

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003－334071
(P2003－334071A)

(43)公開日 平成15年11月25日(2003.11.25)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参 考)
C 1 2 N 9/14	101	C 1 2 N 9/14 101	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 16/40	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/10	ZNA	C 1 2 N 9/10 ZNA	4 B 0 6 3
9/64		9/64 Z	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/06		C 1 2 P 21/06	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2002－141438(P2002－141438)	(71)出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22)出願日	平成14年5月16日(2002.5.16)	(72)発明者	北爪 しのぶ 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成13年11月20日発行の日本工業新聞に掲載		(72)発明者	西道 隆臣 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		(72)発明者	立田 由里子 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		(72)発明者	岡 律子 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		(74)代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シアル酸転移酵素の切断部位認識抗体及びそれを用いたスクリーニング方法

(57)【要約】

【課題】 BACE1がAPP以外の基質に作用するかどうかを検討し、BACE1がAPP以外の基質を切断する活性を測定できる系を確立し、さらに、BACE1がAPP以外の基質を切断する活性を測定できる系を用いて被験物質を評価し、副作用の少ない安全なアルツハイマー病治療薬をスクリーニングする方法を提供する。

【解決手段】 β－セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させることを含む、シアル酸転移酵素を切断する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 β -セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させることを含む、シアル酸転移酵素を切断する方法。

【請求項2】 β -セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させる工程；及び、 β -セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する工程：を含む、 β -セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を測定する方法。

【請求項3】 切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 アミノ酸配列EFQMPKを特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】 アミノ酸配列EFQMPKCを動物に免疫することにより得られる、 β -セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識することができる抗体。

【請求項6】 被験物質の存在下において β -セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させる工程；及び、 β -セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する工程：を含む、 β -セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を阻害しない物質をスクリーニングする方法。

【請求項7】 切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 アミノ酸配列EFQMPKを特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】 β -セクレターゼのAPP切断活性を阻害する物質を被験物質として使用する、請求項6から8の何れかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 β -セクレターゼを用いたシアル酸転移酵素を切断する方法、 β -セクレターゼにより切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識する抗体、並びに β -セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を阻害しない物質をスクリーニングする方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】アルツハイマー病は広汎な神経変性痴呆を伴う疾患である。アミロイド β ペプチド(A β)の生成は、アルツハイマー病の病因の一つである(Selkoe, D.J. (2001) *Physiol.Rev.* 81, 741-766；及び Iwata, N.,他、(2001) *Science* 292, 1550-1552)。A β の形成

の際、アミロイド前駆体タンパク質(APP)は β -セクレターゼにより切断されて可溶性のNH₂末端断片(APPs β)および12kDaのCOOH末端断片(C99)が生成し、後者は膜に結合したままである。C99はさらに γ -セクレターゼによって切断されて、病原性のA β が生成する(De Strooper, B.,他、(1998) *Nature(London)* 391, 387-390；及び, Wolfe, M.S., 他、(1990) *Nature(London)* 398, 513-517)。別の経路では、APPは α -セクレターゼによってA β 配列内で切断されて、可溶性のNH₂末端断片(APPs α)および10kDaの膜結合型COOH末端断片(C83)が生成する(Buxbaum, J.D.,他、(1998) *J.Biol.Chem.* 273, 27765-27767；及び, Lammich, S., 他、(1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, 3922-3927)。C83も γ -セクレターゼによって切断され、非病原性のp3ペプチドが生成する。上記の通り、 β -および γ -セクレターゼはA β 形成の際に重要な役割を果たすことから、これらのプロテアーゼの阻害剤はアルツハイマー病の治療剤となる可能性がある(Potter, H., 他、(2000) *Nat.Bio technol.* 18, 125-126；及び, Li, Y., 他、(2000) *Nature(London)* 405, 689-694)。

【0003】 β 部位APP切断酵素(BACE)1(β アミロイド変換酵素1)が、膜結合型アスパラギン酸プロテアーゼとして最近同定され(Sinha, S., 他、(1999) *Nature(London)* 402, 537-540；Vassar, R., 他、(1999) *Science* 286, 735-741；及び, Yan, R., 他、(1999) *Nature(London)* 402, 533-537)、 β -セクレターゼ活性をインビボで発揮すると考えられている(Luo, Y., 他、(2001) *Nat.Neurosci.* 4, 231-232；及び, Cai, H., 他、(2001) *Natl.Neurosci.* 4, 233-234)。ノザンブロット分析により、BACE1mRNAが脳の末梢組織を含む多くの末梢組織で発現していることが示されているが、その生理学的基質はAPP以外には同定されていない。

【0004】多くのグリコシルトランスフェラーゼはI型膜タンパク質であり、オリゴ糖合成のためにゴルジ体に保持されている(Paulson, J.C., 他、(1989) *J.Biol.Chem.* 264, 17615-17618)。これらの酵素の一部は1以上の内因性プロテアーゼによって切断され、細胞外に分泌される。実際、多くのグリコシルトランスフェラーゼが、血清、初乳、乳などの体液中に細胞外可溶性形態で見られる(Kaplan, H.A., 他、(1983) *J.Biol.Chem.* 258, 11505-11509；Weinstein, J., 他、(1987) *J.Biol.Chem.* 262, 17735-17743；Gerber, A.C., 他、(1979) *Eur.J.Biochem.* 93, 453-460；Elhammer, A., 他、(1986) *J.Biol.Chem.* 261, 5249-5255；及び, Sarnest o, A., 他、(1990) *J.Biol.Chem.* 265, 15067-15075)。体液中へのグリコシルトランスフェラーゼのタンパク質分解切断および分泌は、悪性形質転換および炎症などの様々な病的状態で影響を受けることが実証されているが、切断及び分泌に参与する内因性のプロテアーゼ

は同定されていない (Colley, K.J. (1997) *Glycobiology* 7, 1-13)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上記した通り、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、 β -セクレターゼ (BACE1) により切断され、次いで、 γ -セクレターゼにより別の箇所が切断されることにより、A β ペプチドを産生する。アルツハイマー病治療薬としてBACE1及び γ -セクレターゼ阻害薬を利用する試みがなされている。しかし、 γ -セクレターゼはAPP以外にもシグナル受容体であるNotchやErbB-4レセプターなどの重要な分子を切断し、その阻害剤は多くの副作用を示すことが懸念される。これは γ -セクレターゼを欠損したマウス (Shen, J他、Cell, 89, 629-639 (1997)) が致死性を示すことから裏付けられる。一方、BACE1については、従来はAPP以外の基質が見つかっておらず、またBACE1を欠損したマウス (Luo, Y他、Nat'l.Neurosci., 4, 231-232 (2001); Cai, H.他、ibid, 232-234; Roberds, L.S.他、Hum.Mol.Genet., 10, 1317-1324 (2001)) は正常に発育することから、BACE1阻害剤の方が安全な

アルツハイマー病治療薬となることが示唆されてきた。【0006】本発明は、BACE1がAPP以外の基質に作用するかどうかを検討することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、BACE1がAPP以外の基質を切断する活性を測定できる系を確立することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、BACE1がAPP以外の基質を切断する活性を測定できる系を用いて被験物質を評価し、副作用の少ない安全なアルツハイマー病治療薬をスクリーニングする方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、BACE1が、シアリル α 2, 6ガラクトース残基を生成するゴルジ体に存在するシアリルトランスフェラーゼであるST6Gal I を基質としてこれを切断する活性を有することを初めて見出した。さらに、本発明者らは、BACE1により切断された分泌型のST6Gal I を特異的に認識する抗体を作製し、該抗体を用いることにより、BACE1がST6Gal I を切断する活性を評価する系を確立することに成功した。本発明はこれ

らの知見に基づいて完成したものである。【0008】即ち、本発明によれば、 β -セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させることを含む、シアル酸転移酵素を切断する方法が提供される。本発明の別の側面によれば、 β -セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させる工程；及び、 β -セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する工程：を含む、 β -セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を測定する方法が提供される。

【0009】好ましくは、切断された分泌型シアル酸

転移酵素を特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する。さらに好ましくは、アミノ酸配列EFQMPKを特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する。

【0010】本発明のさらに別の側面によれば、アミノ酸配列EFQMPKCを動物に免疫することにより得られる、 β -セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識することができる抗体が提供される。

【0011】本発明のさらに別の側面によれば、被験物質の存在下において β -セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させる工程；及び、 β -セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する工程：を含む、 β -セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を阻害しない物質をスクリーニングする方法が提供される。

【0012】好ましくは、切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する。さらに好ましくは、アミノ酸配列EFQMPKを特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する。好ましくは、 β -セクレターゼのAPP切断活性を阻害する物質を被験物質として使用する。

【0013】

【発明の実施の形態】 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本発明においては、 β -セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させることにより、シアル酸転移酵素を切断することができる。 β -セクレターゼによりシアル酸転移酵素を切断できることは、本発明により初めて見出された知見である。

【0014】 β -セクレターゼによるシアル酸転移酵素の切断は、インビトロでも細胞内でも行うことができる。インビトロで行う場合には、まず、 β -セクレターゼ (BACE1) 及びシアル酸転移酵素 (ST6Gal I) を精製する。例えば、BACE1-FcおよびプロテインA-ST6Gal I タンパク質を、これらのタンパク質を一過的に発現するCOS細胞の培養培地から、プロテインA-セファロースおよびIgG-セファロースに吸着させることによって精製することができる。反応混合物には、酢酸ナトリウム緩衝液などの緩衝液、BACE1-FcおよびプロテインA-ST6Gal Iを加え、所望によりプロテアーゼ阻害剤を添加することができる。反応混合物を好適な温度 (例えば、37℃) で一定時間インキュベートすることにより、酵素反応を行うことができる。反応後、抗ST6Gal I抗体を用いたイムノブロットにより生成物を分析することができる。

【0015】細胞内で行う場合には、 β -セクレターゼ (BACE1) 及びシアル酸転移酵素 (ST6Gal I) を細胞内で発現することができる組み換え発現ベクターを構築す

る。これらのタンパク質は所望により検出に使用するためのタグを付けた融合タンパク質の形態で発現させることができる。

【0016】組み換え発現ベクターは細胞に導入する。発現に用いる細胞としては、細菌などの原核細胞でもよいし、酵母または動物細胞などの真核細胞の何れでもよい。好ましくは、動物細胞を使用することができる。細胞への組み換え発現ベクターの導入は常法により行うことができ、当業者であれば宿主細胞の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、細菌の場合には、プロトプラスト法、またはコンピテント細胞を用いる方法を挙げることができ、酵母細胞の場合には、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法または酢酸リチウム法を挙げることができ、哺乳類細胞の場合には、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法またはリポフェクション法を挙げることができる。

【0017】細胞内で発現させたβ-セクレターゼ (BACE1) が細胞内で発現したシアル酸転移酵素 (ST6Gal I) に作用することにより、シアル酸転移酵素 (ST6Gal I) は切断されて、可溶性の分泌型シアル酸転移酵素が生成し、細胞外に分泌される。細胞外に分泌されたシアル酸転移酵素は、培養液を回収し、分析することにより検出または測定することができる。

【0018】本発明によれば、β-セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させ、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定することにより、β-セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を測定することができる。本発明の好ましい態様によれば、切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定することができ、特に好ましくは、アミノ酸配列 E F Q M P K を特異的に認識する抗体を用いて、切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定することができる。

【0019】さらに本発明によれば、アミノ酸配列 E F Q M P K C を動物に免疫することにより得られる、β-セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識することができる抗体が提供される。β-セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素とは、N末端にアミノ酸配列 E F Q M P K を有する可溶性の分泌型シアル酸転移酵素のことを言う。本発明の抗体は、シアル酸転移酵素の代謝をモニターするために使用することができ、特に、β-セクレターゼによる A P P の切断を阻害するが、β-セクレターゼによるシアル酸転移酵素の切断を阻害しない薬剤をスクリーニングする際に有用である。

【0020】本発明の抗体の作製方法は、特に限定されないが、好ましくは、タンパク質の切断端に特異的な抗体を作製する技術 (Saido T.C.他、Neuron 14, 457-466, 1995) を応用して、BACE1の代謝産物である可溶性の分泌型シアル酸転移酵素のN末端に特異的な抗体を作製

することができる。

【0021】即ち、シアル酸転移酵素は、BACE1によってゴルジ体の中で切断を受け、その後、細胞外に分泌されてくる。この分泌型シアル酸転移酵素は、N末端のアミノ酸配列としてグルタミン酸 (E) - フェニルアラニン (F) - グルタミン (Q) - メチオニン (M) - プロリン (P) - リジン (K) ・ ・ ・ (このアミノ酸配列を有するペプチドを本明細書では、E F Q M P K とも表記する) を有している。この切断端を有する分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識する抗体の作製方法の一例を以下に示す。

【0022】ペプチドに対する抗体が効率よく産生されるように、ペプチドをkeyhole limpet hemocyanin (KLH) に結合する。具体的にはペプチドのカルボキシル末端にシステイン (C) を付加した E F Q M P K C ペプチドを KLH にカルボイミド法を用いて化学的に結合する。これをウサギにフロイントアジュバンドとともに免疫し、抗血清を得る。得られた抗血清を E F Q M P K C ペプチドを結合したアフィニティカラムにて精製する。これを E 4 1 抗体と命名する。

【0023】E 4 1 抗体の反応特異性を確認した結果を図5に示す。E 4 1 抗体はN末端に E F Q M P K 配列を有するシアル酸転移酵素に結合する。この結合は、E F Q M P K C ペプチドで阻害されるが、F Q M P K ペプチドでは阻害されない。すなわち、E 4 1 抗体は、E F Q M P K 配列に高い特異性を示すことが確認された。

【0024】さらに本発明によれば、被験物質の存在下においてβ-セクレターゼとシアル酸転移酵素とを接触させる工程；及び、β-セクレターゼの酵素活性により切断された分泌型シアル酸転移酵素を検出又は測定する工程：を含む、β-セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を阻害しない物質をスクリーニングする方法が提供される。

【0025】本発明のスクリーニング方法は、β-セクレターゼによるシアル酸転移酵素の切断反応の場合と同様に、インビトロでも細胞内でも行うことができる。インビトロで行う場合には、BACE-FcおよびプロテインA-ST6Galを含む反応混合物に被験物質を添加して、反応を行なう。反応後、抗ST6Gal I抗体を用いたイムノブロットにより生成物を分析することができる。

【0026】細胞内で行う場合には、β-セクレターゼ (BACE1) 及びシアル酸転移酵素 (ST6Gal I) を細胞内で発現することができる組み換え発現ベクターを構築し、細胞に導入して発現させる。この発現系に被験物質を添加すればよい。このアッセイ系においてシアル酸転移酵素の切断及び分泌を抑制する被験物質は、BACE1活性阻害剤であると判断される。分泌されたシアル酸転移酵素の定量は、例えば、サンドイッチ E L I S A 法で行うことができる。最終的な検出には、上記した本発明の抗体 (即ち、BACE1により切断された分泌型シアル酸

移酵素を特異的に認識する抗体)を用いて行うことができる。本発明の抗体を用いることにより、BACE1による切断・分泌産物を特異的に検出することができる。

【0027】本発明で用いる被験物質としては、任意の物質を使用することができる。被験物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリーもしくはコンビナトリアルライブラリーでもよい。被験物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

【0028】本発明の好ましい態様によれば、 β -セクレターゼのAPP切断活性を阻害する物質を被験物質として使用する。このような物質を被験物質として使用し、本発明のスクリーニング方法により、 β -セクレターゼのシアル酸転移酵素切断活性を阻害しない物質を選択することにより、副作用の少ない安全性の高いアルツハイマー病治療薬を開発することが可能になる。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0029】

【実施例】(A) 材料および方法

1. 材料

DMEM及びLipofectinなどの組織培養培地及び試薬はInvitrogenから購入した。プロテインAセファロース・ファスト・フローはAmersham Pharmacia Biotechから購入した。DNA精製用カラムはQiagenから得た。タンパク質分子量標準はBio-Radから購入した。 [35 S] Express protein-labeling mixは、Dupont/NENから購入した。BACE阻害剤、KTEEISEVN (Sta) VAEFは、Bachemから購入した。可溶性ST6Gal IのN末端を特異的に認識するポリクローナル抗体E41は、keyhole limpetヘモシアニンと結合した合成ペプチドEFQMPKCを免疫することによって作製した(Saido, T.C., 他、(1995) Neuron 14, 457-466)。

【0030】2. 発現プラスミド

一過性トランスフェクション実験のために、ST6Gal I-pSVL及びST6Gal I FLAG-pSVLを既報の通り構築した(Kitazume-Kawaguchi, 他、(1999) Glycobiology 9, 1397-1406)。安定発現実験のために、ST6Gal I-pBluescriptからBamHI及びXhoIを用いてST6Gal I FLAGを切り出し、pCDNA3.1 (Invitrogen) のBamHI及びXhoI部位にライゲーションすることによってST6Gal I FLAG-pcDNA3.1を構築した。全長APPswcDNAをpCDNA3.1 (Invitrogen) のXbaIおよびApaI部位にライゲーションすることによって、APPsw-pcDNAを作製した(Maruyama, K., (1990) Nature (London) 347, 566-569)。ヒトBACE1のアミノ酸1-460をヒトIgG1のFc領域をコードするPEF-FcのClaI及び

BamHI部位にインフレームで挿入することによって、BACE-Fcキメラタンパク質を作製した。ST6Gal Iのアミノ酸27-103をプロテインAのシグナルペプチドとIgG結合ドメインをコードするpCDSAのEcoRIおよびXhoI部位に挿入することによって、プロテインA-ST6Gal Iキメラタンパク質を作製した(Kitazume-Kawaguchi, 他、(2001) J.Biol.Chem. 276, 15696-15703)。

【0031】3. 細胞培養およびトランスフェクション
DMEM/10%FBS中で維持したCOS-7またはヒト胎児腎臓(HEK)293細胞を100mm組織培養皿上に播種し、37°Cの5%CO₂インキュベーター内で50~70%コンフルエントになるまで生育させた。Lipofectin法およびOpti-MEM Iを用いて細胞をトランスフェクションした(Colley, K., 他、(1992) J.Biol.Chem. 267, 7784-7793)。トランスフェクションしたタンパク質の発現は典型的には16~36時間持続させた。ラットST6Gal Iまたはmycのタグの付いたヒトBACE1でトランスフェクションした細胞を得るために、HEK293細胞に、ST6Gal I FLAG-pcDNA3.1またはBACE1 myc-pcDNA3.1の何れかをトランスフェクションした。G418を補充した培養培地で選択した後、ST6Gal IまたはBACE1の高発現クローンを限界希釈法で取得した。

【0032】4. 免疫蛍光顕微鏡分析

ST6Gal I FLAGを安定に発現するHEK293細胞に、BACE1-mycのcDNAをトランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後、細胞をPBSでリンスし、氷冷メタノールで10分間固定し、ブロッキング処理として5%ヤギ血清を含むPBS中でインキュベーションした。間接免疫蛍光実験のために、細胞を、抗ST6Gal Iウサギポリクローナル抗体と抗mycモノクローナル抗体(Invitrogen) (ブロッキング緩衝液中で1:100)と一緒に45分間インキュベートした(Colley, K., 他、(1992) J.Biol.Chem. 267, 7784-7793)。次いで、細胞をPBSで洗浄し、Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギIgGとAlexa Fluor 594ヤギ抗マウスIgG抗体(Molecular Probes) (ブロッキング緩衝液中で1:100)と一緒に45分間インキュベートした。PBSで洗浄後、細胞を30%グリセロール上に載せ、C-Apochromat($\times 63$, 1.4 n. a.)油液浸対象を用いて、Axiovert 100M逆相顕微鏡(Zeiss LSM510)を用いて観察した。適当な励起及び障害フィルターを使用して蛍光を観察した。

【0033】5. 一過性発現させたタンパク質のパルス相分析及び免疫沈降

細胞の代謝標識及び発現タンパク質の免疫沈降は既報の通り行った(Kitazume-Kawaguchi, 他、(1999) Glycobiology 9, 1397-1406; 及び、Colley, K., 他、(1992) J.Biol.Chem. 267, 7784-7793)。COS細胞にラットST6Gal Iと、ヒトBACE1cDNAまたはベクターのみを同時にトランスフェクションした。 [35 S] Express protei

n labeling mix (100 μ Ci/ml) を用いて、細胞をメチオニン及びシステインを含まないDMEM中で1時間標識し、4mlのDMEM/10%FBS中で3時間追跡した。細胞を免疫沈降緩衝液(50mM Tris $\cdot$ HCl、pH7.5/150mM NaCl/5mM EDTA/0.5% NonidetP-40/0.1% SDS)中で溶解した。発現タンパク質の免疫沈降は既報の通り行った(Colley, K., 他、(1992) J.Biol.Chem. 267, 7784-7793)。免疫沈降したタンパク質を5分間煮沸することにより5% β -メルカプトエタノールを含むLaemml

iサンプル緩衝液中で変性した。免疫沈降したタンパク質を5~20%勾配SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分析し(Laemml, U.K. (1970) Nature(London) 227, 680-685)、放射標識したタンパク質をBAS2000放射イメージ分析器(富士)を用いて可視化した。3回の独立した実験の平均値として取得した分泌の百分率を、全ST6Gal I放射活性(培地+細胞)に対する培地中の可溶性ST6Gal Iの放射活性の比率として定義した。

【0034】競合実験のために、COS細胞に、ST6Gal I-pSVLと、APPSw、C99、または対照pcDNA3.1ベクターの何れか

れかとを同時にトランスフェクションし、1時間標識し、6時間追跡した。細胞溶解物及び培地の両方からのST6Gal I免疫沈降物を上記の通り分析した。

【0035】6. ウェスタンブロッティング
APP及びAPPS β の検出のために、APPを一過的に発現するCOS細胞の細胞溶解物及び培地をトランスフェクションの24時間後に回収した。APPS β を培地からヘパリン-アガロース(Pierce)を用いて沈降させた。APP検出のためにAPPS β および細胞溶解物(20 μ gのタンパク質)をLaemml試料緩衝液(Laemml, U.K. (1970) Nature(London) 227, 680-685)中に取り、4~20%勾配SDS/PAGEに付し、ニトロセルロース膜に移した。ブロットした膜を、APP及びAPPS β のために抗体6E10(1:500)及び β NL(1:1000)と一緒にインキュベートし、適当な二次抗体、ホースラディッシュペルオキシダーゼヤギ抗マウス又はウサギIgG(Cappel)とインキュベートし、化学発光基質(Pierce)を用いて可視化した。

【0036】可溶性の分泌ST6Gal Iの分析のために、COS細胞に、ラットST6Gal I FLAG-pSVLと、ヒトBACE-pcDNA3.1 cDNAまたは対照pcDNAベクター単独とを同時にトランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後に、培地中の可溶性分泌型ST6Gal I FLAGをM2アガロース(Sigma)を用いて沈降させ、E41ポリクローナル抗体(1:500)を用いて免疫ブロットすることにより分析した。

【0037】7. Sambucus nigra (SNA) レクチンブロッティング
マイクロソーム画分を、BACE1を安定に発現するHEK293細胞またはその親株から調製し、等量のタンパク質(S

NAレクチン染色のために10又は40 μ g)を4~20%勾配のSDS-PAGEに付し、ニトロセルロース膜に移した。ブロットした膜を1%BSAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)と一緒にインキュベートし、10 μ g/mlのSNA-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(EY Laboratories)とインキュベートし、化学発光基質を用いて可視化した。20 μ gの各マイクロソーム画分も4~20%勾配SDS-PAGEに付し、クーマシー(Wako Biochemicals)で染色した。

【0038】8. インビトロBACEアッセイ
BACE1-FcおよびプロテインA-ST6Gal Iタンパク質を、これらのタンパク質を一過的に発現するCOS細胞の培養培地20mlから、それらを各々20 μ lのプロテインA-セファロースおよびIgG-セファロース(PBS中の50%懸濁物)に吸着させることによって精製した。反応混合物には、50mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)、1 μ lのBACE-FcおよびプロテインA-ST6Gal I調製物およびセファロースビーズと会合する混入プロテアーゼのためのプロテアーゼ阻害剤[Complete(Roche)]、10 μ Mのペプスタイン/1 μ Mのロイペプシン/1mg/mlのペプスタチン/2 μ Mアマスタチンを含み、30又は100nMの β -セクレターゼ阻害剤(Bachem)を含むものと含まないものを用いた。混合物を回転しながら0分間または30分間37°Cでインキュベートした。反応を停止し、抗ST6Gal I抗体を用いたイムノブロットにより生成物を分析した。

【0039】(B) 結果
ゴルジ体グリコシルトランスフェラーゼの切断分泌の分子機構を理解するためのモデルタンパク質としてST6Gal Iを調べた。細胞由来の可溶性分泌ST6Gal IはGlu-41で開始することから(図1A: Kitazume-Kawaguchi, 他、(1999) Glycobiology 9, 1397-1406)、Leu-37からGlu-41の領域におけるアミノ酸置換がST6Gal I分泌に及ぼす影響を調べた。COS細胞に、一連の変異体のST6Gal I cDNAを一過的にトランスフェクションし、代謝的に標識し、追跡した。細胞溶解物および培地からの免疫沈降したST6Gal Iタンパク質を分析した(図1BおよびC)。Lys-40からAlaまたはLeuへの置換により、ST6Gal Iの分泌は著しく減少した。ST_{K40A}分泌の量は、ST_{K40L}(置換されたアミノ酸は疎水性で傘高い)の量よりも少なかった。Leu-37をAlaに置換した場合も、ST6Gal Iの分泌は減少した。Gln-38またはGlu-41を置換しても、ST6Gal Iの分泌にはわずかな影響しかなかった。上記の通り、1個のアミノ酸置換によりST6Gal Iの分泌は実質的に減少し、切断および分泌に関与する1以上のプロテアーゼは配列特異的であることが示唆される。BACE1は、各種の細胞のゴルジ体で発現する配列特異的プロテアーゼ(Citron, M., 他、(1995) Neuron 14, 661-670)である(Vassar, R., 他、(1999) Science 286, 735-741)。従って、BACE1がST6Gal Iの切断に関与するかどうかを調べ

た。

【0040】初めに、ST6Gal IがBACE1と一緒に細胞内で局在するかどうかを調べた。ST6Gal Iを安定に発現するHEK293細胞に、BACE1タンパク質のCOOH末端に融合させたmycエピトープのタグつきBACE1 (BACE1-myc) のcDNAを一過的にトランスフェクションした。細胞を抗mycエピトープおよび抗ST6Gal I抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。ST6Gal Iは既報の通り (Colley, K., 他、(1992) J.Biol.Chem. 267, 7784-7793) ゴルジ体に局在していた (図2)。BACE1-mycは10 ゴルジ体にST6Gal Iと一緒に局在しており、BACE1は共通の細胞成分内でST6Gal Iに対して作用できることが示唆される。BACE1-myc染色はエンドソーム内にも存在する (Vassar, R., 他、(1999) Science 286, 735-741)。

【0041】次に、ST6Gal Iの分泌に対するBACE1の過剰発現の影響を分析した。BACE1をST6Gal Iと一緒にCOS細胞中に一過的に発現させた場合、ST6Gal Iの分泌 (22%の分泌) は、対照実験 (6.8%の分泌) と比較して有意に増加した (図3A)。この結果は、BACE1の過剰発現がST6Gal Iの分泌を誘導することを示す。keyhole limpetヘモシアニンと結合した合成ペプチドEFQMPPKCを免疫することによって、可溶性ST6Gal IのN末端を特異的に認識するポリクローナル抗体E41を作製した。BACE1をCOS細胞中でST6Gal Iと一緒に同時発現させた場合、抗体E41で検出される可溶性ST6Gal Iは有意に増加した (図3B) (Saido, T.C., 他、(1995) Neuro n 14, 457-466)。次に、BACE1の好ましい基質であるAPPswが内因性プロテアーゼによる分泌に関してST6Gal Iと競合するかどうかを調べた。APPswのcDNAを30 ST6Gal Iと一緒に同時トランスフェクションすると、Aβの生成を伴ってST6Gal Iの分泌は減少した (23%; 図3C)。一方、C99cDNA又はベクターと一緒に同時トランスフェクションした場合、ST6Gal Iの分泌には影響しなかった (C99については66%で、ベクターについては63%)。この結果は、過剰発現させたAPPswのβ切断はST6Gal Iプロセッシングと競合することを示す。従って、BACE1は細胞内でのST6Gal Iの切断と分泌に関与していることが判明した。

【0042】ST6Gal IがインビトロでBACE1の基質であることを実証するために、精製したBACE1-Fc (Vassar, R., 他、(1999) Science 286, 735-741) を、精製したST6Gal I (膜通過ドメインを欠くが、代わりにシグナルペプチドとプロテインAを含む) (プロテインA-ST6Gal I) (Kitazume-Kawaguchi, 他、(2001) J.Biol.Chem. 276, 15696-15703) と一緒にインキュベートした。図4A及びBに示す通り、精製したBACE1-Fcは、プロテインA-ST6Gal Iを切断して、プロテインA部分を除去し、49kDaの可溶性ST6Gal Iが生成し、このサイズは細胞内での可溶性の分泌型のサイズと同じであった (Boss*50

*hart, H., 他、(1992) Eur.J.Biochem.208, 341-349)。BACE1阻害剤であるKTEEISEVN (Sta) VAEF (Leuが、APPアナログペプチドのP1部分についてスタチンに置換されている) は、ST6Gal I切断に対して阻害的であった。このスタチンペプチドは用量依存的な阻害を示した: 20及び50%阻害が、30及び100nMの濃度で見られた。BACE1はST6Gal Iを切断して細胞から分泌させるので、BACE1の過剰発現は、細胞のST6Gal Iの量だけでなく、細胞内のα2, 6-シアル化も減少させることができる。実際、シアリルα2, 6ガラクトース残基の糖鎖構造を特異的に認識するSNAレクチンで染色したプロットから判断して、BACE1を安定に過剰発現するHEK293細胞は、親株と比較してシアリルα2, 6ガラクトース残基の量が減少している (図3D)。以上の結果から、BACE1は、細胞内及びインビトロの両方でST6Gal Iを切断していることが分かった。

【0043】

【発明の効果】本発明により、シアル酸転移酵素がBACE1によって切断を受け、細胞外に分泌されることが判明した。また、本発明により分泌型シアル酸転移酵素を特異的に認識する抗体が作製され、BACE1によるシアル酸転移酵素の切断および分泌を定量的にモニターすることが可能になった。アルツハイマー病治療薬としてBACE1阻害剤を開発する場合、BACE1の生理的機能であるシアル酸転移酵素の切断および分泌を阻害しない物質を選択することが好ましい。本発明の抗体を利用することにより、BACE1の生理的機能であるシアル酸転移酵素の切断および分泌の阻害を定量的に評価することができるので、より安全な副作用の少ないアルツハイマー病治療薬を開発することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ST6Gal Iの切断・分泌は配列特異的であることを示す。(A)は、ラットST6Gal Iおよびその可溶性分泌型の構造を示す。(B)では、QuickChange system (Stratagene) を用いて所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発を行った。PSVL発現ベクター中で野生型又は変異体のST6Gal Iを一過的に発現するCOS細胞をパルス標識し、6時間追跡し、抗ST6Gal I抗体を用いて免疫沈降分析した (C: 細胞溶解物、M: 培地)。(C)では、分泌の百分率 (平均±SD, n=3) を、全ST6Gal I放射性 (培地+細胞) に対する培地中の可溶性ST6Gal Iの放射活性の比率として定義した。有意差は矢印で示す (p<0.05)。

【図2】図2は、HEK293細胞におけるST6Gal IおよびBACE1-mycの細胞内局在を示す。ST6Gal Iを安定に発現するHEK293細胞にBACE1-mycのcDNAをトランスフェクションした。細胞を抗myc及び抗ST6Gal I抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。上段の図は、抗myc免疫染色 (赤色) を示し、中段の図は、抗ST6Gal I免疫染色 (緑色) を示し、下段の図は、mycとST6Gal Iの免

疫染色を重ね合わせたものを示す。局在した染色は黄色に見える。バーは20 μmを示す。

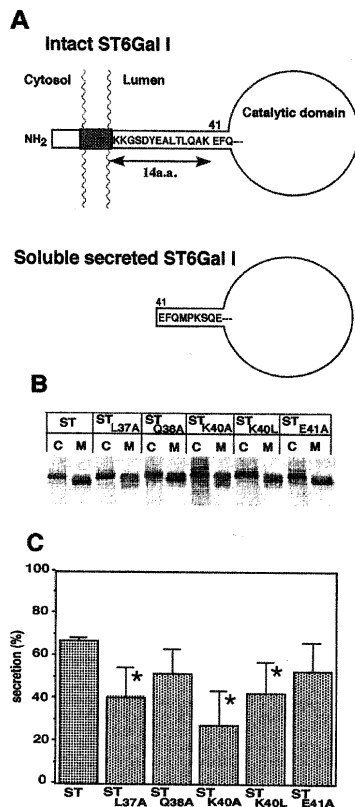
【図3】図3は、ST6Gal I分泌におけるBACE1の関与を示す。(A)では、pSVLベクター中のラットST6Gal Iと、ヒトBACE1またはベクター単独を発現するCOS細胞をパルス標識し、3時間追跡して、抗ST6Gal I抗体を用いて免疫沈降分析した(C:細胞溶解物、M:培地)。分泌の百分率(平均±SD、n=3)は、全ST6Gal I放射活性(培地+細胞)に対する培地中の可溶性ST6Gal Iの放射活性の比率として定義した。(B)では、COS細胞に、ST6Gal I FLAG-pSVLと、ヒトBACE1またはベクターを一過的にトランスフェクションした。発現の24時間後、培地中の可溶性ST6Gal I FLAGをM2アガロースで沈降させ、E41抗体を用いて検出した。(C)では、ST6Gal Iと、APPsw、C99又は対照pcDNA3.1とを発現するCOS細胞をパルス標識し、6時間追跡し、(A)に示す通り分析した。2回の独立した実験の平均をとった分泌の百分率は、全ST6Gal I放射活性(培地+細胞)に対する培地中の可溶性ST6Gal Iの放射活性の比率として定義した。APPおよびAPPs βは各々6E10及びβN20 L抗体を用いて検出した。(D)では、マイクロソーム画分を、BACE1を安定に発現するHEK293細胞またはその親株から調製し、等量のタンパク質を用いて、Siaα

*2, 6Galオリゴ糖構造を認識するSNAレクチンを用いて染色した。SNAレクチン染色では、レーン1及び2では40 μgのタンパク質を使用し、レーン3および4では10 μgのタンパク質を使用し、クーマシー染色では20 μgを使用した。

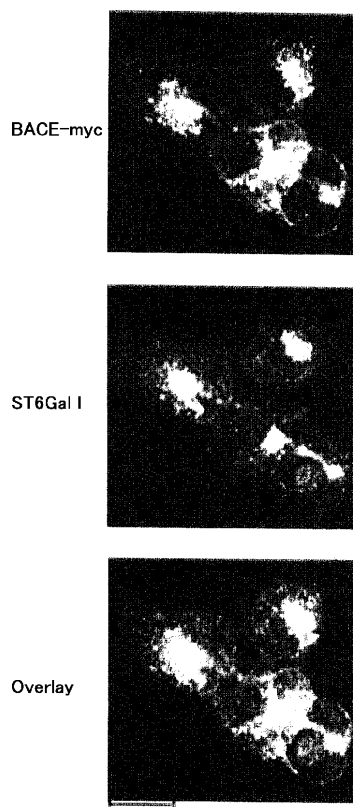
【図4】図4は、精製したBACE1-FcがプロテインA-ST6Gal Iをインビトロで切断することを示す。(A)では、BACE1-FcとプロテインA-ST6Gal Iタンパク質の両方をそれぞれ、これらのタンパク質を発現するCOS細胞の培養培地をプロテインA-セファロース及びIgG-セファロースに吸着させることによって精製した。BACE1-Fc及びプロテインA-ST6Gal I、及びセファロースビーズに付着して混入している可能性があるプロテアーゼのためのプロテアーゼ阻害剤を含む反応混合物を、100 nMのBACE阻害剤(I)の存在下又は非存在下において37℃で回転しながら0又は30分間インキュベートした。反応を停止し、抗ST6Gal I抗体で免疫ブロットすることによって分析した。実験は4回繰り返し、各結果を(A)に示す。(B)は精製したBACE1-Fcの銀染色ゲルを示す。

【図5】図5は、E41抗体の反応特異性を確認した結果を示す。

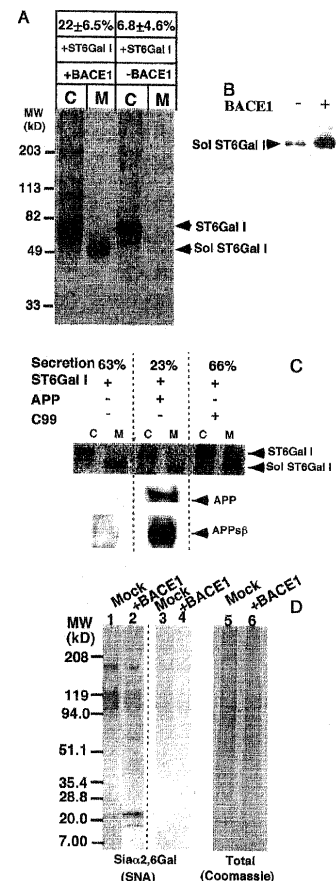
【図1】



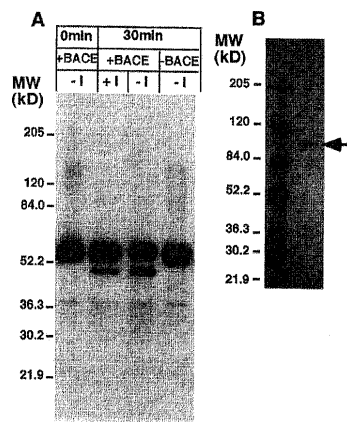
【図2】



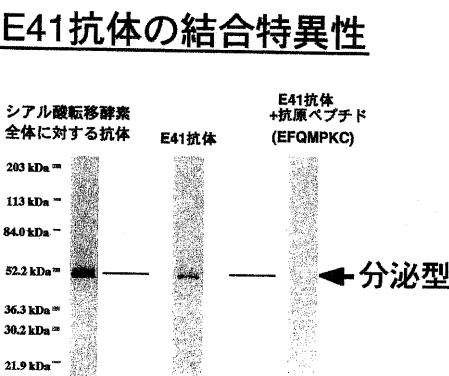
【図3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 Q	1/34	C 1 2 Q	1/34
	1/48		1/48
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/15
	33/50		33/50
	33/53		33/53
			Z
			Z
			D
(72)発明者	立田 由里子	F ターム (参考)	2G045 BB24 BB41 BB50 BB51 CB01
	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所		FA16 FB01 FB03 FB07 FB12
	内		FB13 GC15
(72)発明者	岡 律子		4B050 CC10 LL03 LL10
	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所		4B063 QA01 QA20 QQ95 QR06 QR10
	内		QR77 QS28 QX01
(72)発明者	橋本 康弘		4B064 AG01 AG27 CA21 CB06 DA01
	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所		DA13 DA20
	内		4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	识别唾液酸转移酶的切割位点的抗体和使用其的筛选方法		
公开(公告)号	JP2003334071A	公开(公告)日	2003-11-25
申请号	JP2002141438	申请日	2002-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	RIKEN		
[标]发明人	北爪しのぶ 西道隆臣 立田由里子 岡律子 橋本康弘		
发明人	北爪しのぶ 西道隆臣 立田由里子 岡律子 橋本康弘		
IPC分类号	G01N33/50 C07K16/40 C12N9/10 C12N9/14 C12N9/64 C12P21/06 C12Q1/34 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	C12N9/14.101 C07K16/40 C12N9/10.ZNA C12N9/64.Z C12P21/06 C12Q1/34 C12Q1/48 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/GC15 4B050/CC10 4B050/LL03 4B050/LL10 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ95 4B063/QR06 4B063/QR10 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA21 4B064/CB06 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA20 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为了研究BACE1是否作用于APP以外的其他底物，建立了一个能够测量BACE1切割APP以外的底物的活性，并进一步测量BACE1切割APP以外的底物的活性的系统。提供一种使用能够筛选和筛选副作用小的副作用的安全治疗药物的系统来评估测试物质的方法。裂解唾液酸转移酶的方法，其包括使β-分泌酶与唾液酸转移酶接触。

