

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02006/064819**

発行日 平成20年6月12日 (2008.6.12)

(43) 国際公開日 **平成18年6月22日 (2006.6.22)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 23/202 (2006.01)</b>	GO 1 N 23/202	2 G 0 0 1
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50 Z	2 G 0 4 5
<b>GO 1 N 33/15 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

出願番号	特願2006-548864 (P2006-548864)	(71) 出願人	504151365 大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 茨城県つくば市大穂1番地1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/022898	(71) 出願人	502285457 学校法人順天堂 東京都文京区本郷2-1-1
(22) 国際出願日	平成17年12月13日 (2005.12.13)	(71) 出願人	598067670 国立精神・神経センター総長 東京都小平市小川東町4-1-1
(31) 優先権主張番号	特願2004-361158 (P2004-361158)	(71) 出願人	503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(32) 優先日	平成16年12月14日 (2004.12.14)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中性子散乱法を用いたタンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法

## (57) 【要約】

本発明は、重水中に溶解又は分散した被検タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から被検タンパク質の形態を測定することを特徴とする、被検タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法に関する。

本発明によれば、タンパク質に対して無侵襲で自然なまま、水溶液中のタンパク質の形態変化を観察でき、その形態変化と疾患との関係を解明することができた。その結果、タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断及び医薬のスクリーニングが可能となった。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

重水中に溶解又は分散した被検タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から被検タンパク質の形態を測定することを特徴とする、被検タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法。

**【請求項 2】**

被検タンパク質の形態変化が、被検タンパク質の形状及び / 又は大きさの変化である請求項 1 記載の診断方法。

**【請求項 3】**

被検タンパク質が、生体由来の遺伝子を使用して合成されたもの又は生体から分離されたものである請求項 1 又は請求項 2 記載の診断方法。

10

**【請求項 4】**

被検物質で処理された対象タンパク質又は被検物質を投与された動物から分離された対象タンパク質を用いる医薬のスクリーニング方法であって、重水中に溶解又は分散した対象タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から対象タンパク質の形態を測定することを特徴とする、対象タンパク質の形態変化に起因する疾患の治療薬のスクリーニング方法。

**【請求項 5】**

対象タンパク質の形態変化が、対象タンパク質の形状及び / 又は大きさの変化である請求項 4 記載のスクリーニング方法。

20

**【請求項 6】**

対象タンパク質が、生体由来の遺伝子を使用して合成されたもの又は生体から分離されたものである請求項 4 又は 5 記載のスクリーニング方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、生体中に存在するタンパク質の形態変化を、タンパク質に対して無侵襲で自然なまま観察することにより、タンパク質の形態変化に起因する疾患を診断する方法及び医薬のスクリーニング方法に関する。

**【背景技術】**

30

**【0002】**

近年、パーキンソン病を初めとして、アルツハイマー病など多くの脳疾患に微小管結合タンパク質タウやシヌクレインの代謝異常や構造異常によるタンパク質の線維化や、細胞内の不要なタンパク質の分解系に関するプロテオゾームシステムに関するユビキチンの細胞内リサイクルシステムを司るUCH-L1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) の遺伝子異常に起因するタンパク質凝集体形成と神経原線維細胞変性、細胞死が深く関わっていることが分かってきた。従って、生体中におけるタンパク質の線維化、凝集体形成等の形態変化は、種々の疾患の原因、進展、治癒過程等に深く関与していると考えられている。

**【0003】**

40

従来のタンパク質の構造解析に関しては、結晶化したタンパク質の構造を解析しようとする技術が種々開発されているが、この技術によって生体中のタンパク質の実質的な形態変化(例、自己集合によるオリゴマー形成等)を予測することは大変困難である。そこで、水溶液中でナノレベルのタンパク質構造を解析する技術がいくつか開発されている。このうち、X線小角散乱法によれば、タンパク質の水溶液構造を観察することが可能であるが、特に水中でのX線照射によるタンパク質の損傷は免れ得ず、ラジカル生成・重合反応による分子間共有結合形成が生じる。従って、この方法は、分子間相互作用による複合体構造の解析には不向きである。核磁気共鳴法(NMR)によれば、分子量が3万程度までの単一タンパク質分子であれば、解析が可能であるが、それ以上の分子量を有するタンパク質や複合体を形成すると、 $^{13}\text{C}$ や $^{15}\text{N}$ 等の同位元素を用いて特殊な分子修飾を行わ

50

ないと解析が困難である。また、原子間力顕微鏡 ( A F M ) は、タンパク質を水中でマイカ表面に吸着させ、マイクロプローブでタンパク質表面を走査し、その形状を観察する手法であるが、タンパク質を基盤表面に固定するため、化学修飾が必要となるという問題がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

従って、本発明は、タンパク質に対して無侵襲で自然なまま、水溶液中のタンパク質の形態変化を観察し、その形態変化と疾患との関係を解明し、当該手段を用いた診断方法及び医薬のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

そこで本発明者は、中性子小角散乱法を用いて水溶液中のタンパク質を観察してきたところ、重水中のタンパク質に冷中性子を照射すれば水溶液中でタンパク質に何ら化学修飾や力学的作用を及ぼさずに、無侵襲で自然なままタンパク質構造が観察でき、かつ正常なタンパク質と異常なタンパク質の水溶液中での形態と、疾患との間に相関性があること、さらにこの結果を用いれば医薬のスクリーニングもできることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 6 】

すなわち、本発明は、重水中に溶解又は分散した被検タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から被検タンパク質の形態を測定することを特徴とする、被検タンパク質の形態変化に起因する疾患の診断方法を提供するものである。

20

また、本発明は、被検物質で処理された対象タンパク質又は被検物質を投与された動物から分離された対象タンパク質を用いる医薬のスクリーニング方法であって、重水中に溶解又は分散した対象タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から対象タンパク質の形態を測定することを特徴とする、対象タンパク質の形態変化に起因する疾患の治療薬のスクリーニング方法を提供するものである。

【発明の効果】

【 0 0 0 7 】

本発明方法によれば、生体中に存在する状態と同様である、水溶液中でのタンパク質の構造、形態変化が無侵襲で自然なまま観察できるため、真に生体中で起こっているタンパク質の形態変化と疾患との関係が観察できることになり、種々の疾患の初期状態、進展状態、治癒過程等が正確に診断でき、かつ医薬がスクリーニングできる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 8 】

【図 1】中性子小角散乱による重水溶媒中の蛋白質構造の観察方法の概念図である。

【図 2】コア、シェル型のタンパク質構造の散乱ベクトル  $q$  と散乱強度  $I(q)$  を求める場合の理論式である。

【図 3】正常型 UCH-L1 の結晶構造を示す図である。(UCH-L1 と同様に hydrophilase 活性 (50% のアミノ酸配列が一致する) を有し、生体に広く分布している UCH-L3 の結晶構造解析データから SWISS-MODEL によって解析)

40

【図 4】球状タンパク質 UCH-L1 の単量体、二量体からの理論曲線と、実際の正常型 UCH-L1 の測定結果を示す図である。 $I_e(q)$ ; 測定 ( )、 $I_c(q)$ ; 理論曲線、(---)、モノマー; (---)、ダイマー。

【図 5】UCH-L1 回転楕円体とした場合の理論曲線である。a. 球状の単量体の短径  $a$  を徐々に変化させた回転円盤体 (短径;  $a$ 、長径;  $b$ 、( $=c$ )) の理論曲線、b. 球状の二量体の短径  $a$  を徐々に変化させた回転円盤体 (短径;  $a$ 、長径;  $b$ 、( $=c$ )) の理論曲線、c. 球状の二量体の短径  $a$ 、( $=b$ ) を徐々に変化させた紡錘体 (短径;  $a$ 、( $=b$ )、長径;  $c$ ) の理論曲線である。

【図 6】正常型 UCH-L1 及びアミノ酸置換体の中性子散乱曲線及び理論曲線によるフ

50

イッティングを示す図である。a. 正常型 UCH-L1、 $I_e(q)$ ; 測定 ( )、 $I_c(q)$ ; 理論曲線、(---)、モノマー (a, 29, b, (=c), 52); (---)、ダイマー、b. I93M 置換、 $I_e(q)$ ; 測定 ( )、 $I_c(q)$ ; 理論曲線、(---)、モノマー (a, 20, b, (=c), 62); (---)、ダイマー、c. S18Y 置換、 $I_e(q)$ ; 測定 ( )、 $I_c(q)$ ; 理論曲線、(---)、モノマー (a, 43, b, (=c), 43); (---)、ダイマー、d. I93M + S18Y 置換、 $I_e(q)$ ; 測定 ( )、 $I_c(q)$ ; 理論曲線、(---)、モノマー (a, 31, b, (=c), 50); (---)、ダイマー。

【図7】正常型 UCH-L1 及びアミノ酸置換体の円二色性測定による二次構造変化を示す図である。

【図8】正常型 UCH-L1 及びアミノ酸置換による形態変化と機能変化を示す図である。

【図9】微小管結合タンパク質タウの単分子 (自己集合により球状クラスター形成) 構造、及び、SS 結合形成による線維化を示す図である。線維化タウ ( ) ; SS 結合還元・切断によるタウの自己集合体 ( )。比較として、黒の実線にタウと同等の分子量を有する球状タンパク質からの理論的散乱曲線を示した。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の診断方法においては、被検タンパク質を重水中に溶解又は分散して用いる。生体中においてタンパク質は、細胞中又は体液中に溶解して存在している。従って、本発明においては、生体中において、そのタンパク質が存在している自然な状態の形態を観察することができる。ここで被検タンパク質としては、種々の疾患に関与していると考えられるすべてのタンパク質、例えば酵素、膜タンパク質、受容体タンパク質、構造蛋白質等が挙げられる。より具体的な例としては、UCH-L1、微小管結合タンパク質タウ等を挙げることができる。

【0010】

これらのタンパク質としては、生体から分離されたタンパク質でもよいし、生体由来の遺伝子を使用して合成されたタンパク質でもよい。遺伝子を使用したタンパク質の合成には、当該遺伝子の構造さえ判明していれば、公知の手法により行うことができる。

【0011】

重水中のタンパク質濃度は、特に限定されないが、 $10 \mu\text{M}$  以上あれば十分である。好ましくは  $10 \mu\text{M} \sim 100 \text{mM}$ 、より好ましくは  $10 \mu\text{M} \sim 10 \text{mM}$  である。

【0012】

冷中性子は、公知の手段により中性子から変換させることができる。すなわち、加速器によって加速された陽子等の粒子線を重元素 (例えば、ウラン、タンゲステン、水銀 etc) からなるターゲットにあて、原子核の分裂的崩壊を起こさせ、パルス中性子を得、これを減速材 (液体水素、液体重水素、固体メタン等) で冷却することにより得られる。同様に原子炉からウランの崩壊に伴い発生する中性子も同様な方法で冷中性子に変化できる (新高分子実験学6 高分子構造(2) 散乱実験と形態観察、p282 高分子学会編 共立出版株式会社参照)。ここで冷中性子の波長は、およそ  $0.5 \sim 1.5 \text{nm}$  前後である。

【0013】

当該冷中性子は、タンパク質の原子核に照射しても、散乱するだけで原子核を破碎しないためタンパク質へのダメージは殆どない。冷中性子の原子に対する散乱能は、原子の散乱長密度によって決まる。特に、重水素 ( $^2\text{H}$ , deuterium; D) は大きな正の散乱長を有するのに対し、軽水素 ( $^1\text{H}$ ) のそれは負である。このことを利用すると、冷中性子は相対的に、タンパク質中の水素原子 ( $^1\text{H}$ ) に散乱されやすく、溶媒である重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) に吸収されやすい性質を有している。従って、重水中にタンパク質を溶解、分散すると、大きなコントラストが生じ、タンパク質構造が観察できる (中性子小角散乱法)。その解析範囲は、数 からサブミクロンに及ぶ。この概念図を図1に示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 4 】

ここで、中性子小角散乱法について説明する。生成した冷中性子はスリット系の中性子導管を通じて、試料に照射させる。試料から生じた散乱光の検出は、二次元検出器が用いられる。測定したい $q$ （運動量変化）範囲に応じて真空チャンパー中を移動してカメラ長を任意に変えることができる。カメラ長に応じてスリット部のコリメーションも調整する必要があるが、この機構により、広い $q$ 範囲で精度良いデータを得ることができる。異なるカメラ長、すなわち $q$ 範囲で測定を行い、それらを重ね合わせて1本の合成曲線にすることもできる。セル部分は、温度制御やサンプルチェンジャーなどが組み込めるような工夫をするのが好ましい。高温や低温、高圧などの特殊セルユニットも用いることができる。

## 【 0 0 1 5 】

試料セルとしては、角型又は太鼓型の石英製の容器を用いるのが普通である。中性子線は、ホウ素フリーの石英ガラスをほとんど吸収されることなく透過するので、セル容器壁の厚さは1mm程度の扱いやすいセルを使用できる。100%  $D_2O$ で1~10mmとするのが普通である。セル厚が薄いほど散乱は弱く、長時間の積算を要する。セルは超音波洗浄などで十分に清浄にするのが望ましい。

## 【 0 0 1 6 】

散乱光の測定は、散乱測定と別個に透過率（transmittance）の測定を行い、その値を用いてセル及び溶媒などによるバックグラウンド散乱を差引くことにより行うのが好ましい。組成が既知であれば計算で差引くこともできるが、十分に広角側まで測定し、このバックグラウンドを実験的に求め差引くことが好ましい。中性子小角散乱法ではポイントビームを用いるので、通常デスマアの必要はない。等方性試料の場合は、二次元検出器で得られた二次元データのサーキュラーアベレージをとり、一次元データに変換する処理をコンピューターで行う。

## 【 0 0 1 7 】

散乱光のコンピューター処理により、タンパク質の形態が観察できるので、この形態の変化、例えば形状及び/又は大きさの変化を観察することにより、疾患の診断ができる。診断に用いる解析方法とは、表1、2、3に示すように様々なタンパク質の形状を予測して、散乱ベクトル、 $q = (4 / \lambda) \sin \theta$  と散乱強度を計算し、どの形状が最も実験値に相応しいか解析できる。

## 【 0 0 1 8 】

## 【表1】

タンパク質の形状変化に伴う散乱ベクトル $q$ と散乱強度  $I(q)$ の関係

球（半径 $R$ ）

$$I(q) = \Phi^2(q) = \left[ \frac{3(\sin x - x \cos x)}{x^3} \right]^2, \quad x = qR$$

楕円( $a, a, \nu a$ )

$$I(q) = \int_0^{x/2} \Phi^2(qa\sqrt{\cos^2\theta + \nu^2\sin^2\theta}) \cos\theta d\theta$$

円柱(半径 $R$ , 高さ $2H$ )

$$I(q) = \int_0^{x/2} \frac{\sin^2(qH \cos\theta)}{q^2 H^2 \cos^2\theta} \frac{4J_1^2(qR \sin\theta)}{q^2 R^2 \sin^2\theta} \sin\theta d\theta$$

ガウスコイル

$$I(q) = 2 \left( \frac{e^{-x} + x - 1}{x^2} \right), \quad x = q^2 \langle R^2 \rangle$$

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

【 表 2 】

---

 様々な高分子からの散乱理論式と回転半径(S)
 

---

細くて長い棒 (針) (長さ L,  $x=Lq/2$ ) <sup>(1)</sup>

$$\langle S^2 \rangle = \frac{L^2}{12}$$

$$I(q) = \frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin 2}{2} d2 - \left( \frac{\sin x}{x} \right)^2 = 1 - \frac{1}{9}x^2 + \frac{2}{225}x^4 - \frac{6}{2205}x^6 + \frac{2}{127575}x^8 - \dots$$

ガウスコイル <sup>(2)</sup>

$$\langle S^2 \rangle = nb^2 / 6 \equiv \langle S^2 \rangle_{\text{linear}}$$

$$I(q) = \frac{2}{x^2} (e^{-x} - 1 + x), \quad x = \langle S^2 \rangle^{1/2} : \text{Debye Function}$$

$$I(q) = \frac{1}{1 + q^2 \langle S^2 \rangle / 2}, \quad (\text{Approx, error} < 15\%)$$

f 本のガウス鎖からなる星型高分子 <sup>(3)</sup>

$$\langle S^2 \rangle_{\text{star}} = \frac{3f-2}{f^2} \langle S^2 \rangle_{\text{linear}}$$

$$I(q) = \frac{2}{fF} \left( F - (1 - \exp(-F)) + \frac{f-1}{2} (1 - \exp(-F))^2 \right)$$

$$F = \frac{f}{3f-2} x, \quad x = q^2 \langle S^2 \rangle = q^2 nb^2 / 6$$

ランダム f 分岐高分子 <sup>(4)</sup>

$$I(q) = \frac{1}{1 + \frac{x}{3}}, \quad x = q^2 \langle S^2 \rangle = q^2 nb^2 / 6$$

楕形高分子, 枝 f 本 (重合度  $D_p = n_b$ ), 主鎖重合度  $N_0$ . <sup>(5)</sup>

$$I(q) = \frac{2}{x^2} \left\{ x - (1 - e^{-s\lambda}) + (1 - e^{-x(1-\lambda)/f}) \left[ f - \frac{2(1 - e^{-x\lambda})}{x\lambda 1 f} \right] + (1 - e^{-s(1-\lambda)/f})^2 \left[ \frac{x\lambda - (1 - e^{-x\lambda})}{x^2 \lambda^2 / f(f-1)} \right] \right\}$$

$$\lambda = \frac{N_0}{N} = \frac{N_0}{N_0 + fn_b}, \quad x = q^2 \langle S^2 \rangle = q^2 nb^2 / 6$$

環状高分子, ( $\nu = \sqrt{\lambda}(u-1/2)$ ,  $\lambda = q^2 nb^2 / 6$ ), <sup>(6)</sup>

$$\langle S^2 \rangle_{\text{Ring}} = \frac{nb^2}{12} = \frac{1}{2} \langle S^2 \rangle_{\text{linear}}$$

$$I(q) = \frac{2}{\sqrt{\lambda}} \exp - \frac{\lambda}{4} \int_0^{\sqrt{2}} \exp(\nu^2) d\nu$$

【 0 0 2 0 】

10

20

30

40

## 【表 3】

良溶媒中の排除体積効果を伴う非ガウス鎖<sup>(7)</sup>

$$I(q)^{-1} = \frac{(1+\varepsilon)(1+5\varepsilon/6 + \varepsilon^2/6)^{1/(1+\varepsilon)} x^{1/(1+\varepsilon)}}{2\Gamma\{1/(1+\varepsilon)\}} + \frac{(1+\varepsilon)\Gamma\{2/(1+\varepsilon)\}}{2\Gamma^2\{1/(1+\varepsilon)\}}$$

$\varepsilon$  : non - Gaussian parameter

半屈曲性高分子(Kratky-Porod Chain)

10

$$\langle S^2 \rangle = \frac{bL}{6} \left[ 1 - \frac{3}{2n} + \frac{3}{2n^2} - \frac{3}{2n^3} (1 - e^{-2n}) \right] \text{ (Benoit Doty, 1953)}$$

$$\text{End-to-End Distance : } \langle R^2 \rangle = \frac{L}{\lambda} - \frac{1}{2\lambda^2} (1 - e^{-2\lambda L})$$

$L$  : contour length,  $\lambda^{-1}$  : stiffness parameter

Kuhn Segment Length  $A_k = \lim(\langle R^2 \rangle / L) = b = 2Lp, \leq \lambda^{-1}$

20

$$I(q) = \frac{2(e^{-x} + x - 1)}{x^2} + \left[ \frac{4}{15} + \frac{7}{15x} - \left( \frac{11}{15} + \frac{7}{15x} \right) e^{-x} \right] \left( \frac{b}{L} \right), \quad x = \frac{Lbq^2}{6}$$

(Sharp and Bloomfield, 1968)

where  $L = bn$  : conlour length,  $b$  : length of the statistical chain element

30

## 【 0 0 2 1 】

(1) 松岡秀樹「コロイド、ミセル、高分子溶液への応用」日本結晶学会誌、41、269(1999)。

(2) J. S. Higgins, H. G. Benoit, "Polymer and Neutron Scattering", Oxford, (1994)。

(3) O. Kratky, O. Glatter, ed. "Small-angle X-ray Scattering", Chap. 12, Academic 1982。

(4) T. Neugebauer, Ann. Phys., 42, 509(1943)。

(5) P. Debye, J. Phys. Colloid Chem., 51, 18(1948)。

40

(6) H. Benoit, J. Polym. Sci., 11, 507(1953)。

(7) K. Kajiwara, W. Burchard, M. Gordon, Br. Polym. J., 2, 110(1970)。

その他の参考文献

E. F. Casassa, G. C. Berry, J. Polym. Sci., A-2, 4, 881(1966)。

E. F. Casassa, J. Polym. Sci., A. 3, 605(1965)。

O. B. Ptitsyn, Zhurnal Fizicheskoi Khimii, 31. 1091(1957)。

A. Peterlin, J. Chem. Phys., 23, 2464(1955)。

50

## 【0022】

また、散乱ベクトル、 $q$ 、が大きい領域 ( $q \sim 1/R_g$ 、 $R_g$  は重心回転半径) ではギニエの法則 (参考文献: A. Guinier, G. Fournet, Small Angle Scattering of X-rays, Wiley, New York, 1955.) によれば、散乱ベクトル  $q$  と散乱強度  $I(q)$  の関係は、 $I(q) = I(0) \exp(-1/3 R_g^2 q^2)$  と表すことができ、表4に示すような計算により、タンパク質の形状を推定することもできる。 $I(0)$  は  $q$  を0外挿して得られる値であり、散乱強度を絶対値換算すると、この値は分子量に依存する値となる (参考文献: Jacrot and Zaccari (Biopolymers, 20 (1981), 2413-2426))。

10

## 【0023】

## 【表4】

様々なタンパク質の重心回転半径  $R_g$  と形状パラメーターの関係

粒子の形状	形状パラメーター	関係式
球	半径 $R$	$R_g^2 = (3/5)R^2$
円柱	半径 $\gamma$ , 長さ $L$	$R_g^2 = (\gamma^2/2) + (L^2/12)$
回転楕円形	半径長 $a, a, \nu a$	$R_g^2 = a^2(2 + \nu^2)/5$
薄い円盤	半径 $R$	$R_g^2 = R^2/2$
細い棒状	長さ $L$	$R_g^2 = L^2/12$
直方体	$2a, 2b, 2c$	$R_g^2 = (a^2 + b^2 + c^2)/3$

20

## 【0024】

また、タンパク質の中心にコアを形成するような複雑なタンパク質構造についても、図2に示すような解析方法 (J. Marignan, P. Basserau, and P. Delord, J. Phys. Chem., 90, 645 (1986)) によって、形状パラメーターを求めることができる。

## 【0025】

一方、散乱ベクトル  $q$  が比較的大きな領域では、棒状のタンパク質で、散乱ベクトル  $q$  と断面の重心平均半径  $R_c$  との関係が、 $q^2 * R_c^2 < 1$  である時、すなわち、棒の太さに対応する散乱強度  $I(q)_{thin}$  が棒の長さ  $L$  に対して、 $L/q$  の関係のある時、 $\ln(I(q)) = K + (-1/2 * R_c^2 * q^2)$  となるため、 $\ln(I(q))$  と  $q^2$  でプロットして得られる直線の傾きより  $R_c$  を求めることができる。実際の断面半径  $R$  は、 $R = R_c^{1/2}$  から求めることができる (参考文献; H. Matsuoka et al., J. Colloid. Interface Sci., 118, 387 (1987))。

30

## 【0026】

ここでは、例えば、パーキンソン病の発症に関わるユビキチンリサイクル機能を有する、UCH-L1について、正常型 UCH-L1 タンパク質構造と、パーキンソン病危険増幅因子である UCH-L1 (I93M置換体) とパーキンソン病危険軽減因子である UCH-L1 (S18Y置換体) のヒト遺伝子から大腸菌を用いてタンパク質を合成・精製し、重水素中で構造を解析した。その結果、(1) UCH-L1 は、水中で二量体として存在する。(2) 二量体を形成する単量体の構造は各々異なっており、パーキンソン病危険増幅因子である UCH-L1 (I93M置換体) は正常型よりも楕円性が高く、一方、パーキンソン病危険軽減因子である UCH-L1 (S18Y置換体) は、楕円性が低く、ほぼ球状の二量体であることが判明した。タンパク質の球状性は円二色性計測によるタンパク質内部の  $\alpha$ -ターン (折り返し構造) の増加 (球状性増加) ・減少 (楕円性増加) によっても裏付けられる。

40

50



## 【0027】

ユビキチンリサイクル機能である加水分解活性はI93M < 正常型 < S18Yの順に高く、タンパク質の球状性 (globularity) とは病理学的にも一致することを初めて明らかにした。この手法を用いれば、タンパク質の遺伝子変異による水中での実質的な構造変化が判明するため、病理的な予知と診断が可能となる。

## 【0028】

正常な微小管結合タンパク質タウの水中での単分子構造と、脳疾患で見られるタウの線維構造 (病的状態) を *in vitro* で直接比較した例はない。中性子小角散乱法で、SS結合で部分的に架橋されたタウ分子は直径が360Åの線維状の長線維を形成するが、SS結合を完全に切断すると、タウは自発的により半径が350Åの球状クラスターを形成することが明らかになった。これにより、正常な状態から病的な状態に至るプロセスの解明が容易となり、細胞変性や細胞死を誘発する異常なタンパク質の線維化を抑制する医薬の開発が可能となる。

10

## 【0029】

また、被検物質で処理された対象タンパク質又は被検物質を投与された動物から分離された対象タンパク質を試料として、前記同様に中性子小角散乱法により形態を測定すれば、当該被検物質が医薬として有用か否かがスクリーニングできる。ここで、対象タンパク質は、前記被検タンパク質と同様に、合成されたものでも生体から分離されたものでもよい。

## 【0030】

本発明によれば、病因に関わるタンパク質を直接生体より抽出・精製するか、あるいは、脳のように直接タンパク質の抽出が困難な場合、クローニングした遺伝子からタンパク質を合成・精製した試料に対して本発明により直接タンパク質構造 (複合体) を観察し、正常型と比較することで、診断が実施できる。

20

## 【0031】

また、UCH-L1のような二量体形成タンパク質に対しては、遺伝子治療により、I93M変異型パーキンソン病患者にS18Y球状タンパク質を発現させ、酵素機能を回復させる可能性への道を開く、また、異常タンパク質の形状を正常に回復させ (球状化)、機能を回復させる薬剤のスクリーニング方法となる。また、タウのような異常なタンパク質会合・凝集に対する抑制剤のスクリーニングが可能となる。

30

## 【0032】

疾患患者から抽出した病的因子の候補となる種々のタンパク質と正常人から抽出された正常なタンパク質を比較し、どのタンパク質の形態が変化しているかを検査し、発症原因を明らかにすることができる。また、脳疾患のように被検タンパク質が直接抽出できない場合には、患者から抽出した遺伝子からタンパク質を合成し、正常なタンパク質と比較することにより診断を行うことができる。更には、正常なタンパク質であっても代謝異常によって線維化など、異常な高分子体が認められる疾患では、タンパク質が直接抽出されたものか、あるいは遺伝子から合成されたかに関わらず、正常なタンパク質に種々の処理、例えばリン酸化や酸化ストレスを負荷し、負荷前後の形態を比較すれば、どのような代謝過程の異常により正常なタンパク質が高分子化するかがわかり、発症原因を明らかにすることができる。また、さらにはこれらの知見に基づき、現状における治療方針の決定、遺伝子治療への展開、タンパク質の異常な会合や凝集を抑制する新規医薬スクリーニング方法への展開や、強いては疾患予防対策法を図ることが可能となる。

40

## 【0033】

本発明において、診断又はスクリーニングされる医薬の対象となる疾患は、タンパク質の形状や大きさの変化に起因する疾患であり、例えば脳内タンパク質であるシヌクレインの遺伝子異常が関連する家族性パーキンソン病、特発性パーキンソン病、ユビキチンリサイクル機能を有する、UCH-L1の遺伝子異常に関連する家族性パーキンソン病が挙げられる。また、Tauopathyと称される神経原線維変化型痴呆で、一般的なアルツハイマー病の他、タウ遺伝子の変異が認められる前頭側頭葉痴呆、老人斑が認められない

50

神経原線維優位痴呆がある。一方、電子顕微鏡で観察すると、周期が80nmで繰り返す構造を有する、タウのPHF (paired helical filament)が見られる疾患としては、遺伝性疾患や発達異常、炎症性疾患でも認められるが、常染色体劣性遺伝疾患では、Niemann-Pick type C等の代謝疾患、Hallervorden-Spatz症候群等の変性疾患、常染色体優性遺伝疾患では、筋ジストロフィー症、家族性プリオン病が揚げられる。また、亜急性硬化性全脳膜炎等の慢性疾患がある。家族性のPick病では、PHF (paired helical filament)の主用な構成要素である異常なタウ (three repeat tau)凝集体が見られる。正常なタウ (four repeat tau)でも、例えば進行性核上性麻痺や皮質基底核変性症では、その凝集体が認められている。更には、ポリグルタミンが蓄積する疾患としては、ハンチントン舞踏病やマシャド・ジョセフ病が挙げられる。本発明は、これらの脳疾患に制限されるものではなく、種々のタンパク質構造異常に起因する細胞死を伴う、癌やエイズ等のウイルス性疾患、感染症、代謝異常病、先天性疾患など生体の広範囲な領域に渡る様々な組織・細胞でのタンパク質構造異常の診断・治療・新薬スクリーニングにも応用できる。

10

#### 【実施例】

#### 【0034】

##### 実施例 1

中性子散乱法によるUCH-L1の遺伝子変異タンパク質の構造解析によるパーキンソン病の診断

20

ヒト正常型 UCH-L1 cDNA及び、これにI93M, S18Y, I93M+S18Yの変異を加えたcDNAを調製した。各々のcDNAを大腸菌用の発現ベクターpPROtetE233にサブクローニングし、大腸菌株DH5aPROへ導入した。得られた形質転換体をCircle Grow mediumでODが約0.5になるまで37で振とう培養し(約2時間)、最終濃度0.1mMになるようにイソプロピル-D-チオガラクトシド(IPTG)を加えた後、さらに6時間培養した。菌体を遠心操作(5000xg、20分、室温)により回収し、20mM HEPES、pH7.8に懸濁した。超音波破碎法により菌体を溶解し、Co<sup>2+</sup>-Sepharose (TALON purification kit, Clontech)を用いて、指示に従いUCH-L1を精製した。これを凍結乾燥し、-80で保存した(参考文献; K. Nishikawa, et. al., B.B.R.C., 304, 176-183 (2003))

30

#### 【0035】

濃度が0.86mg/mLとなるように重水を用いた緩衝液(最終的に、50mM HEPES pH7.8, 5mMジチオスレイトール(DTT))に溶解し、高エネルギー加速器研究機構に設置された中性子散乱装置(WINK、 $0.03 < q < 0.15$ )により中性子散乱測定を室温下で行った。ここで、 $q$ は、ブラッグ角を $\theta$ とした時に $q = (4/\lambda) \sin \theta$ と表される運動量変化である。溶媒とUCH-L1溶液の透過率を測定し、バックグラウンドを差し引き、標準化して得られた各々の散乱強度を求めた。UCH-L1溶液からの散乱強度から溶媒の散乱強度を差し引いたものを、タンパク質から散乱する中性子の散乱強度とした。

40

#### 【0036】

次に水溶液中でのタンパク質の形態を解析する。タンパク質の水溶液中での構造から予測される理論的な中性子散乱曲線と、実験で得られたUCH-L1の中性子散乱曲線が最も一致するようなタンパク質の形態を求めた。より具体的には、UCH-L1の結晶構造はまだ未知であるが、UCH-L1と同様にhydrolyase活性(50%のアミノ酸配列が一致する)を有し、生体に広く分布しているUCH-L3の結晶構造解析データからSWISS-MODELによって解析(参考文献; Schwede, T. et. al., Nucleic Acids Res. 31, 3381-3385 (2003).、Guex, N. et al., Electrophoresis 18, 2714-2723 (

50

1997). Peitsch, M. C., *Bio/Technology* 13, 658-660 (1995).)した結果を用いて、UCH-L1の結晶構造を算定した(図3)。次に結晶構造情報より、タンパク質の回転半径を計算すると(参考文献; Svergun, D. I. et al., *Proc. Matl. Acad. Sci. USA*, 95, 2267-227) (1998). Svergun, D. I. et al., *J. Appl. Cryst.* 28, 768-77) (1995).)、重心回転半径  $R_g$  が、6.5 (実際の回転半径は、

【0037】

【数1】

$$R = \sqrt{5/3} R_g$$

10

【0038】

である球状タンパク質であることが想定された。算定された球状タンパク質の半径から、重水中でのUCH-L1の単量体の中性子散乱曲線を次式(1)により、理論的に得ることができる。また、二量体についても二分子の中心間距離から求めることができる。

【0039】

【数2】

$$I(q) = \left( 3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)^2 \quad (1)$$

20

【0040】

図4に、算定した球状タンパク質UCH-L1の単量体、二量体からの理論曲線と、実際の正常型の測定結果を示す。明らかに単量体ではなく二量体に近いが、更に球状でないことが分かった。そこで、タンパク質の体積はアミノ酸数が一定であれば、変形してもその体積はあまり変化しないので、徐々にタンパク質の形状を回転円盤体(短径; a、長径; b、(=c))もしくは紡錘体(短径; a、(=b)、長径; c)として変形させ、更にこれらの形態として、単量体及び二量体を予測した。これらのタンパク質を全て5の立方体に分割し、分割された立方体間の散乱長密度差は水素原子(H)と重水素(D)間の差に比べると極めて小さいことを考慮し、タンパク質の全ての部位間の相関を計算することにより、水溶液からの理論的な中性子散乱曲線を次式(2)により求めた。図5aに単量体もしくは二量体の5の立方体間全ての相関を求める場合の概念図を示す。図5bは単量体の回転円盤体(短径; a、長径; b、(=c))で短径、a、を次第に変化させた場合の散乱ベクトルqと散乱強度I(q)との関係を示す。図5cは二量体とした場合の回転円盤体(短径; a、長径; b、(=c))で短径、a、を次第に変化させた場合の散乱ベクトルqと散乱強度I(q)との関係を示す。更に、図5dは二量体でも、紡錘体(短径; a、(=b)、長径; c)として、短径、a、を次第に変化させた場合の散乱ベクトルqと散乱強度I(q)との関係を示す。図5bの回転円盤体二量体のみにおいて、 $0.1 < q(\text{\AA}^{-1}) < 0.15$ の範囲で、特徴的な散乱強度の減衰が見られ、図4のUCH-L1の散乱曲線は回転円盤体に最も近いことが分かる。

30

40

【0041】

【数3】

$$I(q) = \sum_i \sum_j f_i f_j \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}} \quad (2)$$

【0042】

次に、実験値と理論値の差が最小となるように、次式(3)を用いてフィッティングを

50

行った。

【 0 0 4 3 】

【 数 4 】

$$R = \frac{\sum_q ((mI_e(q) - n - I_c(q))q^2)^2}{\sum_q (I_c(q)q^2)^2} \quad (3)$$

10

【 0 0 4 4 】

ここで、 $m$ はスケーリングファクター、 $n$ はバックグラウンドファクター、 $I_e(q)$ は実際に中性子散乱測定で得られた散乱強度、 $I_c(q)$ は理論的に得られた散乱強度である。 $R$ が最も小さくなるようなタンパク質の形態をUCH-L1の水溶液中の構造とした。紡錘体では長径が極めて長い紡錘体でなければ、実際の測定曲線と一致しなかったため、回転円盤体を採用した。図6に示すように、正常型UCH-L1、I93M、S18Y、I93M+S18Y全ては二量体であるが、二量体を形成する単量体は、正常型[短径、29；長径、52（図6a）]、I93M[短径、20；長径、62（図6b）]、S18Y[短径、43；長径、43（図6c）]、I93M+S18Y[短径、31；長径、50（図6d）]であった。すなわち、アミノ酸置換によって、水中での単量体の球状性は異なることが判明した。アミノ酸置換によるUCH-L1の球状性変化は、タンパク質の二次構造における $\beta$ -ターン（ペプチド鎖の折り返し）含有率とよく相関することが知られている。図7に円二色性測定結果から、 $\beta$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、 $\beta$ -ターン、ランダムコイル成分が、アミノ酸置換によってどのように変化したかを示した。正常型と比較して、I93M置換により、 $\beta$ -シートの増加、 $\beta$ -ターンの減少が見られた。一方、正常型と比較して、S18Y置換により、 $\beta$ -ターンの増加が見られた。更にI93M置換体と比較しても、S18Y置換により、 $\beta$ -ターンの増加が見られた。すなわち表5に示すように、中性子散乱実験から得られた、アミノ酸置換によるUCH-L1の球状性変化と、円二色性測定による $\beta$ -ターンを指標としたUCH-L1の球状性変化はよく一致することが確認された。

20

30

【 0 0 4 5 】

【 表 5 】

UCH-L1 のアミノ酸置換による中性子散乱から求めた  
楕円性の相対的变化と $\beta$ -turn 含有率の導体的変化の関係

Type	Amino acid substitution	Circular raito	Relative change of ellipsoidal	$\beta$ -turn content (%)	Relative change of $\beta$ -turn
Wild	non	1.8*	-	6.6	-
	I93M	3.1*	0.58 <sup>a</sup>	5.0	0.76 <sup>d</sup>
	S18Y	1.0*	1.79 <sup>a</sup>	7.8	1.18 <sup>d</sup>
I93M mutant	S18Y	1.6*	1.93 <sup>b</sup>	5.8	1.56 <sup>e</sup>
S18Y polymorphism	I93M	1.6*	0.52 <sup>c</sup>	5.8	0.64 <sup>f</sup>

\* 楕円率は中性子散乱による回転円盤体の  $b/a$  値から計算した。

<sup>a</sup> I93M と S18Y の相対的な楕円率の変化はwild-typeの楕円率に対する相対的な変化として計算した。

<sup>b</sup> I93M の楕円率に対する相対的な変化として、<sup>c</sup> I93M の楕円率に対する相対的な変化として、計算した。

<sup>d</sup> I93M と S18Y の相対的な $\beta$ -turn 含有率の変化はwild-typeの含有率に対する相対的な変化として計算した。

<sup>e</sup> I93M の $\beta$ -turn 含有率に対する相対的な変化として、<sup>f</sup> I93M の $\beta$ -turn 含有率に対する相対的な変化として計算した。

40

【 0 0 4 6 】

これらの結果とUCH-L1の機能、すなわちユビキチンの細胞内回収機能である加水

50

分解活性から、図 8 に要約するように、

- (1) UCH-L1 は水中で二量体を形成している。
- (2) アミノ酸置換により、二量体を形成する UCH-L1 の単量体の球状性は変化し、I93M 置換ではより球状から変形した形状となり、一方、S18Y 置換ではより球状性が高まる。
- (3) より変形された I93M 置換体では、加水分解活性が低下し、パーキンソン病危険増幅因子となる。
- (4) より球状性の高い S18Y 置換体では、加水分解活性が増加し、パーキンソン病危険軽減因子となって発症を抑制する。

#### 【0047】

以上が明らかになった。このように、中性子散乱法を用いることにより、従来の結晶構造解析からは予測が困難であった、生体に即した水中でのタンパク質の形態を明らかにすることが可能であるばかりではなく、タンパク質の形態を正常なタンパク質と比較すれば、パーキンソン病の診断ができることが判明した。

#### 【0048】

##### 実施例 2

中性子散乱法による微小管結合タンパク質タウの構造解析によるアルツハイマー病の診断

大腸菌用の発現ベクター pRK172 にヒト Tau 40 蛋白質 (441 アミノ酸) の cDNA をサブクローニングし、大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS へ導入した。得られた形質転換体を Circle Grow medium で OD が約 0.5 になるまで 37 で振とう培養し (約 2 時間)、最終濃度が 0.1 mM になるように IPTG を加えた後、さらに 6 時間培養した。菌体を遠心操作 (5000 x g、20 分、室温) により回収し、PC buffer (20 mM MES-NaOH, pH 6.8, 0.5 mM Mg Acetate, 1 mM EGTA, 2 mM PMSF) に懸濁した。超音波破碎法により菌体を溶解し、1/150 倍量の 2-メルカプトエタノール、最終濃度 0.8 mM の NaCl を加えた後、95 で 15 分間処理した。冷却後、遠心 (20000 x g、30 分、4 ) して上清を回収し、PC buffer に対して一晚透析した。PC buffer で平衡化した PC11 樹脂と、透析後の蛋白質溶液を混合し、4 で 5 時間以上攪拌した。0.1 mM NaCl を含む PC buffer で樹脂を十分に洗浄した後、0.5 mM NaCl を含む PC buffer により Tau 40 蛋白質画分を溶出した。Tau 40 蛋白質画分を MilliQ 水に対して一晚透析し、更に 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7 緩衝液に置き換え、凍結乾燥した後、中性子散乱実験に供した。また、タウ精製過程において、空気酸化で一旦タウ分子間に SS 結合が形成されると、容易にこれを還元・切断できないため、SS 結合による高分子化現象を解消するため、更に、20 mM DTT を加えて 70 で加熱し、SS 結合を還元・切断したタウについても同様に中性子散乱測定を行った。高分子化したタウは、日本原子力研究所の中性子散乱装置 (SANS-J;  $0.0013 < q (\text{\AA}^{-1}) < 0.014$ )、及び高エネルギー加速器研究機構の中性子散乱装置 (SWAN;  $0.009 < q (\text{\AA}^{-1}) < 0.99$ ) で測定した。また、SS 結合を還元・切断し、精製された低濃度のタウについては、日本原子力研究所の中性子散乱装置に 40 枚の物質レンズを組み込むことにより、中性子を集光させて測定した。

#### 【0049】

結果を図 9 に示す。SS 結合を還元・切断する前のタウは、 $q < \sim 0.008 \text{\AA}^{-1}$  で見られるように、直線の傾きが、 $q^{-2}$  に比例することから、ランダムコイルを形成して水中に溶解・分散しており、鎖の太さは、 $0.009 < q (\text{\AA}^{-1}) < 0.025$  の範囲で横断面解析 (参考文献; H. Matsuo et al., J. Colloid Interface Sci., 118, 387 (1987)) を行った結果 (図 5 中の挿入図)、直径が 36 であることが判明した。一方、SS 結合を還元・切断した後は散乱曲線は処理前と全く異なり、 $q$  が小さくなるにつれ、散乱強度は増加しなくなり、また

10

20

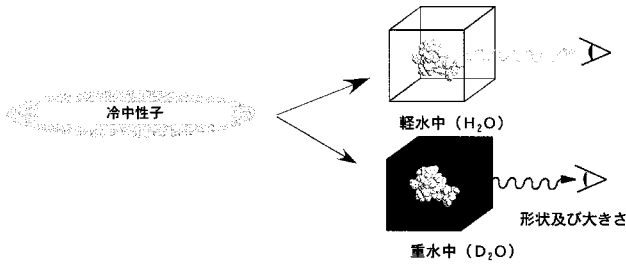
30

40

50

、q が大きくなるにつれ、散乱強度の減少は  $q^{-4}$  に比例することから粒子は球状となっていることが判明した。G un i e r 法 ( 参 考 文 献 ; A . G u n i e r , e t . a l . , “ S m a l l - a n g l e S c a t t e r i n g o f X - r a y s ” , W i l e y , N e w Y o r k ( 1 9 5 5 ) ) により、粒子の回転半径は350 であり、数十個のタウ分子が自己集合によって会合し、球状クラスターを形成していることが判明した。正常なタウであっても、種々の脳疾患で凝集体が見つけれられている。従って、本解析により、正常なタウ分子は水溶液中で、他のタンパク質と結合するか、あるいは弱い分子間相互作用によって会合体を形成しているが、酸化ストレスが細胞に加わると、分子間にSS結合が導入され、線維化してしまうことが判明した。中性子散乱法を用いる評価系により、脳細胞内で生じる異常なタンパク質の高次構造化現象を *i n v i t r o* で再現することができ、これを阻害、抑制するような新規薬剤のスクリーニングが可能となる。

【 図 1 】



【 図 2 】

J. Maignan, P. Basserau, and P. Delord, *J. Phys. Chem.*, **90**, 645 (1986)

$$I(q) \sim \int_0^{\pi/2} (k_{12} V_1 \phi(2\pi a q \sin \theta) + k_{20} V_2 \phi(2\pi(a+d)q \sin \theta))^2 \cos \theta d\theta$$

$$\phi(u) = 3(\sin(u) - u \cos(u)) / u^3$$

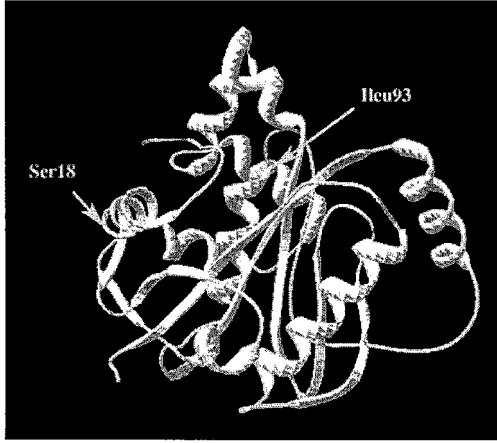
$$g_1(\theta) = (\cos^2 \theta + v^2 \sin^2 \theta)^{1/2}$$

$$g_2(\theta) = (\cos^2 \theta + (\frac{va + d^2}{a + d} \sin^2 \theta)^{1/2})$$

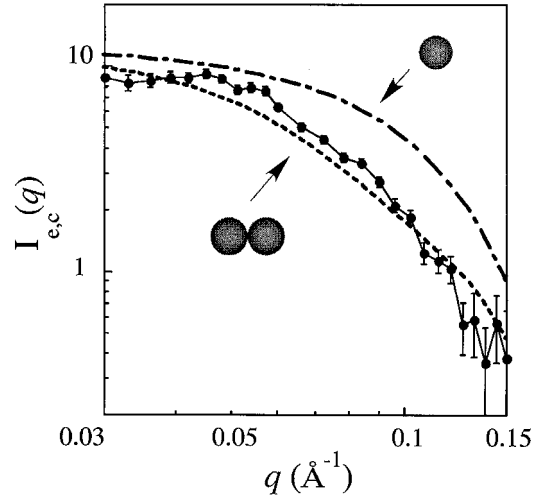
$k_{12}$  : コアとシェル間のコントラストファクター  
 $k_{20}$  : コアと溶媒間のコントラストファクター  
 $V_1, V_2$  : コアとシェルの体積  
 $a$  : 軸長       $v$  : 軸比

The diagram shows two ellipsoids. The upper one is a smaller ellipsoid with a horizontal axis labeled 'a'. The lower one is a larger ellipsoid with a horizontal axis labeled 'va' and a vertical axis labeled 'd'. Dashed lines connect the centers of the two ellipsoids, indicating they are concentric.

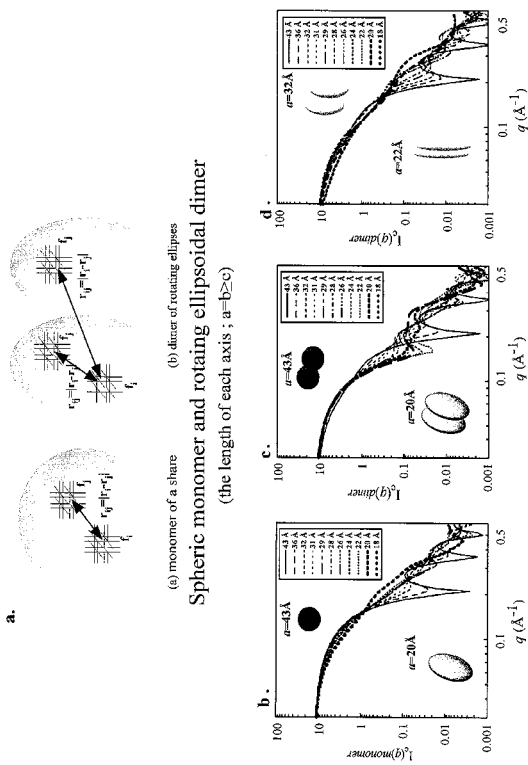
【 図 3 】



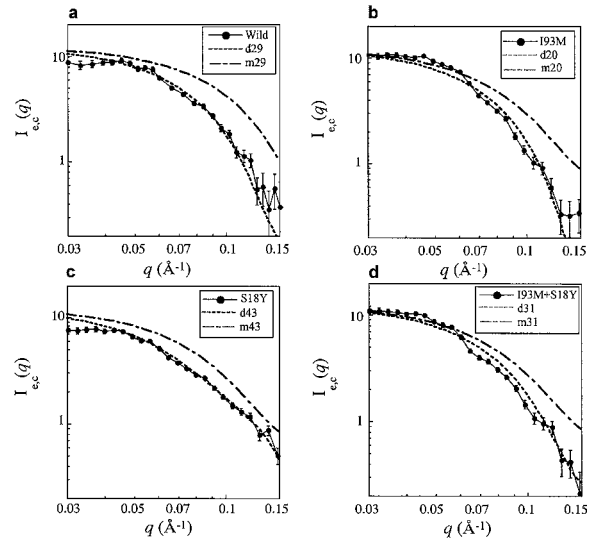
【 図 4 】



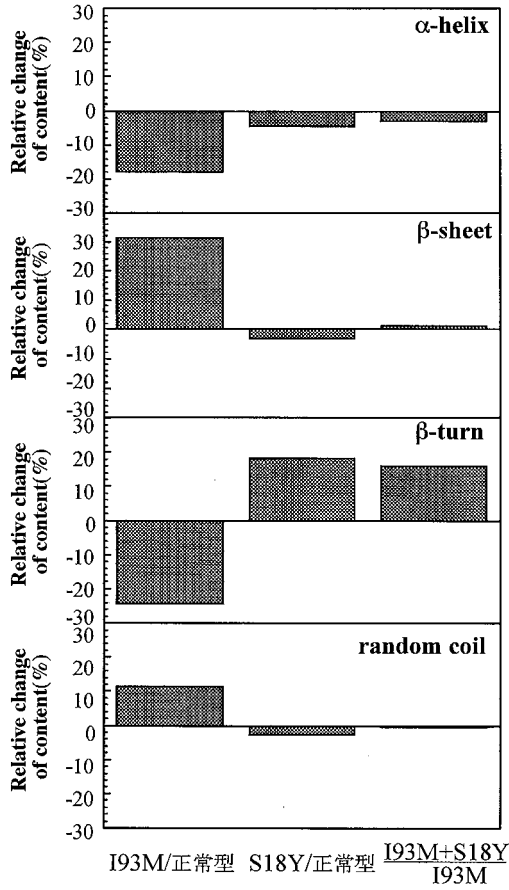
【 図 5 】



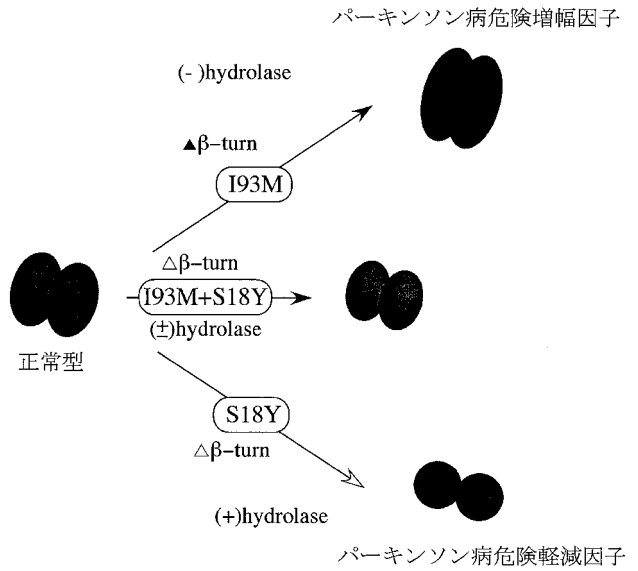
【 図 6 】



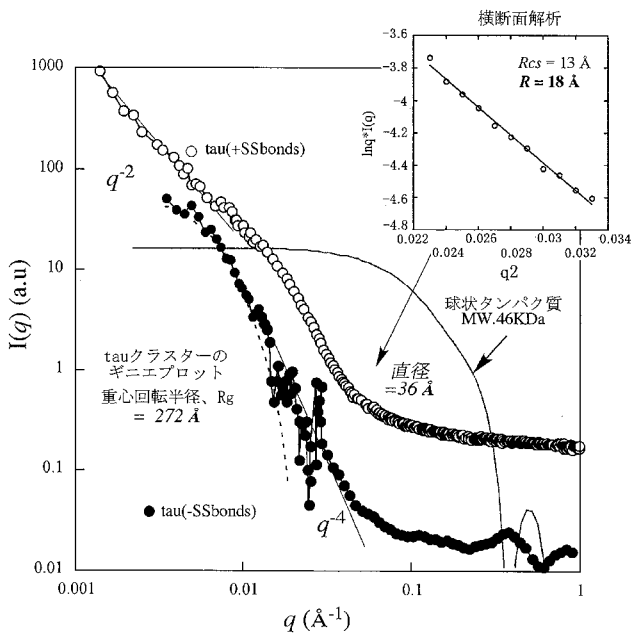
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】





## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/022898
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>G01N23/206</b> (2006.01), <b>G01N33/15</b> (2006.01), <b>G01N33/483</b> (2006.01), <b>G01N33/50</b> (2006.01)  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>G01N23/00</b> (2006.01) - <b>G01N23/227</b> (2006.01), <b>G01N33/48</b> (2006.01) - <b>G01N33/98</b> (2006.01)  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Science Direct, JSTPlus (JOIS)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	P. Calmettes et al., "Structures of phospho glycerate kinase and $\beta$ -casein denatured in guanidinium chloride", Physica B, Vols.213& 214, 1995, pages 754 to 756	4-6
Y	WO 2003/085086 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE), 16 October, 2003 (16.10.03), Description, page 59, line 12 to page 63, line 23 & AU 2003231995 A1 & CA 2481437 A1 & EP 1572937 A2 & JP 2005-522197 A & US 2003/0215880 A1	4-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 December, 2005 (28.12.05)		Date of mailing of the international search report 17 January, 2006 (17.01.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/022898

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

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

1.  Claims Nos.: 1-3  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1 to 3 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/022898								
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/206(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/483(2006.01), G01N33/50(2006.01)										
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. G01N33/00 (2006.01) - G01N33/227 (2006.01), G01N33/48(2006.01) - G01N33/98 (2006.01)										
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2005年									
日本国実用新案登録公報	1996-2005年									
日本国登録実用新案公報	1994-2005年									
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Science Direct, JSTPlus(JOIS)										
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								
Y	P. Calmettes, <i>et al.</i> , "Structures of phosphoglycerate kinase and $\beta$ -casein denatured in guanidinium chloride" Physica B, Vols. 213&214, 1995, pp. 754-756	4-6								
Y	WO 2003/085086 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 2003.10.16 明細書第 59 頁第 12 行-第 63 頁第 23 行 & AU 2003231995 A1 & CA 2481437 A1 & EP 1572937 A2 & JP 2005-522197 A & US 2003/0215880 A1	4-6								
<input 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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 28.12.2005		国際調査報告の発送日 17.01.2006								
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 高場 正光 電話番号 03-3581-1101 内線 3292								

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2005/022898

## 第II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)

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。

1.  請求の範囲 1-3 は、この国際調査機関が調査を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1-3は人体の診断方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ 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、
3.  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。

## 第III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)

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。

1.  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。
2.  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。
3.  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。
4.  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。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 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が、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 505374783

独立行政法人 日本原子力研究開発機構  
茨城県那珂郡東海村村松 4 番地 4 9

(74) 代理人 110000084

特許業務法人アルガ特許事務所

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸

(74) 代理人 100077562

弁理士 高野 登志雄

(74) 代理人 100096736

弁理士 中嶋 俊夫

(74) 代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74) 代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(74) 代理人 100101317

弁理士 的場 ひろみ

(72) 発明者 内藤 幸雄

茨城県つくば市大穂 1 - 1 高エネルギー加速器研究機構内

(72) 発明者 古坂 道弘

茨城県つくば市大穂 1 - 1 高エネルギー加速器研究機構内

(72) 発明者 池田 進

茨城県つくば市大穂 1 - 1 高エネルギー加速器研究機構内

(72) 発明者 望月 秀樹

東京都文京区本郷 2 - 1 - 1 順天堂大学医学部内

(72) 発明者 安田 徹

東京都文京区本郷 2 - 1 - 1 順天堂大学医学部内

(72) 発明者 和田 圭司

東京都小平市小川東町 4 - 1 - 1 国立精神・神経センター内

(72) 発明者 青木 俊介

東京都小平市小川東町 4 - 1 - 1 国立精神・神経センター内

(72) 発明者 鈴木 淳市

茨城県那珂郡東海村白方白根 2 番地 4 独立行政法人日本原子力研究開発機構 東海研究開発センター 原子力科学研究所内

(72) 発明者 藤原 悟

茨城県那珂郡東海村白方白根 2 番地 4 独立行政法人日本原子力研究開発機構 東海研究開発センター 原子力科学研究所内

(72) 発明者 清水 裕彦

埼玉県和光市広沢 2 - 1 独立行政法人理化学研究所内

(72) 発明者 安達 智宏

埼玉県和光市広沢 2 - 1 独立行政法人理化学研究所内

Fターム(参考) 2G001 AA04 BA14 CA04 LA01 MA04  
2G045 DA36 FA11 GC11 JA01

(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。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第6部門第1区分  
 【発行日】平成21年1月29日(2009.1.29)

【国際公開番号】W02006/064819  
 【年通号数】公開・登録公報2008-023  
 【出願番号】特願2006-548864(P2006-548864)  
 【国際特許分類】

G 0 1 N 23/202 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 23/202

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/15 Z

【手続補正書】

【提出日】平成20年12月4日(2008.12.4)

【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】

重水中に溶解又は分散した被検タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から被検タンパク質の形態を測定することを特徴とする、被検タンパク質の形態変化に起因する疾患の判定方法。

【請求項2】

被検タンパク質の形態変化が、被検タンパク質の形状及び/又は大きさの変化である請求項1記載の判定方法。

【請求項3】

被検タンパク質が、生体由来の遺伝子を使用して合成されたもの又は生体から分離されたものである請求項1又は請求項2記載の判定方法。

【請求項4】

被検タンパク質の形態が、生体中に存在する状態と同様である請求項1～3のいずれか1項記載の判定方法。

【請求項5】

被検物質で処理された対象タンパク質又は被検物質を投与された動物から分離された対象タンパク質を用いる医薬のスクリーニング方法であって、重水中に溶解又は分散した対象タンパク質に冷中性子を照射し、当該冷中性子の散乱から対象タンパク質の形態を測定することを特徴とする、対象タンパク質の形態変化に起因する疾患の治療薬のスクリーニング方法。

【請求項6】

対象タンパク質の形態変化が、対象タンパク質の形状及び/又は大きさの変化である請求項5記載のスクリーニング方法。

【請求項7】

対象タンパク質が、生体由来の遺伝子を使用して合成されたもの又は生体から分離されたものである請求項5又は6記載のスクリーニング方法。

【請求項8】

被検タンパク質の形態が、生体中に存在する状態と同様である請求項5～7のいずれか1項記載のスクリーニング方法。