

# 新規抗体を用いた、神経疾患に 関わる蛋白質の迅速定量

名古屋市立大学大学院・薬学研究科・病態生化学分野  
教授 服部光治

# 研究背景

「リーリン」は脳機能に重要な分泌蛋白質であり、その発現量低下や分解亢進は統合失調症やアルツハイマー病の一因となる。

病態の診断や、新規薬物開発のためにも、リーリンの分解を定量することが不可欠である。

しかし、リーリンが巨大であり、分解型と非分解型を簡便に見分ける方法がないこと等から、血液や脳脊髄液中のリーリン量の測定や、リーリン分解のアッセイには熟練した技術と長い時間が必要であった

# 分泌蛋白質リーリンとは？

- 脊椎動物だけに存在する、巨大なタンパク質
- 3,460アミノ酸、分子量430kDa、二量体、多量体を形成
- 脳に多く存在し、胎生期における脳形成に必須
- 近年、以下のような精神神経疾患への関与が報告されている
  1. アルツハイマー病
  2. 統合失調症
  3. 自閉症
  4. 気分障害(うつ、躁うつ)
- ほとんどの報告において、リーリンの「機能低下」が病態を悪化させるとされている。
- よって、リーリンの分解を測定することや、分解を防ぐことが重要である。

# リーリン投与は脳機能を上昇させる



## LEARNING & MEMORY

### Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density

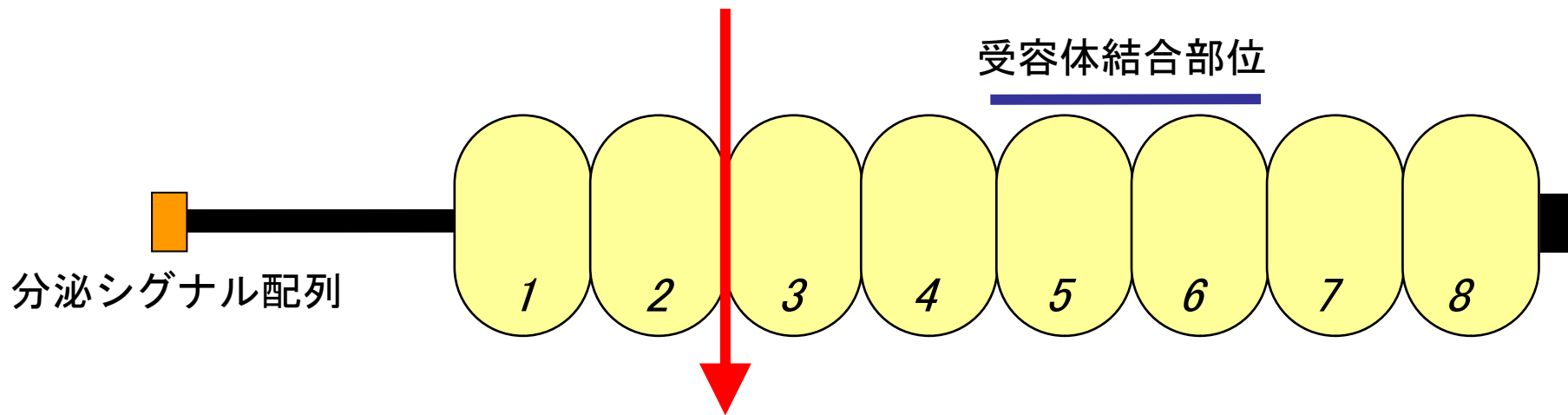
Justin T. Rogers, Ian Rusiana, Justin Trotter, et al.

*Learn. Mem.* 2011 18: 558-564

Access the most recent version at doi:[10.1101/lm.2153511](https://doi.org/10.1101/lm.2153511)

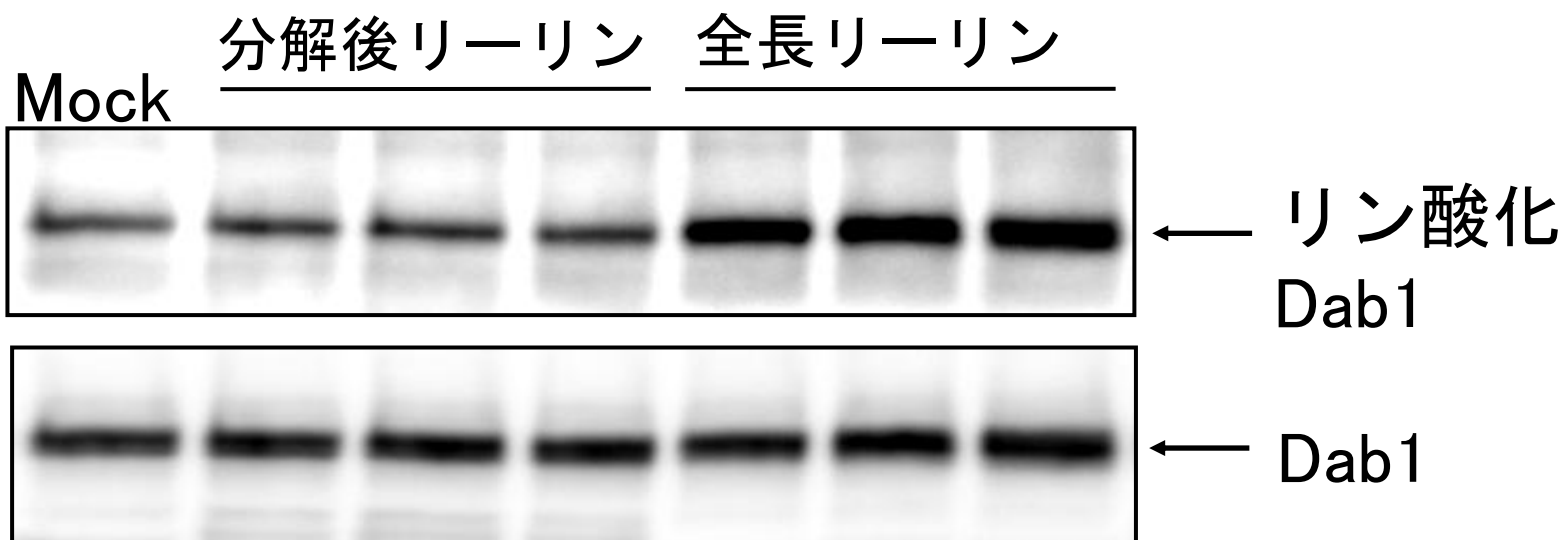
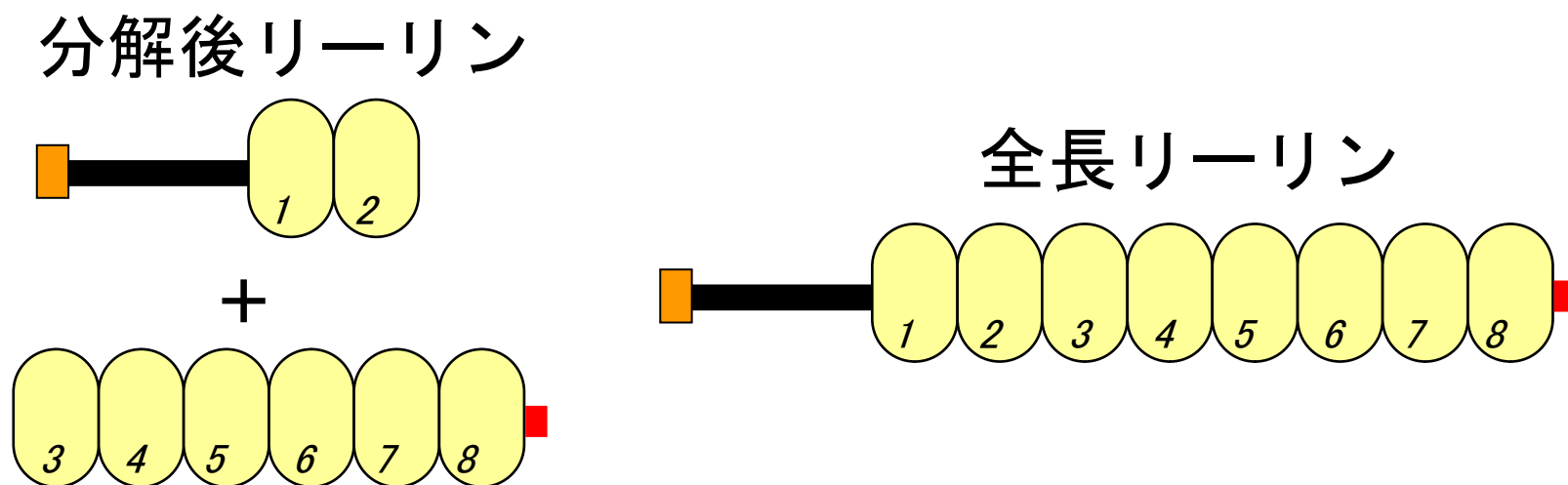
- ・ 正常マウスの脳室にリーリンを単回投与することにより、
  - スパイン（シナプス）が増える
  - 海馬における伝達効率が上昇する
  - 学習・記憶行動の成績が向上する

# リーリン蛋白質の構造と、特異的切断

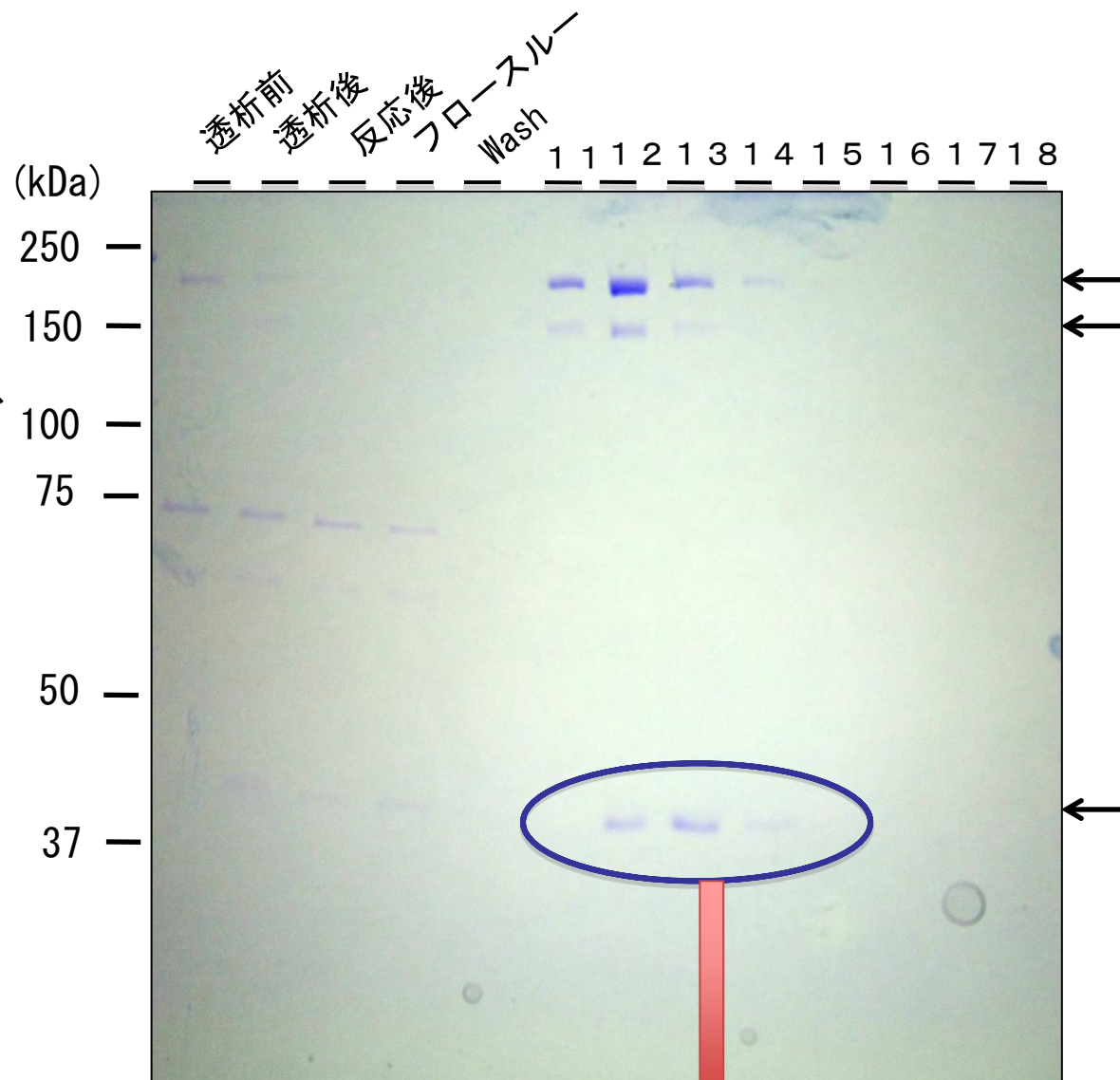
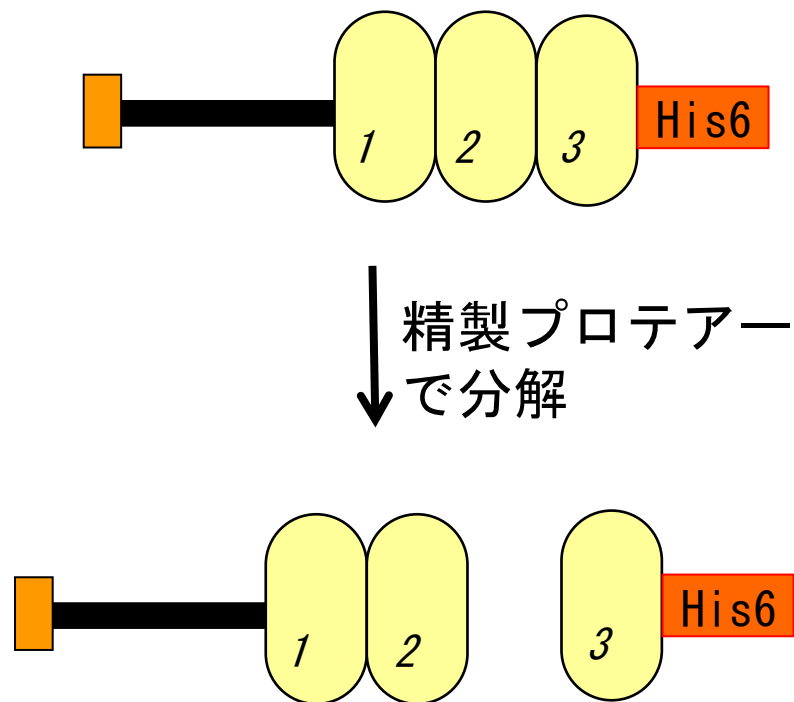


- ・リーリン蛋白質の中央部分には繰り返し構造（リーリンリピート）が8回ある
- ・このうち、2つ目と3つ目のリピートの間付近で特異的な切断を受けることは知られていた
- ・しかし、正確な切断部位や、切断の意義は不明であった

リーリンは、切断によって下流シグナル活性化能力を

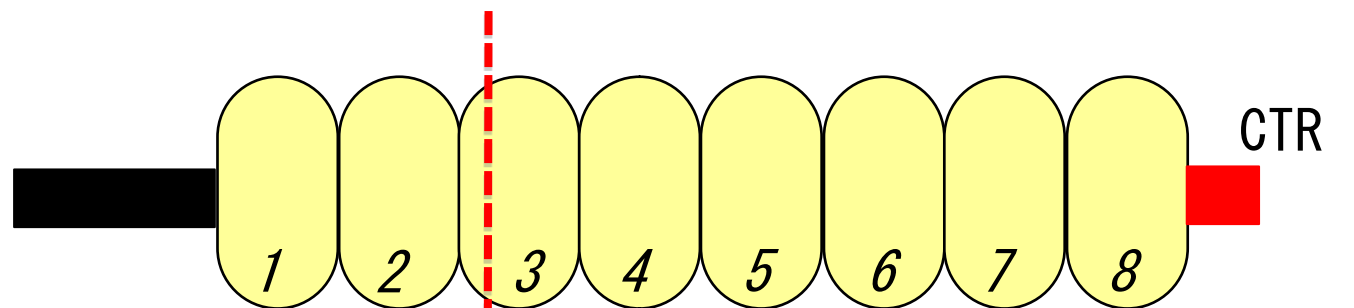


# リーリン切断部位の同定



サンプルを濃縮しエドマン分解

# リーリンの切断は、プロリン残基のC末端側でおきる

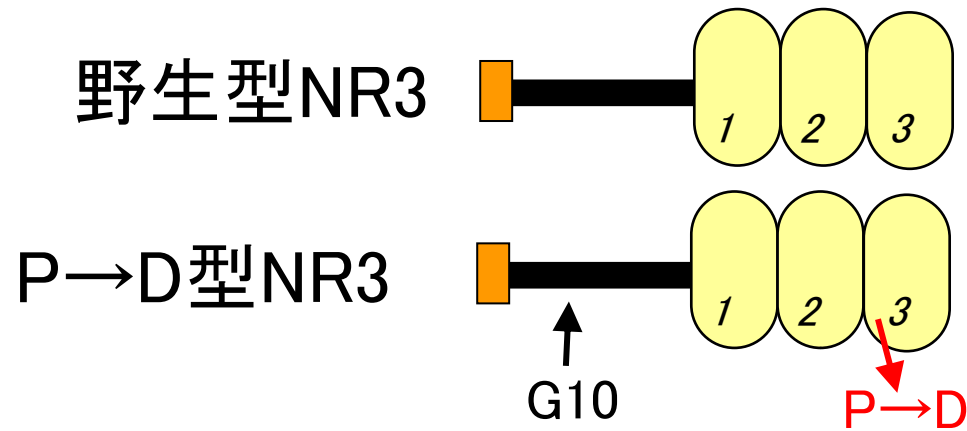


T L P Q N F Y E K P A F D Y P M

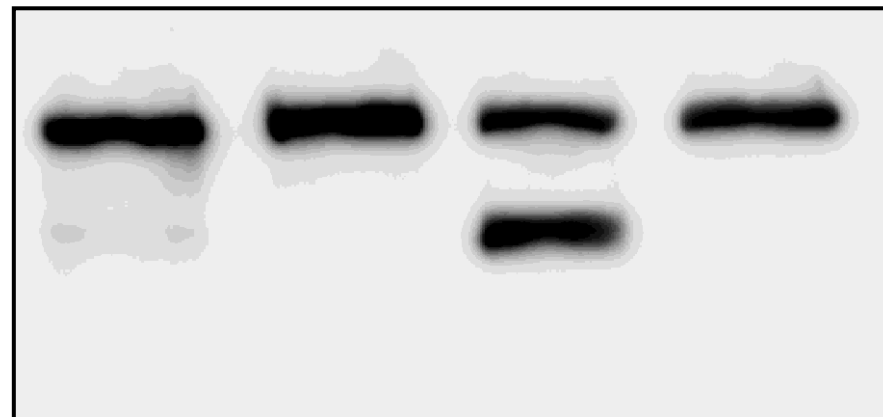
RR3

repeat2A	865	- V L F N S I S L D - F T N - L V
repeat4A	1601	- D S S O T G F O D K L D G S I D
repeat6A	2318	- I S G N T V L E D D F S T L D S
repeat5A	1951	N L N N P V L L L D T F D - F G P
repeat1A	565	- - - - - - - - - - - - - - - -
repeat7A	2690	A G P V G R I A F E M F L E D K T
repeat3A	1235	T L P O N F Y E K P A F D - Y P M
repeat8A	3053	E I - N P S O L V D T F D D E G S

# プロリンを置換した変異体は、分解を受けない

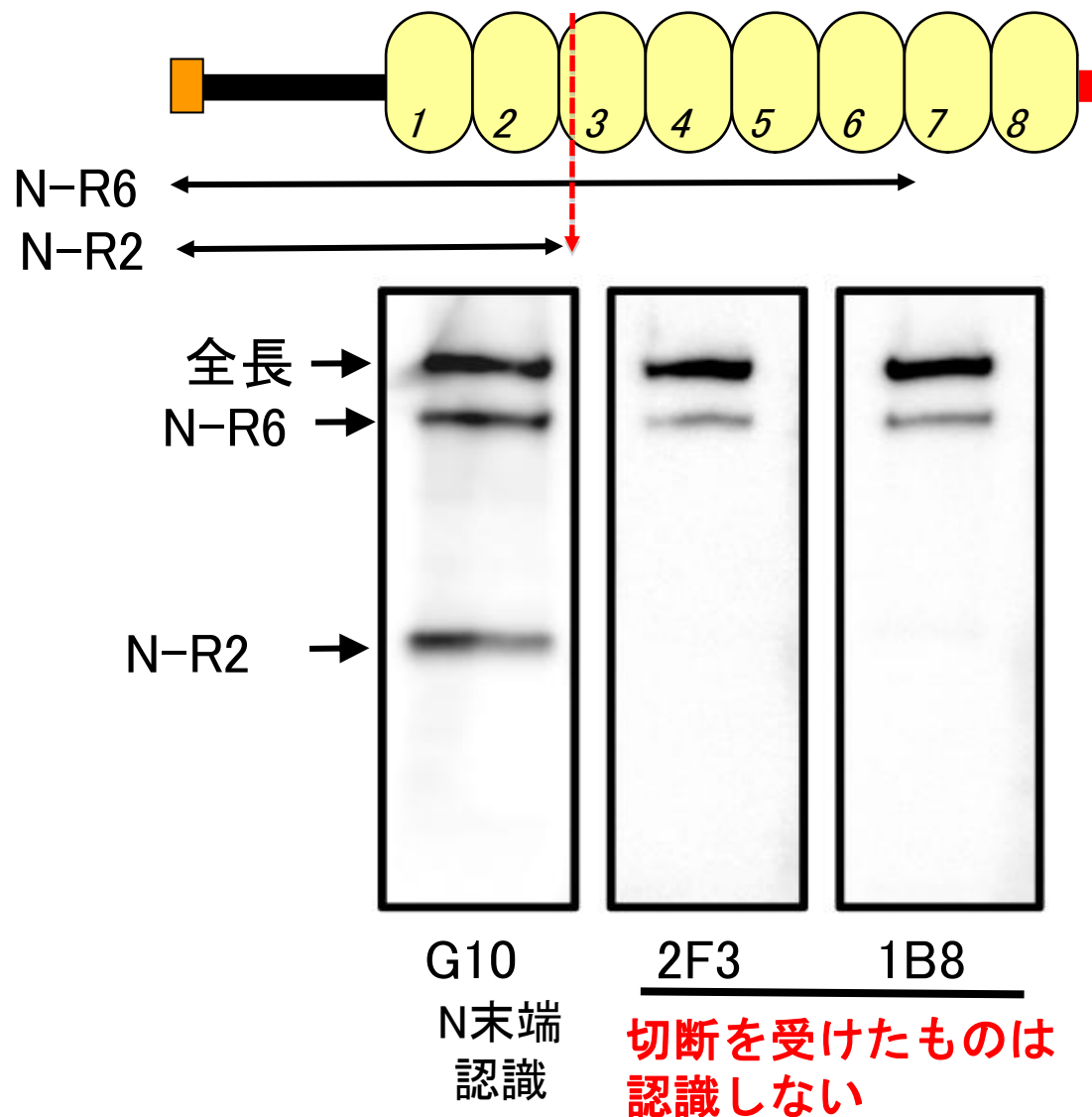


<u>プロテアーゼ無</u>		<u>プロテアーゼ有</u>	
野生型	P→D型	野生型	P→D型



WB:G10

# 切断部位を「またぐ」エピトープをもつ モノクローナル抗体の作製



この抗体を用いることで、  
リーリンの非分解産物を  
簡便に検出できる。

リーリンの分解は、すなわち  
リーリンの不活化なので、  
精神神経疾患の診断や、こ  
れらに対する新薬の開発に  
つながる

# 従来技術とその問題点

従来、リーリン全長蛋白質やその分解産物の定量には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、その後ウエスタンブロット法を用いる必要があった。この方法には以下の問題点がある。

- ・時間がかかる(1日半程度)
- ・手技が難しい
- ・定量数値化が難しい
- ・百以上のサンプルを処理することは困難

# 新技術の特徴・従来技術との比較

- 我々が樹立した抗体を用いれば、ELISAなどで半日以内で終了するキットも作成可能
- リーリンは巨大なため柔らかいゲルを用いて電気泳動する必要があり、難易度が高かったが、それが必要なくなる。
- マルチウェルプレートを用いて多くのサンプルを処理できる
- プレートリーダーを用いた数値化が容易

# 想定される用途

- ヒト血清や脳脊髄液を用いた、リーリン定量キットを開発することで、精神神経疾患の診断やリスク判断に供することが期待される。
- リーリン特異的分解酵素の阻害剤スクリーニングに用いることが期待される。

# 想定される業界

- 利用者・対象

(1) 精神神経疾患治療薬開発メーカー

リーリン分解阻害剤は、統合失調症やアルツハイマー病の画期的新薬になる可能性がある。そのスクリーニング系樹立に、我々の抗体は役立つ

(2) 診断薬キットメーカー

統合失調症やアルツハイマー病の診断や予後評価のために、血液や脳脊髄液中の全長リーリン量を定量することは役立つ

# 実用化に向けた課題

- N-t切断を受けていないリーリン特異的抗体は樹立したが、ELISAキット化などには、もう1種類の抗体を得たり、抗体をラベル化することが必要と思われる。
- リーリン分解阻害剤の開発には、化合物ライブラリーとそれをスクリーニングする人的・物的資源が必要。

# 企業への期待

- ELISAキット化には、企業のノウハウや大量生産設備が必要である。
- 精神神経疾患の画期的新薬候補として、リーリン分解阻害剤のスクリーニングを行ってほしい。

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 抗体とその利用
- 出願番号 : 特願2011-179161
- 出願人 : 公立大学法人  
名古屋市立大学
- 発明者 : 服部光治、河野孝夫、  
鯉江真利、久永有紗

# お問い合わせ先

名古屋市立大学 リエゾン・センター

TEL 052-853-8041

FAX 052-841-0261

e-mail [kikaku2@adm.nagoya-cu.ac.jp](mailto:kikaku2@adm.nagoya-cu.ac.jp)