはその機能を測定することにより、例えば本発明に係るポリペプチドとシンタキシン1aの結合を検出することが可能であり、また本発明に係るポリペプチドの検出または精製が容易になる。

10

(ポリヌクレオチド)

一つの態様において本発明は、上記ポリペプチドまたはペプチドをコードする塩基配列またはその相補的配列を含んでなるポリヌクレオチドを提供する。例えば、該ポリヌクレオチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列またはその相補的配列を含んでなるポリヌクレオチドであり得る。ここで、あるポリヌクレオチドの相補的配列からなるポリヌクレオチドを相補鎖と称することもある。これらは例えば上記ポリペプチドまたはペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬または標準品としても利用できる。

20

別の態様において本発明は、上記ポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列またはその相補的配列を含んでなるポリペプチドの対応する領域にストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば成書に記載の方法 (非特許文献5) 等に従うことができる。これらポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションするものであれば目的のポリヌクレオチドの相補的配列でなくてもよい。例えば、KIAA1006ポリペプチドをコードするKIAA1006遺伝子の塩基配列またはその相補的配列に対する相同性において好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を示すポリヌクレオチドであり得る。

30

また本発明に係るポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチドの指定された塩基配列の領域の連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上のヌクレオチドからなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを包含する。

本発明に係るポリヌクレオチドはその機能、例えばコードするポリペプチドの発現や、発現されたポリペプチドの機能が阻害されない限りにおいて、5'末端側や3'末端側に、例えば、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、 α - ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼ (HRP) またはアルカリホスファターゼ等の酵素類、His - tag、Myc - tag、HA - tag、FLAG - tag または Xpress - tag 等のタグペプチド類、またはグリーン蛍光タンパク質等の遺伝子が付加されたものであってもよい。

40

これらポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチドまたはペプチド等の製造に有用である。さらに、本発明に係るポリペプチドをコードする遺伝子またはmRNAの検出のためのプローブまたはプライマーとして、または該遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として有用である。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって本発明に係るポリペプチド遺伝子の発現を特異的に阻害するためには、本発明に係るポリペプチド遺伝子に固有な領域の塩基配列を用いることが好ましい。

またここで、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドの選択は、例えば公知のタンパク質発現系を利用して発現タンパク質の確認を行い、その機

50

能、特にヒトシタキシン 1 a との結合を指標にして行うことができる。タンパク質発現系としては、無細胞タンパク質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、家兔網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる（非特許文献 9）。

（組換えベクター）

上記ポリヌクレオチドを適当なベクター DNA に組み込むことにより、組換えベクターを得ることができる。用いるベクター DNA は、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクター DNA は、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外の DNA の部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。また、目的により発現ベクターやクロニングベクター等を用いることができる。

10

組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製する。ベクター DNA にポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、適当な制限酵素を選択、処理して DNA を特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いる DNA と混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクロニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。

20

後述する実施例では、かずさ DNA 研究所より購入した KIAA1006 を含むプラスミド hk10084 をテンプレートとして、KIAA1006 の ORF 全長あるいは C 末端欠失部分を PCR にて増幅し、これを pFastBacI へ組み込んだバキュロウイルス発現プラスミド pFB-1006（全長）と pFB-1006（C 末端欠失）を得た。これら 2 クロンをそれぞれ DH10BAC にトランスポジションすることでバックミド Bac-1006 と Bac-1006T を得た。本実施例はバキュロウイルスベクターを用いているが、無論これに限定されるものではない。

30

（形質転換体）

上記ポリヌクレオチドが組み込まれたベクター DNA を、自体公知の宿主に自体公知の方法で導入することにより形質転換体を得られる。宿主に導入するベクター DNA は、1 種のベクター DNA であってもよく、2 種以上のベクター DNA を導入してもよい。宿主としては、例えば大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞または動物細胞等が例示できる。ベクター DNA の宿主細胞への導入は、自体公知の手段が応用され、例えば成書に記載されている標準的な方法（非特許文献 5）により実施できる。より好ましい方法としては、遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプ負荷（scrape loading）、バリスティック導入（ballistic introduction）および感染等が挙げられる。後述する実施例においては、昆虫細胞を利用したが、無論これに限定されるものではない（特許文献 1 および特許文献 2）。

40

宿主に導入するベクター DNA として発現ベクターを使用すれば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを提供可能である。上記ポリヌクレオチドが組み込まれた発現ベクター DNA を導入した形質転換体は、各々の宿主に最適な自体公知の培養条件および培養方

50

法で培養する。培養は、形質転換体により発現される該ポリペプチドまたはペプチドの機能、例えばヒトシンタキシン 1 a との結合を指標にして実施できる。あるいは、宿主中または宿主外に産生された該ポリペプチドまたはペプチド量を指標にして培養してもよく、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはパッチ培養を行ってもよい。

(ポリペプチドまたはペプチドの回収)

形質転換体を培養した培地または形質転換体からの本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの回収および/または精製は、該ポリペプチドまたはペプチドの機能、例えばヒトシンタキシン 1 a への結合の有無を指標にして実施できる。回収および/または精製の方法としては、硫酸やアルコール等を用いた溶解度差に基づく分画手段、ゲルろ過、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等が挙げられ、これらを単独

10

でまたは組み合わせて使用する。好ましくは、回収および/または精製しようとするポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列の情報に基づき、これらに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作成し、該抗体を用いて特異的に吸着回収する方法を使用する。

(抗体)

抗体は、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを抗原として用いて作製する。抗原は該ポリペプチドまたはペプチド、またはその断片でもよく、少なくとも 8 個、好ましくは少なくとも 10 個、より好ましくは少なくとも 12 個、さらに好ましくは 15 個以上のアミノ酸で構成される。該ポリペプチドおよび/またはペプチドに特異的な抗体を作成するためには、該ポリペプチドまたはペプチドに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも該ポリペプチドまたはペプチドのものと同様または同一である必要はなく、その立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は免疫学的に該ポリペプチドおよび/またはペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定できる。

20

抗体の産生には、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、抗原をアジュバントの存在下または非存在下で、単独でまたは担体に結合して動物に投与し、体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより抗体が得られる。担体はそれ自体が宿主に対して有害作用を示さずかつ抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニン等が例示できる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA)、Ribi (MPL)、Ribi (TDM)、Ribi (MPL + TDM)、百日咳ワクチン (*Bordetella pertussis* vaccine)、ムラミルジペプチド (MDP)、アルミニウムアジュバント (ALUM)、およびこれらの組み合わせを例示できる。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

30

ポリクローナル抗体は、免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得できる。好ましい抗体回収手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法が挙げられる。

40

モノクローナル抗体は、免疫手段が施された動物から抗体産生細胞 (例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球) を回収し、自体公知の永久増殖性細胞 (例えば、P3-X63-Ag8 株等のミエローマ株) への形質転換手段を導入することにより生産できる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化し、本発明に係るポリペプチドおよび/またはペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

かくして得られた、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを認識し結合し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、該ポリペプチドまたはペプチドの精製用抗体、試薬または標識マーカー等として利用できる。特に本発明に係るポリペプチドの機能を

50

阻害する抗体は、該ポリペプチドの機能制御に使用でき、該ポリペプチドの異常に起因する各種疾患の解明、防止、改善および/または治療のために有用である。例えば該ポリペプチドとシタキシン 1 a の結合を阻害する抗体は、例えば神経伝達物質の放出制御に使用でき、そのため神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の解明、防止、改善および/または治療に有用である。

(化合物の同定・スクリーニング)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを組み込んだベクター、該ベクターが導入されてなる形質転換体、これらを用いるタンパク質合成系、または該ポリペプチドおよび/またはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドと該ポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合阻害剤または結合安定化剤、あるいは該ポリヌクレオチドの発現阻害剤または発現促進剤の同定・スクリーニングに有効な手段を提供する。該方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。例えば該ポリペプチドまたはペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、タンパク質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現の阻害剤または促進剤の選別、または抗体を利用した抗体認識物質の選別等が可能である。

10

詳しくは、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドと該ポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合をシグナル(マーカー)として検出することのできる系を導入し、被検物質が存在するまたは存在しない条件においてそのシグナル(マーカー)の存在、不存在、またはその変化を検出することにより、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドと該ポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化する化合物を同定可能である。

20

一例として、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとヒトシタキシン 1 a との結合を指標にして、その結合に影響を与え得る化合物を選別すればよい。本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとヒトシタキシン 1 a との結合は公知の免疫学的手法等を用いた結合試験系により検出することが可能である。

例えば、後述する実施例で用いた方法を用いることができる。すなわち、遺伝子工学的手法を用いて取得した GST 融合シタキシン 1 a をグルタチオンセファロースに結合させ、これに結合する本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの量を、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドに対する抗体、例えば HRP (ホースラディッシュ・パーオキシダーゼ)、アルカリホスファターゼ、放射性同位元素、蛍光物質またはビオチン等で標識した抗体を用いて定量することができる。または、タグペプチドを融合した本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを用いれば、抗タグ抗体を用いて定量することもできる。勿論、本発明に係るポリペプチドを上記酵素、放射性同位元素、蛍光物質、ビオチン等で直接標識してもよい。あるいは、上記酵素、放射性同位元素、蛍光物質、ビオチン等で標識した二次抗体を用いてもよい。

30

被検物質を共存させた場合の本発明に係るポリペプチドまたはペプチドのシタキシン 1 a への結合量を、被検物質を共存させなかった場合の本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの結合量と比較することにより、該被検物質が本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとシタキシン 1 a との結合に及ぼす効果を判定することができる。被検物質を共存させた場合の本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの結合量が、被検物質を共存させなかった場合の本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの結合量と比較して減少した場合、該被検物質には本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとシタキシン 1 a との結合を阻害する作用があると判定できる。一方、被検物質を共存させた場合の本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの結合量が、被検物質を共存させなかった場合の本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの結合量と比較して増加した場合、該被検物質には本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとシタキシン 1 a との結合を安定化する作用があると判定できる。

40

あるいは公知のツーハイブリッド(two-hybrid)法を用いることも可能である。例えば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドと DNA 結合タンパク質を融合タン

50

パク質として発現するプラスミド、シタキシン1aと転写活性化タンパク質を融合タンパクとして発現するプラスミド、および適切なプロモーター遺伝子に接続したlacZ等レポーター遺伝子を含むプラスミドを酵母、真核細胞等に導入し、被検物質を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量を被検物質非存在下でのレポーター遺伝子の発現量とを比較することにより達成できる。被検物質を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量が被検物質非存在下でのレポーター遺伝子の発現量と比較して減少した場合には、該被検物質には本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとシタキシン1aとの結合を阻害する作用があると判定できる。一方、被検物質を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量が被検物質非存在下でのレポーター遺伝子の発現量と比較して増加した場合には、該被検物質には本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとシタキシン1aとの結合を安定化する作用があると判定できる。

10

あるいは、ピアコアシステム(BIACORE system)等の表面プラズモン共鳴センサーを用いて、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとシタキシン1aとの結合に影響を与え得る化合物を同定することも可能である。

あるいは、シンチレーションプロキシミティアッセイ法(Scintillation proximity assay, SPA)や蛍光共鳴エネルギー転移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)を応用した方法を用いて、本発明に係るポリペプチドあるいはペプチドとシタキシン1aとの結合に影響を与えうる化合物を同定することも可能である。

これらのスクリーニング系で用いるシタキシン1aは、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドとの結合に影響がない限りにおいて、一部を欠損、あるいは別のタンパク質が付加されたものであってもよい。

20

また、本発明に係るポリヌクレオチドの発現を可能にする条件を選別し、該条件下で該ポリヌクレオチドと被検物質とを接触させ、該発現の有無を検出することのできるシグナルを使用する系を導入し、このシグナルの、存在、不存在またはその変化を検出することにより、本発明に係るポリヌクレオチドの発現を促進または阻害する化合物を同定可能である。シグナルとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類、またはグリーン蛍光タンパク質等を用いることができる。

あるいは、例えば本発明に係るペプチドをコードする遺伝子のプロモーター領域の下流に、該遺伝子の代わりにレポーター遺伝子を連結したベクターを作成し、該ベクターを導入した細胞、例えば真核細胞等と被検物質とを接触させ、レポーター遺伝子の発現の有無および変化により、本発明に係る遺伝子の発現に影響を与える化合物を同定可能である。レポーター遺伝子としては、レポーターアッセイで慣用されている遺伝子を使用可能であるが、例えばルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼなどの酵素活性を有する遺伝子を用いることができる。レポーター遺伝子の発現の検出は、該遺伝子の遺伝子産物の活性、例えば、上記に例示した遺伝子の場合には酵素活性を検出することにより実施可能である。

30

(化合物)

このようにして同定された化合物は、本発明に係るポリペプチドに関する結合阻害剤、結合拮抗剤または結合安定化剤の候補化合物として利用可能である。また、遺伝子レベルでの上記ポリペプチドに対する発現阻害剤または発現促進剤の候補化合物としても利用可能である。これら候補化合物は、本発明に係るポリペプチドの発現や活性の増加、減少または欠失等に起因する各種病的症状の防止および/または治療効果を期待できる。例えば該候補化合物は、神経伝達物質の放出調節に使用できるため、神経伝達物質の放出異常、ひいては神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止および/または治療効果を期待できる。

40

(医薬組成物)

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。また本発明に係るポリペプチドまたは

50

ペプチド、本発明に係るポリヌクレオチド、本発明に係るポリヌクレオチドを含有するベクター、本発明に係るプラスミド、並びに上記ポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体が、診断マーカーや試薬等の疾患診断手段として、あるいは本発明に係るポリペプチドの活性および/または発現を阻害、拮抗、または促進する機能を利用した治療薬等（阻害剤、拮抗剤、促進剤等）の医薬手段として使用することができる。すなわち本発明は、これらを単独でまたは複数組み合わせる利用することによって、これらのうち少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供する。

本発明に係る本発明に係るポリペプチドの発現およびその活性が過剰な場合、有効量の上記阻害剤を医薬上許容される担体とともに対象に投与して、該ポリペプチドの活性を阻害し、そのことにより異常な症状を改善することができる。さらに、発現ブロック法を用いて内在性の該ポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。細胞内で生成させた、あるいは別個に投与された該遺伝子のアンチセンス配列を使用して該遺伝子の発現を阻害できる。これらのオリゴヌクレオチドは、本発明に係るポリヌクレオチドを基にして設計し合成できる。該オリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは関連オリゴマーをインビボで発現させることもできる。

また、本発明に係るポリペプチドの発現およびその活性の減少や欠失等に関連する異常な症状の治療には、1つの方法として該ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする遺伝子を活性化する治療上有効量の促進剤を医薬上許容される担体とともに投与し、そのことにより異常な症状を改善することを特徴とする方法が挙げられる。あるいは、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞内で該ポリペプチドを生成せしめてもよい。本発明に係るポリヌクレオチドを利用した遺伝子治療は、公知の方法が利用できる。例えば、本発明に係るポリヌクレオチドを組み入れた複製欠損レトロウイルスベクターを作製して遺伝子治療に利用すればよい。また、遺伝子治療において、治療に使用するタンパク質を対象中において生成させることもできる。例えば、該タンパク質をコードしているDNAまたはRNAを用いて、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いることによりエクスピボ（*ex vivo*）において対象由来の細胞を処理し、次いで、細胞を対象に導入することもできる。

本発明に係るポリペプチドには、シタキシン1aとの結合があり、特に神経伝達物質の放出異常や量的異常に基づく疾患に関連すると考えられる。従って、上記阻害剤または拮抗剤は、該疾患を防止および/または治療するために有用である。また、本発明に係るポリペプチドとシタキシン1aとの結合を阻害するまたは安定化することを特徴とする神経伝達物質の放出の促進方法または阻害方法、並びに神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止方法および/または治療方法も本発明の範囲に包含される。

本発明に係る医薬組成物の処方は、適当な医薬担体と組み合わせる処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、形質転換体、抗体および化合物から選択された少なくとも何れか1つに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られている。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方うまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与または経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲル等の形態での投与であってもよい。

必要な用量範囲は、治療上有効量の本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、形質転換体、抗体および化合物から選択された少なくとも何れか1つの有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。

10

20

30

40

50

具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1μg乃至100μgの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

製剤化にあたっては、例えばポリペプチド、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、化合物等各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリン等の包接体等の製剤化方法が利用できる。

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュークロース、マンニトール等の賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

懸濁剤は、水、シュークロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、PEG等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルム等）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油等の植物油、MCT等）、乳化剤（リン脂質等）等を混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖等）が例示される。

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

（診断のための測定方法および試薬）

本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチド、または当該ポリペプチド若しくはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用できる。これらは試薬であるとき、緩衝液、塩、安定化剤、および/または防腐剤等の物質を含んでいてもよい。また本発明は、これらのうちの1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットを提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチドまたはペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

これら試薬および試薬キットは、本発明に係る同定方法に使用できる。また、当該試薬および試薬キットは、本発明に係るポリペプチド、ペプチドまたはこれらの何れか1つをコードするポリヌクレオチドの定量的および/または定性的な測定に使用できる。当該測定のための方法は、当業者に周知の方法を利用して構築できる。ポリペプチドまたはペプチドの測定に利用できる方法としては、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等を例示できる。また、ポリヌクレオチドは、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブロットティングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて核酸レベル、例えばRNAレベルで検出および定量が可能である。

さらに、本発明に係るポリペプチド若しくはペプチドまたはこれらの何れか1つをコードする核酸を診断マーカーとして定性的にまたは定量的に測定することにより、該ポリペプ

10

20

30

40

50

チドの発現または活性に起因する疾患の検査または診断が可能である。当該検査または診断のための方法は、例えば当該ポリペプチドまたは当該ペプチドをコードするポリヌクレオチドとの相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在を検出すること、その存在量を決定すること、および/またはその変異を同定すること、並びに当該ポリペプチドまたはペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、当該ポリペプチドまたはペプチドの存在を検出すること、その存在量を決定すること、および/またはその変異を検出することによって実施できる。

試料は、個体由来の、例えば細胞、血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等が挙げられる。また、核酸は上記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを、標識した本発明に係るポリペプチドをコードするDNAにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定できる。上記測定により本発明に係るポリペプチドおよびそれをコードする核酸の変異、減少または増加を検出することにより、当該本発明に係るポリペプチドに起因する疾患、例えば、神経伝達物質の放出異常や量的異常に基づく疾患等の診断が可能になる。

実施例

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

(遺伝子の単離)

かずさDNA研究所のヒト脳由来長鎖cDNAライブラリーデータベースを用いて、ラットm-トモシンのVAMP相同性領域と相同性を有するクローンを検索した。その結果、KIAA1006がラットm-トモシンとヌクレオチドレベルで約57.6%、アミノ酸レベルで約67.9%の相同性を有することを見出した。

かずさDNA研究所のデータベースでは、KIAA1006はN末端を欠失した部分配列である可能性が指摘されていた。そこで、まず、KIAA1006遺伝子の上流に翻訳開始点があるか否かを確認する目的で、human polyA(+)RNA (CLONTECH社)と1006 raceプライマー(配列表の配列番号: 2)、およびSMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社)を用いて、5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)を実施した。

1006 race: GCCAGGGGAGGAGGCAGTTAAGCCATC

(配列表の配列番号: 2)

その結果、新たな上流配列は見出されなかった。また、KIAA1006の塩基配列から予測されるアミノ酸配列において、最初のメチオニン以降のアミノ酸配列と、ラットm-トモシンのN末端配列との間にはアミノ酸1-15において非常に高い相同性が認められることを考え合わせて、KIAA1006の最初のメチオニンがKIAA1006を含む遺伝子の翻訳開始点であると判断し、以後の解析を進めた。

(KIAA1006 ORF全長およびKIAA1006 ORF C末端欠失欠失体発現プラスミドの構築)

KIAA1006を含むプラスミドhk10084(かずさDNA研究所より購入した。pBluescript II SK(+))ベクターのSalI-NotIサイトにKIAA1006を挿入したプラスミド。詳しくは、KIAA1006 cDNAの5'末端にSalIアダプターをライゲーションして、pBluescript II SK(+))ベクターのSalIサイトへ挿入し、KIAA1006 cDNAの3'末端はNotIサイトへ挿入したプラスミド。)をテンプレートとして、1006(s)(配列表の配列番号: 3、Hisx6タグ配列を含む。)と1006(a)1(配列表の配列番号: 4、全長用)、または1006(s)(配列表の配列番号: 3)と1006(a)2(配列表の

配列番号：5) (C末端欠失体用)の組み合わせで、Advantage-HF2 PCR Kit (CLONTECH社)を用いてKIAA1006のORF部分を増幅した。得られた2つのPCR産物をEcoRIとXhoIで消化し、同酵素で処理したpFastBacI (Gibco BRL社)へ組み込み、バキュロウイルス発現プラスミド、pFB-1006 (全長アミノ酸1-1186をコード)とpFB-1006t (全長からVAMP相同領域と推察される領域を欠失した、アミノ酸1-1157をコード)を得た。コンピテント大腸菌DH10BAC (Gibco BRL社)にこれらのプラスミドをトランスポジションすることでそれぞれのバックミドBac-1006、Bac-1006tを得た。

1006 (s) : CCGGAATTTCGCCACCCATGCATCACCAT
CACCATCACCAAGAAGAAGTTTAATTTCCGAAAAGTT

(配列表の配列番号：3)

1006 (a) 1 : CCGCTCGAGTCAGAAATTGGTACCATTT
CTTATCCTTG (配列表の配列番号：4)

1006 (a) 2 : CCGCTCGAGTCAAGTTTTCTCTTCCAG
CTCTCCTAG (配列表の配列番号：5)

本明細書中、(s)はセンスプライマー、(a)はアンチセンスプライマーを意味する。(KIAA1006ポリペプチドとKIAA1006C末端欠失ポリペプチドのsf9細胞での発現および精製)

Bac-1006、Bac-1006tのそれぞれをsf9細胞(35mmディッシュ)にCellfectin (Gibco BRL社)を用いて導入し、導入3日後の培養上清を再度sf9細胞に感染させバキュロウイルスを増幅させた。sf9細胞に増幅後のウイルスを感染させ、3日後にEWバッファー(50mM リン酸ナトリウム/300mM NaCl/1% Nonidet P-40/1mM フェニルメタンスルホニルフルオリド(phenylmethanesulfonyl fluoride、PMSF))にて細胞を溶解後、超音波破碎に附した。コバルトレジンTALON (CLONTECH社)を用いて、得られた細胞破碎抽出液からヒスチジン付加KIAA1006ポリペプチドとヒスチジン付加KIAA1006C末端欠失ポリペプチドを精製した。抗ペンタHis抗体(Qiagen)を用いたウエスタンブロッティングにより、ほぼ同量のヒスチジン付加KIAA1006ポリペプチドとヒスチジン付加KIAA1006C末端欠失ポリペプチドが回収できたことを確認した。

ラットm-トモシンは大腸菌を用いた通常の方法では発現しないため、sf9細胞およびCOS7細胞で発現させたと報告されている(非特許文献1)。しかしながら、この方法においても得られたタンパク質は不溶性であったため、SDS-PAGE後リネーチャーしたものを解析に用いたことも記述されている。今回、発明者らが見出した本発明に係るポリペプチドの2つのフォームはどちらも可溶性タンパク質として精製でき、コバルトレジンによって精製可能であったためインビトロ結合試験が可能となった。本発現・精製法を用いれば、Fujitaraがラットm-トモシンについて行えなかった(非特許文献1)ヒトシンタキシン1aと本発明に係るポリペプチドとの結合・解離定数等も測定可能である。

(ヒトシンタキシン1aの大腸菌での発現および精製)

ヒトシンタキシン1aを得るために、まず、ヒト脳polyA RNA (CLONTECH社)由来のcDNAをテンプレートとして下記sy1a4T(s) (配列表の配列番号：6)、sy1a4T(a) (配列表の配列番号：7)の両プライマーを用いてシンタキシン1aのORF領域内1-266AAをPCRにより増幅した。これをEcoRIとXhoIで消化し、同様にEcoRIとXhoIで消化した、GST融合タンパク質発現用

プラスミド pGEX - 4T - 3 (Amersham pharmacia biotech社) に組換え、pGEX - sy1a を得た。pGEX - sy1a の配列を確認し、PCR による変異およびフレームのずれがないことを確認した。

sy1a 4T (s) : CCGGAATTCCATGAAGGACCGAACCC
AGGAGCTC (配列表の配列番号 : 6)

sy1a 4T (a) : CCGCTCGAGTTACGCCTTGCTCTGGT
ACTT (配列表の配列番号 : 7)

pGEX - sy1a をトランスフォーメーションした DH5a を増殖後期 (OD 0.5 以上) に入るまで 37 °C にて培養後、イソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド (Isopropyl - β - D - thiogalactopyranoside、IPTG) を終濃度 1 mM 添加し 5 時間の発現誘導を行った。集めた菌を PBS (-) で洗浄し、緩衝液 A (50 mM トリス塩酸 pH 7.5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF) に懸濁後、氷中リゾチーム (0.5 mg/ml) で 30 分間処理した。Nonidet P - 40 (終濃度 1%) 添加後超音波処理で処理し、その遠心上清より GST - シンタキシン 1a (1 - 266 AA) をグルタチオンセファロース (Amersham pharmacia biotech社) を用いて定法に従って精製した。インサートを入れていない pGEX - 4T - 3 を用いて同様に発現誘導を行い、GST を発現・精製した。

10

20

ここにおいて発現させたシンタキシン 1a は ORF 全長ではなく、C 端側アミノ酸残基を除いた 1 - 266 アミノ酸からなるタンパク質である。シンタキシン 1a の C 端側 21 アミノ酸残基が極めて親水性が低く不溶化の原因になること、C 端側を欠失させてもシンタキシン 1a のタンパク質としての特性が失われないことが文献的にも確認された (非特許文献 10、非特許文献 11、非特許文献 12 および非特許文献 13) ことから、C 端側アミノ酸残基を除いた 1 - 266 アミノ酸からなるシンタキシン 1a を使用した。

その結果、クマーシーブリアントブルー染色によりほぼシングルバンドとなる GST - シンタキシン 1a 融合タンパク質の精製標品を得た。GST に関しても同様の方法で精製標品を得た。

(KIAA1006 ポリペプチドとシンタキシン 1a の結合解析)

30

コバルトレジンで精製した KIAA1006 ポリペプチド (上述のヒスチジン付加 KIAA1006 ポリペプチド) およびその C 末端欠失体 (上述のヒスチジン付加 KIAA1006 C 末端欠失ポリペプチド) を GST (17 μg) を結合させたグルタチオンセファロース (bed volume 10 μl) と混合し、4 °C で 6 時間回転攪拌した後これを遠心した。得られた上清 (GST - グルタチオンセファロース非吸着画分) を GST - シンタキシン 1a (17 μg) を結合させたグルタチオンセファロース (bed volume 10 μl) にそれぞれ加え、4 °C でさらに 16 時間回転攪拌した後これを遠心した。GST - グルタチオンセファロース吸着画分、GST - シンタキシン 1a - グルタチオンセファロース吸着画分のそれぞれを SDS - PAGE サンプルバッファーで溶出し、抗ペンタHis抗体 (Qiagen社) を用いたウエスタンブロッティングでシンタキシン 1a に対する KIAA1006 ポリペプチドとその C 末端欠失体の結合を解析した。

40

なお、SDS - PAGE には 4 - 12% Bis - Tris Gel (NOVEX社) を用いた。ホースラディッシュ・パーオキシダーゼ標識した 2 次抗体の検出は ECL Western blotting detection reagents (Amersham pharmacia biotech社) を用いて行った。

その結果、第 2 図に示すように、GST - グルタチオンセファロース吸着画分中には、KIAA1006 ポリペプチド、C 末端欠失体どちらについても検出されなかった (第 2 図 ; レーン 1 と 2)。一方、GST - シンタキシン 1a を結合したグルタチオンセファロースからの溶出液には、KIAA1006 ポリペプチドを供した場合には抗ペンタHis抗体で検出されるバンドが検出されたが、C 末端欠失体を供した時は、溶出液中に C 末端欠

50

失体は確認できなかった(第2図; レーン4と6)。

したがって、K I A A 1 0 0 6 O R F全長がシタキシン1 aに結合すること、およびC末端欠失体はシタキシン1 aに結合しないことが明らかとなった。これらの結果から、K I A A 1 0 0 6 ポリペプチドはそのV A M P相同性領域を通じて、シタキシンに結合することが明らかとなった。

産業上の利用の可能性

以上、かずさDNA研究所の公開されているヒト脳由来長鎖cDNAライブラリーより選出したクローンK I A A 1 0 0 6がヒトシタキシン1 aに結合するタンパク質をコードすることを見出した。この遺伝子はラットm - トモシンとヌクレオチドレベルで約57.6%の相同性を有しており、アミノ酸レベルでは約67.9%の相同性を有していた。K I A A 1 0 0 6は脳において特異的に発現していることがデータベース上にて報告されている。シタキシン1 aは神経伝達物質の放出に重要なタンパク質であることが知られており、これに結合し得るK I A A 1 0 0 6 ポリペプチドも神経伝達物質の放出に重要な役割を担っていることが示唆される。かくして、本発明に係るK I A A 1 0 0 6、その由来物であるポリペプチド、並びにこれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチドに関連する疾患、例えば神経伝達物質の放出異常や量的異常に基づく疾患の防止薬および/または治療薬、並びに診断手段として有用であることを見出した。

配列表フリーテキスト

配列表配列番号1: cDNA配列より推定されるK I A A 1 0 0 6 O R F全長ポリペプチドのアミノ酸配列

配列表配列番号2: K I A A 1 0 0 6のN末端上流を5' - r a c e法にて解析する時に用いたプライマー

配列表配列番号3: P C RにてK I A A 1 0 0 6 O R F部分配列を増幅する時に用いたセンスプライマー

配列表配列番号4: P C RにてK I A A 1 0 0 6 O R F部分配列を増幅する時に用いたアンチセンスプライマー

配列表配列番号5: P C RにてK I A A 1 0 0 6 O R F C末端欠失体部分配列を増幅する時に用いたアンチセンスプライマー

配列表配列番号6: P C Rにてシタキシン1 a配列を増幅する時に用いたセンスプライマー

配列表配列番号7: P C Rにてシタキシン1 a配列を増幅する時に用いたアンチセンスプライマー

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> KIAA1006 capable of binding to human syntaxin 1a

<130> GP03-1007PCT

<150> JP P2002-75551

<151> 2002-03-19

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> an amino acid sequence of polypeptide consisting of full length K
IAA1006 ORF, deduced from its cDNA sequence

<400> 1

Met Lys Lys Phe Asn Phe Arg Lys Val Leu Asp Gly Leu Thr Ala Ser
1 5 10 15

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asn Ser Gly Gly Gly Ala
 20 25 30

Gly Ser Gly Ser Val His Pro Ala Gly Thr Ala Gly Val Leu Arg Glu
 35 40 45

Glu Ile Gln Glu Thr Leu Thr Ser Glu Tyr Phe Gln Ile Cys Lys Thr
 50 55 60

Val Arg His Gly Phe Pro His Gln Pro Thr Ala Leu Ala Phe Asp Pro

65

70

75

80

Val Gln Lys Ile Leu Ala Ile Gly Thr Arg Thr Gly Ala Ile Arg Ile
 85 90 95

Leu Gly Arg Pro Gly Val Asp Cys Tyr Cys Gln His Glu Ser Gly Ala
 100 105 110

Ala Val Leu Gln Leu Gln Phe Leu Ile Asn Glu Gly Ala Leu Val Ser
 115 120 125

Ala Ser Ser Asp Asp Thr Leu His Leu Trp Asn Leu Arg Gln Lys Arg
 130 135 140

Pro Ala Ile Leu His Ser Leu Lys Phe Asn Arg Glu Arg Ile Thr Tyr
 145 150 155 160

Cys His Leu Pro Phe Gln Ser Lys Trp Leu Tyr Val Gly Thr Glu Arg
 165 170 175

Gly Asn Thr His Ile Val Asn Ile Glu Ser Phe Ile Leu Ser Gly Tyr
 180 185 190

Val Ile Met Trp Asn Lys Ala Ile Glu Leu Ser Thr Lys Thr His Pro
 195 200 205

Gly Pro Val Val His Leu Ser Asp Ser Pro Arg Asp Glu Gly Lys Leu
 210 215 220

Leu Ile Gly Tyr Glu Asn Gly Thr Val Val Phe Trp Asp Leu Lys Ser
 225 230 235 240

Lys Arg Ala Glu Leu Arg Val Tyr Tyr Asp Glu Ala Ile His Ser Ile
 245 250 255

Asp Trp His His Glu Gly Lys Gln Phe Met Cys Ser His Ser Asp Gly
 260 265 270

Ser Leu Thr Leu Trp Asn Leu Lys Ser Pro Ser Arg Pro Phe Gln Thr
 275 280 285

Thr Ile Pro His Gly Lys Ser Gln Arg Glu Gly Arg Lys Ser Glu Ser
 290 295 300

Cys Lys Pro Ile Leu Lys Val Glu Tyr Lys Thr Cys Lys Asn Ser Glu
 305 310 315 320

Pro Phe Ile Ile Phe Ser Gly Gly Leu Ser Tyr Asp Lys Ala Cys Arg
 325 330 335

Arg Pro Ser Leu Thr Ile Met His Gly Lys Ala Ile Thr Val Leu Glu
 340 345 350

Met Asp His Pro Ile Val Glu Phe Leu Thr Leu Cys Glu Thr Pro Tyr
 355 360 365

Pro Asn Glu Phe Gln Glu Pro Tyr Ala Val Val Val Leu Leu Glu Lys
 370 375 380

Asp Leu Ile Val Val Asp Leu Thr Gln Ser Asn Phe Pro Ile Phe Glu
 385 390 395 400

Asn Pro Tyr Pro Met Asp Ile His Glu Ser Pro Val Thr Cys Thr Ala
 405 410 415

Tyr Phe Ala Asp Cys Pro Pro Asp Leu Ile Leu Val Leu Tyr Ser Ile
 420 425 430

Gly Val Lys His Lys Lys Gln Gly Tyr Ser Asn Lys Glu Trp Pro Ile
 435 440 445

Ser Gly Gly Ala Trp Asn Leu Gly Ala Gln Thr Tyr Pro Glu Ile Ile
 450 455 460

Ile Thr Gly His Ala Asp Gly Ser Ile Lys Phe Trp Asp Ala Ser Ala
 465 470 475 480

Ile Thr Leu Gln Met Leu Tyr Lys Leu Lys Thr Ser Lys Val Phe Glu
 485 490 495

Lys Gln Lys Val Gly Glu Gly Lys Gln Thr Cys Glu Ile Val Glu Glu
 500 505 510

Asp Pro Phe Ala Ile Gln Met Ile Tyr Trp Cys Pro Glu Ser Arg Ile
 515 520 525

Phe Cys Val Ser Gly Val Ser Ala Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Phe Ser
 530 535 540

Arg His Glu Ile Thr Thr Glu Ile Val Ser Leu Glu Val Arg Leu Gln
 545 550 555 560

Tyr Asp Val Glu Asp Ile Ile Thr Pro Glu Pro Glu Thr Ser Pro Pro
 565 570 575

Phe Pro Asp Leu Ser Ala Gln Leu Pro Ser Ser Arg Ser Leu Ser Gly
 580 585 590

Ser Thr Asn Thr Val Ala Ser Glu Gly Val Thr Lys Asp Ser Ile Pro
 595 600 605

Cys Leu Asn Val Lys Thr Arg Pro Val Arg Met Pro Pro Gly Tyr Gln
 610 615 620

Ala Glu Leu Val Ile Gln Leu Val Trp Val Asp Gly Glu Pro Pro Gln
 625 630 635 640

Gln Ile Thr Ser Leu Ala Val Ser Ser Ala Tyr Gly Ile Val Ala Phe
 645 650 655

Gly Asn Cys Asn Gly Leu Ala Val Val Asp Phe Ile Gln Lys Thr Val
 660 665 670

Leu Leu Ser Met Gly Thr Ile Asp Leu Tyr Arg Ser Ser Asp Leu Tyr
 675 680 685

Gln Arg Gln Pro Arg Ser Pro Arg Lys Asn Lys Gln Phe Ile Ala Asp
 690 695 700

Asn Phe Cys Met Arg Gly Leu Ser Asn Phe Tyr Pro Asp Leu Thr Lys
 705 710 715 720

Arg Ile Arg Thr Ser Tyr Gln Ser Leu Thr Glu Leu Asn Asp Ser Pro
 725 730 735

Val Pro Leu Glu Leu Glu Arg Cys Lys Ser Pro Thr Ser Asp His Val
 740 745 750

Asn Gly His Cys Thr Ser Pro Thr Ser Gln Ser Cys Ser Ser Gly Lys
 755 760 765

Arg Leu Ser Ser Ala Asp Val Ser Lys Val Asn Arg Trp Gly Pro Gly
 770 775 780

Arg Pro Pro Phe Arg Lys Ala Gln Ser Ala Ala Cys Met Glu Ile Ser

785

790

795

800

Leu Pro Val Thr Thr Glu Glu Asn Arg Glu Asn Ser Tyr Asn Arg Ser
 805 810 815

Arg Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Asp Lys Asp Ser Lys Glu Ala Ile
 820 825 830

Thr Ala Leu Tyr Phe Met Asp Ser Phe Ala Arg Lys Asn Asp Ser Thr
 835 840 845

Ile Ser Pro Cys Leu Phe Val Gly Thr Ser Leu Gly Met Val Leu Ile
 850 855 860

Ile Ser Leu Asn Leu Pro Leu Ala Asp Glu Gln Arg Phe Thr Glu Pro
 865 870 875 880

Val Met Val Leu Pro Ser Gly Thr Phe Leu Ser Leu Lys Gly Ala Val
 885 890 895

Leu Thr Phe Ser Cys Met Asp Arg Met Gly Gly Leu Met Gln Pro Pro
 900 905 910

Tyr Glu Val Trp Arg Asp Pro Asn Asn Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ser
 915 920 925

Trp Arg Arg Lys Val Val Met Asn Ser Ser Ser Ala Ser Gln Glu Ile
 930 935 940

Gly Asp His Gln Tyr Thr Ile Ile Cys Ser Glu Lys Gln Ala Lys Val
 945 950 955 960

Phe Ser Leu Pro Ser Gln Thr Cys Leu Tyr Val His Asn Ile Thr Glu
 965 970 975

Thr Ser Phe Ile Leu Gln Ala Asn Val Val Val Met Cys Ser Ser Ala
 980 985 990

Cys Leu Ala Cys Phe Cys Ala Asn Gly His Ile Met Ile Met Ser Leu
 995 1000 1005

Pro Ser Leu Arg Pro Met Leu Asp Val Asn Tyr Leu Pro Leu Thr
 1010 1015 1020

Asp Met Arg Ile Ala Arg Thr Phe Cys Phe Thr Asn Glu Gly Gln
 1025 1030 1035

Ala Leu Tyr Leu Val Ser Pro Thr Glu Ile Gln Arg Leu Thr Tyr
 1040 1045 1050

Ser Gln Glu Met Cys Asp Asn Leu Gln Asp Met Leu Gly Asp Leu
 1055 1060 1065

Phe Thr Pro Ile Glu Thr Pro Glu Ala Gln Asn Arg Gly Phe Leu
 1070 1075 1080

Lys Gly Leu Phe Gly Gly Ser Gly Gln Thr Phe Asp Arg Glu Glu
 1085 1090 1095

Leu Phe Gly Glu Ala Ser Ala Gly Lys Ala Ser Arg Ser Leu Ala
 1100 1105 1110

Gln His Ile Pro Gly Pro Gly Ser Ile Glu Gly Met Lys Gly Ala
 1115 1120 1125

Ala Gly Gly Val Met Gly Glu Leu Thr Arg Ala Arg Ile Ala Leu
 1130 1135 1140

Asp Glu Arg Gly Gln Arg Leu Gly Glu Leu Glu Glu Lys Thr Ala
 1145 1150 1155

Gly Met Met Thr Ser Ala Glu Ala Phe Ser Lys His Ala His Glu
 1160 1165 1170

Leu Met Leu Lys Tyr Lys Asp Lys Lys Trp Tyr Gln Phe
 1175 1180 1185

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer used for analysing the upstream of N-terminus of KIAA1006 by 5' -race method

<400> 2

gccaggggag gaggcagtta agccatc

27

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sense primer used for amplifying the partial sequence of KIAA1006 ORF by PCR

<400> 3

cgggaattcg ccaccatgca tcaccatcac catcacaaga agaagtttaa tttccgaaaa

60

gtt

63

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an antisense primer used for amplifying the partial sequence of K
IAA1006 ORF by PCR

<400> 4

ccgctcgagt cagaattggt accatttctt atccttg 37

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an antisense primer used for amplifying byPCR of the partial sequ
ence of C-terminal deletion mutant of KIAA1006 ORF

<400> 5

ccgctcgagt caagttttct cttccagctc tcctag 36

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sense primer used for amplifying the sequence of syntaxin 1a by
PCR

<400> 6

ccggaattcc atgaaggacc gaaccagga gctc 34

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an antisense primer used for amplifying the sequence of syntaxin
1a by PCR

<400> 7

ccgctcgagt tacgccttgc tctgtaett 30

【図面の簡単な説明】

第1図は、神経伝達物質のエキソサイトーシスにおいて、1) シンタキシンに結合したMUNC-18がトモシンに置き換わるステップ、2) 10Sコンプレックスの形成、3) 7Sコンプレックスの形成、4) 20Sコンプレックスの形成、を順次経て、シナプス小

胞とシナプス前膜が融合することを説明する模式図である。以下に第 1 図で用いた各符号の意味を列記する。

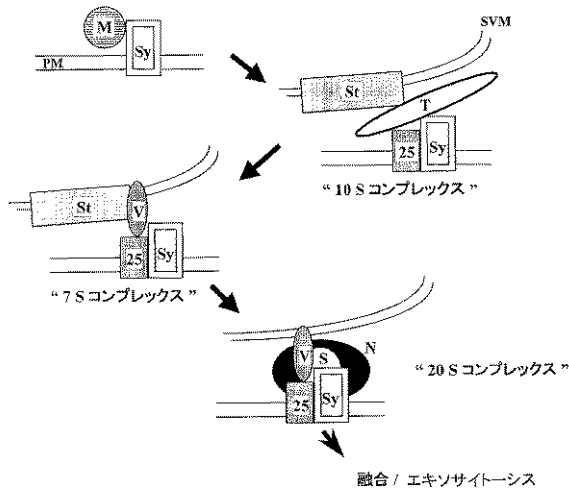
- P M : シナプス前膜
- S V M : シナプス小胞膜
- S y : シンタキシン
- M : M U N C - 1 8
- T : トモシン
- N : N S F
- S : - S N A P
- 2 5 : S N A P - 2 5
- V : V A M P
- S t : シナプトタグミン

10

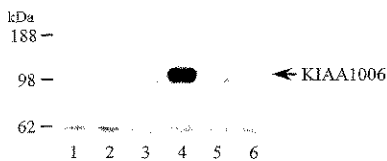
第 2 図は、K I A A 1 0 0 6 ポリペプチドおよび K I A A 1 0 0 6 C 末端欠失体のシンタキシン 1 a に対する結合を示す。実施例に記載した方法に従って発現・精製した本発明に係るポリペプチドおよび C 末端欠失体を、実施例に記載した方法に従ってグルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) 結合グルタチオンセファロース、ついでシンタキシン 1 a - G S T 結合グルタチオンセファロースに供した。G S T 結合グルタチオンセファロースとシンタキシン 1 a - G S T 結合グルタチオンセファロースに結合した分画を、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) のサンプルバッファーで溶出し、これら G S T 結合グルタチオンセファロース非吸着分画と共に抗ペンタヒスチジン (p e n t a H i s) 抗体 (Q i a g e n) を用いたウェスタンブロッティングで分析した。レーン 1、2 は G S T 吸着画分、レーン 3、5 は G S T 非吸着画分、レーン 4、6 は、シンタキシン 1 a - G S T 吸着画分、レーン 1、3、4 は K I A A 1 0 0 6 ポリペプチド (1 - 1 1 8 6 A A)、レーン 2、5、6 は、K I A A 1 0 0 6 ポリペプチド C 末端欠失体 (1 - 1 1 5 7 A A) である。

20

【 図 1 】
第 1 図



【 図 2 】
第 2 図



【手続補正書】

【提出日】平成15年10月27日(2003.10.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の群より選ばれるヒトシタキシン1a (syntaxin 1a) に結合する機能を有するポリペプチド；

(i) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(ii) 前記(i)のポリペプチドを含有するポリペプチド、

(iii) 前記(i)のポリペプチドと少なくとも90%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、

および

(iv) 前記(i)から(iii)の何れかのポリペプチドにおいて1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入といった変異を有するポリペプチド。

【請求項2】

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を含んでなるペプチド。

【請求項3】

請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチドであって、シナプス小胞とシナプス前膜との融合に関わる、ヒトシタキシン1aとシナプトソーム関連25kDaタンパク質(25kDa synaptosomal-associated protein)およびシナプトタグミン(synaptotagmin)との複合体形成を促進するポリペプチドまたはペプチド。

【請求項4】

請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチドを含む、ヒトシタキシン1aとの結合機能による、シナプス小胞とシナプス前膜の融合を介するエキソサイトーシスの調整剤。

【請求項5】

請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチドをコードする塩基配列またはその相補的配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項6】

請求の範囲第5項に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項7】

請求の範囲第5項に記載のポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項8】

請求の範囲第5項から第7項の何れか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項9】

組換えベクターが組換え発現ベクターである請求の範囲第8項に記載の組換えベクター。

【請求項10】

請求の範囲第8項または第9項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項11】

請求の範囲第9項に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程を含む、請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチド

の製造方法。

【請求項 1 2】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項 1 3】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと、該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害する請求の範囲第 1 2 項に記載の抗体。

【請求項 1 4】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドとヒトシンタキシン 1 a (syntaxin 1 a) との結合を阻害する請求の範囲第 1 3 項に記載の抗体。

10

【請求項 1 5】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと、該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化する化合物、および / または請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチド、請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 8 項または第 9 項に記載のペクター、請求の範囲第 1 0 項に記載の形質転換体、および請求の範囲第 1 2 項から第 1 4 項の何れか 1 項に記載の抗体から選択される少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする同定方法。

20

【請求項 1 6】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質とが結合する条件下で、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドおよび該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質を被検物質と接触させ、次いで、請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検物質が請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたは該ペプチドと相互作用するタンパク質との結合を阻害または安定化するか否かを決定することを含む同定方法。

30

【請求項 1 7】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドとヒトシンタキシン 1 a (syntaxin 1 a) との結合を阻害または安定化する化合物の同定方法であって、該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシンタキシン 1 a (syntaxin 1 a) との結合を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ペプチドおよびヒトシンタキシン 1 a (syntaxin 1 a) を被検物質と接触させ、次いで、該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシンタキシン 1 a (syntaxin 1 a) との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検物質が該ポリペプチドまたは該ペプチドとヒトシンタキシン 1 a (syntaxin 1 a) との結合を阻害または安定化するか否かを決定することを含む同定方法。

40

【請求項 1 8】

請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害または促進する化合物の同定方法であって、ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、該ポリヌクレオチドと被検物質とを接触させ、次いで、該ポリヌクレオチドの発現により生じるシグナルの存在または不存在または変化を検出することにより、被検物質が該ポリヌ

50

クレオチドの発現を阻害または促進するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項 19】

請求の範囲第 15 項から第 18 項の何れか 1 項に記載の方法で同定される化合物。

【請求項 20】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチドと相互作用して該ポリペプチドとヒトシタキシン 1a (syntaxin 1a) との結合を阻害または安定化する化合物。

【請求項 21】

請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害または促進する化合物。

【請求項 22】

請求の範囲第 1 項のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチド、請求の範囲第 5 項から第 7 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第 8 項または第 9 項に記載のベクター、請求の範囲第 10 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 13 項または第 14 項に記載の抗体、および請求の範囲第 19 項から第 21 項の何れか 1 項に記載の化合物から選択される少なくとも何れか一つを有効量含んでなる医薬組成物。

【請求項 23】

請求の範囲第 2 項に記載の医薬組成物であって、神経伝達物質の放出を促進または阻害する作用を有する医薬組成物。

【請求項 24】

請求の範囲第 2 項に記載の医薬組成物であって、神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止剤および/または治療剤である医薬組成物。

【請求項 25】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドとヒトシタキシン 1a との結合を阻害するまたは安定化することを特徴とする神経伝達物質の放出の促進方法または阻害方法。

【請求項 26】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドとヒトシタキシン 1a との結合を阻害するまたは安定化することを特徴とする神経伝達物質の量的異常に基づく疾患の防止方法および/または治療方法。

【請求項 27】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを定量的または定性的に測定する方法。

【請求項 28】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドの発現または機能の異常に基づく疾患の診断に使用するための測定方法であって、(A) 該ポリペプチドをコードしている核酸、および/または (B) 該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法。

【請求項 29】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドの量的異常に基づく神経伝達機能の異常に関する疾患の診断に使用するための測定方法であって、(A) 該ポリペプチドをコードしている核酸、および/または (B) 該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法。

【請求項 30】

請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 2 項に記載のペプチド、請求の範囲第 6 項から第 8 項の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチド、および請求の範囲第 13 項から第 15 項に記載の抗体から選ばれる少なくとも一つを含んでなる試薬キット。

【請求項 31】

請求の範囲第 15 項から第 18 項の何れか 1 項に記載の同定方法または請求の範囲第 27 項から第 29 項の何れか 1 項に記載の測定方法に使用するための請求の範囲第 30 項に記載の試薬キット。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチドをコードする塩基配列(ただし、GenBankにアクセッション番号AB023223として登録されているDNA塩基配列を除く)またはその相補的配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項33】

請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチドを含んでなる、シナプス小胞とシナプス前膜との融合に関わる、ヒトシンタキシン1a(syntaxin 1a)とシナプトソーム関連25kDaタンパク質(25kDa synaptosomal-associated protein)およびシナプトタグミン(synaptotagmin)との複合体形成促進剤。

10

【請求項34】

請求の範囲第13項に記載の抗体を含んでなる、請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチドと該ポリペプチドまたはペプチドと相互作用するタンパク質との結合阻害剤。

【請求項35】

請求の範囲第14項に記載の抗体を含んでなる、請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のペプチドとヒトシンタキシン1a(syntaxin 1a)との結合阻害剤。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/12, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, A61K35/76, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P25/00, G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/566 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/12, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, A61K35/76, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P25/00, G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/566 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	NAGASE, T. et al., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes.XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro, DNA Res. 1999, Vol.6, No.1, pages 63 to 70	1-3,5-14/ 4,15-18, 22-25,27-31
A	FUJITA, Y. et al., Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. Neuron. May, 1998, Vol.20, No.5, pages 905 to 915	1-18,22-25, 27-31
A	Weir ML. et al., VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs. Biochem.Biophys.Res.Commun., Aug. 2001, Vol.286, No.3, p.616-21	1-18,22-25, 27-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 19 June, 2003 (19.06.03)	Date of mailing of the international search report 08 July, 2003 (08.07.03)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03308

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	Perez-Branguli F. et al., Munc 18a binding to syntaxin 1A and 1B isoforms defines its localization at the plasma membrane and blocks SNARE assembly in a three-hybrid system assay., Mol Cell Neurosc., Jun. 2002, Vol.20, No.2, pages 169 to 180	1-18, 22-25, 27-31
P,A	Scales SJ. et al., Amisyn, a novel syntaxin-binding protein that may regulate SNARE complex assembly., J.Biol.Chem., Aug. 2002, Vol.277, No.31, pages 28271 to 28279	1-18, 25, 27-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03308

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: 26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 26 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.: (A)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(A) Claims 19-21, 22-24 (the parts relating to 19-21)
(B) See extra sheet.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03308

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

The compound as set forth in claim 19 and the medicinal compositions as set forth in claims 22 to 24 (the parts relating to claim 19) are specified by "an identification method according to any of claims 15 to 18" and thus involve any compounds and medicinal compositions obtained by the identification method.

However, the description discloses neither any specific compounds nor any medicinal compositions obtained by the above identification method. Therefore, the compound as set forth in claim 19 and the medicinal compositions as set forth in claims 22 to 24 (the parts relating to claim 19) are not disclosed in the meaning as described in PCT Article 5 or supported by the description in the meaning as described in PCT Article 6. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope and what are not. Thus, the above claims are extremely unclear and fail to fulfill the requirement of clearness as defined in PCT Article 6.

Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims.

The compounds as set forth in claims 20 to 21 and the medicinal compositions as set forth in claims 22 to 24 (the parts relating to claims 20 to 21) are specified by a desired property "interacting with the polypeptide as set forth in claim 1 or the polypeptide as set forth in claim 2 to thereby inhibit or stabilize the binding of the polypeptide to human syntaxin 1a" (claim 20) or "interacting with a polypeptide as set forth in any of claims 5 to 7 to thereby inhibit or promote the expression thereof" (claim 21). Therefore, the compounds as set forth in claims 20 to 21 and the medicinal compositions as set forth in claims 22 to 24 involve any compounds having such property. However, the description discloses no such compounds. Therefore, the compounds and the medicinal compositions are not disclosed in the meaning as described in PCT Article 5 or supported by the description in the meaning as described in PCT Article 6. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope and what are not. Thus, the above claims are extremely unclear and fail to fulfill the requirement of clearness as defined in PCT Article 6.

Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP03/03308	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N 15/12, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 14/47, 16/18, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68, A61K 35/76, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 25/00, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N 15/12, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 14/47, 16/18, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68, A61K 35/76, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 25/00, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS/WPI(DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/A	Nagase, T. et al., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro, DNA Res. 1999, Vol. 6, No. 1, p. 63-70	1-3, 5-14/ 4, 15-18, 22- 25, 27-31	
A	Fujita Y. et al., Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. Neuron. May 1998, Vol. 20, No. 5, p. 905-915	1-18, 22-25, 27-31	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー			
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		の日の後に公表された文献	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 19.06.03		国際調査報告の発送日 08.07.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子	
		4N 9637	
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/03308
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Weir ML. et al., VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> Aug 2001, Vol. 286, No. 3, p. 616-21.	1-18, 22-25, 27-31
PA	Perez-Branguli F. et al., Munc 18a binding to syntaxin 1A and 1B isoforms defines its localization at the plasma membrane and blocks SNARE assembly in a three-hybrid system assay. <i>Mol Cell Neurosci.</i> Jun 2002, Vol. 20, No. 2, p. 169-180	1-18, 22-25, 27-31
PA	Scales SJ. et al., Amisyn, a novel syntaxin-binding protein that may regulate SNARE complex assembly. <i>J Biol Chem.</i> Aug 2002, Vol. 277, No. 31, p. 28271-28279	1-18, 25, 27-31

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO3/03308
<p>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p>	
<p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 <u>26</u> は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、 請求の範囲26は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 <u>(A)</u> は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、(B) (A) 請求の範囲19-21、22-24 (19-21に係る部分) (B) 特別ページ参照</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p>	
<p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/03308

第I欄2. について

請求の範囲19に記載の化合物、請求の範囲22-24（請求の範囲19に係る部分）に記載の医薬組成物は、「請求の範囲第15項から第18項の何れか1項に記載の同定方法」によって特定されており、当該同定方法で得られるあらゆる化合物及び医薬組成物を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該同定方法で得られる化合物及び医薬組成物としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲19に記載の化合物、請求の範囲22-24（請求の範囲19に係る部分）に記載の医薬組成物は、PCT5条の意味での開示を欠き、また、PCT6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠いている。さらに、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記クレームは著しく不明確であり、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

したがって、前記クレームに記載された発明について有意義な調査をすることができない。

請求の範囲20-21に記載の化合物、請求の範囲22-24（請求の範囲20-21に係る部分）に記載の医薬組成物は、「請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第2項に記載のポリペプチドと相互作用して該ポリペプチドとヒトシンタキシン1aとの結合を阻害または安定化する」

（請求の範囲20）または「請求の範囲第6項から第7項の何れか1項に記載のポリペプチドと相互作用してその発現を阻害または促進する」（請求の範囲21）という所望の性質により定義されたものである。そして、請求の範囲20-21に記載の化合物、請求の範囲22-24に記載の医薬組成物は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、明細書には、具体的なものが一切記載されていないから、PCT5条の意味での開示を欠き、また、PCT6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠いている。さらに、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記クレームは著しく不明確であり、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

したがって、前記クレームに記載された発明について有意義な調査をすることができない。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2003078633A5	公开(公告)日	2006-05-25
申请号	JP2003576626	申请日	2003-03-19
申请(专利权)人(译)	第一制药有限公司		
[标]发明人	横田博 佐藤一紀		
发明人	横田 博 佐藤 一紀		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	A61P25/00 A61P43/00 C07K14/47 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A A61K37 /02		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	2002075551 2002-03-19 JP		
其他公开文献	JPWO2003078633A1		

摘要(译)

由序列表的SEQ ID NO : 1所示的氨基酸序列组成的多肽，该氨基酸序列与语法素1a结合，或者与与语法素1a的氨基酸序列具有至少约90%同源性的多肽，以及这些多肽的部分肽 以及编码这些或其互补链的多核苷酸，以及进一步的多肽的生理作用抑制剂/拮抗剂/活化剂，以及使用该抑制剂的药物组合物。另外，提供了通过基因工程方法生产多肽或肽的方法，用于鉴定抑制剂/拮抗剂/活化剂的方法，用于诊断与多肽相关的疾病的方法和试剂盒。