

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 516128

(P2003 - 516128A)

(43)公表日 平成15年5月13日(2003.5.13)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		19/00	4 B 0 2 4
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 4
1/19		1/21	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全216数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 535558(P2001 - 535558)

(86)(22)出願日 平成12年11月3日(2000.11.3)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月2日(2002.5.2)

(86)国際出願番号 PCT/US00/30535

(87)国際公開番号 W001/032876

(87)国際公開日 平成13年5月10日(2001.5.10)

(31)優先権主張番号 09/434,354

(32)優先日 平成11年11月3日(1999.11.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 マイトコー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,
サン ディエゴ, ソレント バレー ロ
ード 11494

(72)発明者 マーフィー, アン エヌ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024,
エンシニタス, コール ランチ ロード
310

(72)発明者 クレベンガー, ウィリアム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92107,
オーシャンサイド, ウィンドソアー ロ
ード 3544

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外 2 名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ミトコンドリア成分の相互作用の決定およびこのような相互作用を変更する薬剤を同定するための組成物および方法

(57)【要約】

ミトコンドリア膜透過性変化を変更する薬剤を同定するための組成物および方法を提供する。スクリーニング方法は、一般に、ミトコンドリアアデニンヌクレオチドトランスロケーターとシクロフィリンDとの間の相互作用を変更する薬剤を同定する。このような薬剤は、例えば、変更されたミトコンドリア機能に関連する種々の状態の処置に使用され得る。1つの局面において、本発明はまた、核酸発現構築物であって、該構築物は、さらなるポリペプチドまたはその改変体に融合されているミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドまたはその改変体をコードするポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドに、発現制御配列が作動可能に連結されている、核酸構築物を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 シクロフィリンポリペプチドへのアデニンヌクレオチドトランスロケータポリペプチドの結合を変更する薬剤を同定する方法であって、以下：

(a) 候補薬剤の非存在下および存在下で、シクロフィリンポリペプチドまたはその改変体を含む第1の単離された組換えポリペプチド(i)に、組換えヒトアデニンヌクレオチドトランスロケータポリペプチドまたはその改変体を含む第2の単離された組換えポリペプチドを含むサンプル(ii)を接触させる工程であって、該工程は、該シクロフィリンポリペプチド、該アデニンヌクレオチドトランスロケータポリペプチドおよび該候補薬剤が相互作用するのを可能にするのに十分な条件下かつ時間で行われる、工程；および

(b) 該候補薬剤の非存在下での該第2の単離された組換えポリペプチドへの該第1の単離された組換えポリペプチドの結合のレベルを、該候補薬剤の存在下での該第2の単離された組換えポリペプチドへの該第1の単離された組換えポリペプチドの結合のレベルと比較する工程であって、ここで、該薬剤の存在下での結合のレベルの減少は、該薬剤が、シクロフィリンポリペプチドへのアデニンヌクレオチドトランスロケータポリペプチドの結合を阻害することを示し、そして、該薬剤の存在下での結合のレベルの増加は、該薬剤が、シクロフィリンポリペプチドへのアデニンヌクレオチドトランスロケータポリペプチドの結合を増強することを示し、そしてそれから、シクロフィリンポリペプチドへのアデニンヌクレオチドトランスロケータポリペプチドの結合を変更する薬剤を同定する、工程を包含する、方法。

【請求項2】 前記第1および第2の単離された組換えポリペプチドの少なくとも一方が、融合ポリペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記第1の単離された組換えポリペプチドが、さらなるポリペプチドに融合されているヒトシクロフィリンDポリペプチドを含み、ここで、該さらなるポリペプチドは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ以外である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記シクロフィリンポリペプチドが、ヒトシクロフィリンA、ヒトシクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCおよびヒトCyp-60からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記第1の単離された組換えポリペプチドが、さらなるポリペプチドに融合されているシクロフィリンポリペプチドを含み、該さらなるポリペプチドは、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、XPRESS™エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグ、Mycエピトープポリペプチド、FLASHペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、ストレプトアビジン、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼポリペプチドおよびStaphylococcus aureusプロテインAポリペプチドからなる群より選択される、方法。

【請求項6】 前記第1の単離された組換えポリペプチドが、連結されたレポーター基で検出可能に標識されている、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記第1の単離された組換えポリペプチドが、さらなるポリペプチドに融合されているシクロフィリンポリペプチドを含み、該さらなるポリペプチドが、ポリリジンであり、かつ前記第2の単離された組換えポリペプチドが、XPRESS™エピトープタグに融合されている組換えヒトアデニンヌクレオチドトランスロケーターポリペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記第1の単離された組換えポリペプチドが、連結されたレポーター基で検出可能に標識されている、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記連結されたレポーター基が、放射性レポーター基、色素、酵素、リガンド、レセプター、プロテアーゼ認識配列、発光レポーター基および蛍光レポーター基からなる群より選択される、請求項6または8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 前記第2の単離された組換えポリペプチドを含む前記サンプルが、少なくとも1つの単離されたミトコンドリアを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記第2の単離された組換えポリペプチドを含む前記サン

ブルが、少なくとも1つの亜ミトコンドリア粒子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記第2の単離された組換えポリペプチドを含む前記サンプルが、固体支持体に固定されている、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記第2の単離された組換えポリペプチドが、さらなるポリペプチドに融合されているヒトアデニンヌクレオチドトランスロケーターポリペプチドまたはその改変体を含み、該さらなるポリペプチドは、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、XPRESS™エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグ、Mycエピトープポリペプチド、FLASHペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、ストレプトアビジン、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼポリペプチドおよびStaphylococcus aureusプロテインAポリペプチドからなる群より選択される、方法。

【請求項14】 結合レベルを比較する前記工程が、前記第1の単離された組換えポリペプチドおよび前記第2の単離された組換えポリペプチドからなる群より選択される前記ポリペプチドの少なくとも一方に特異的に結合する検出試薬を検出することを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記検出試薬が、抗体である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 請求項15に記載の方法であって、ここで、前記第2の単離された組換えポリペプチドが、XPRESS™エピトープタグおよびFLAG（登録商標）エピトープタグからなる群より選択されるポリペプチドに融合されている、ヒトアデニンヌクレオチドトランスロケーターまたはその改変体を含み、かつ前記抗体が、該ヒトアデニンヌクレオチドトランスロケーターポリペプチド、該XPRESS™エピトープタグおよび該FLAG（登録商標）エピトープタグからなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、方法。

【請求項17】 請求項1に記載の方法であって、前記第1の単離された組換えポリペプチドが、ヒトシクロフィリンDを含み、そして前記第2の単離され

た組換えポリペプチドを含む前記サンプルが、X P R E S STMエピトープタグに融合されている組換えヒトアデニンヌクレオチドトランスロケター - 3ポリペプチドを発現するT . n i細胞から単離された、少なくとも1つの亜ミトコンドリア粒子を含む、方法。

【請求項18】 核酸発現構築物であって、該構築物は、さらなるポリペプチドまたはその改変体に融合されているミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドまたはその改変体をコードするポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドに、発現制御配列が作動可能に連結されており、ここで、該ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ヒトANT1、ヒトANT2およびヒトANT3からなる群より選択されるアデニンヌクレオチドトランスロケターであり、そして該発現制御配列は、調節されるプロモーターおよび外因的に調節されるプロモーターからなる群より選択される、核酸発現構築物。

【請求項19】 前記外因的に調節されるプロモーターが、厳密に調節されるプロモーターである、請求項18に記載の発現構築物。

【請求項20】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、F L A G（登録商標）エピトープタグおよびX P R E S STMエピトープタグからなる群より選択される、請求項18に記載の発現構築物。

【請求項21】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、M y cポリペプチド、F L A S Hペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、ストレプトアビジン、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、ストレプトアビジン、グルタチオン - S - トランスフェラーゼポリペプチドおよびS t a p h y l o c c o c c u s a u r e u sプロテインAポリペプチドからなる群より選択される、請求項18に記載の発現構築物。

【請求項22】 核酸発現構築物であって、該構築物は、さらなるポリペプチドまたはその改変体に融合されているシクロフィリンポリペプチドまたはその改変体をコードするポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドに、発現制御配列が作動可能に連結されており、ここで、該シクロフィリンが、シクロフィリンDであり、そして該さらなるポリペプチドが、グルタチオン - S - トランスフ

エラーゼ以外である、核酸発現構築物。

【請求項23】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグおよびXPRESS™エピトープタグからなる群より選択される、請求項22に記載の発現構築物。

【請求項24】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、Mycポリペプチド、FLASHペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、ストレプトアビジンおよびStaphylococcus aureusプロテインAポリペプチドからなる群より選択される、請求項22に記載の発現構築物。

【請求項25】 核酸発現構築物であって、該構築物は、さらなるポリペプチドまたはその改変体に融合されているシクロフィリンポリペプチドまたはその改変体をコードするポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドに、発現制御配列が作動可能に連結されており、ここで、該シクロフィリンポリペプチドが、ヒトシクロフィリンA、シクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCおよびヒトCyp-60からなる群より選択される、核酸発現構築物。

【請求項26】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、XPRESS™エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグ、Mycエピトープポリペプチド、FLASHペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、ストレプトアビジン、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼポリペプチドおよびStaphylococcus aureusプロテインAポリペプチドからなる群より選択される、請求項25に記載の発現構築物。

【請求項27】 請求項18、21または25のいずれか1項に記載の発現構築物であって、該構築物は、プラスミド、コスミド、シャトルベクター、ウイルスベクター、および染色体複製起点を含むベクターからなる群より選択されるベクターを含む、構築物。

【請求項28】 前記ベクターが、pBAD-His、pEYFP-C1お

よびp E C F P - N 1からなる群より選択される、請求項27に記載の発現構築物。

【請求項29】 単離されたポリペプチドであって、該単離されたポリペプチドは、ミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドまたはその改変体を含み、該ミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドまたはその改変体は、さらなるポリペプチドまたはその誘導体に融合されており、ここで、該ミトコンドリア透過性変化コア成分は、ヒトANT1、ヒトANT2およびヒトANT3からなる群より選択される、アデニンヌクレオチドトランスロケーターである、単離されたポリペプチド。

【請求項30】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグおよびXPRESS™エピトープタグからなる群より選択される、請求項29に記載のポリペプチド。

【請求項31】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、Mycエピトープポリペプチド、FLASHペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、ストレプトアビジン、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼポリペプチドおよびStaphylococcus aureusプロテインAポリペプチドからなる群より選択される、請求項29に記載のポリペプチド。

【請求項32】 単離されたポリペプチドであって、該単離されたポリペプチドは、ミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドまたはその改変体を含み、該ミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドまたはその改変体は、さらなるポリペプチドまたはその誘導体に融合されており、ここで、該ミトコンドリア透過性変化コア成分は、ポーリン、ヘキソキナーゼ、クレアチンキナーゼ、PRAX、CAMLおよび末梢ベンゾジアゼピンレセプターからなる群より選択される、単離されたポリペプチド。

【請求項33】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグおよびXPRESS™エピトープタグからなる群より選択される、請求

項32に記載のポリペプチド。

【請求項34】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、Mycエピトープポリペプチド、FLASHペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、ストレプトアビジン、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼポリペプチドおよびStaphylococcus aureusプロテインAポリペプチドからなる群より選択される、請求項32に記載のポリペプチド。

【請求項35】 単離されたポリペプチドであって、該単離されたポリペプチドは、シクロフィリンまたはその改変体を含み、該シクロフィリンまたはその改変体は、さらなるポリペプチドまたはその改変体に融合されており、ここで、該シクロフィリンは、シクロフィリンDであり、そして該さらなるポリペプチドは、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグおよびXPRESS™エピトープタグからなる群より選択される、単離されたポリペプチド。

【請求項36】 単離されたポリペプチドであって、該単離されたポリペプチドは、シクロフィリンまたはその改変体を含み、該シクロフィリンまたはその改変体は、さらなるポリペプチドまたはその改変体に融合されており、ここで、該シクロフィリンは、ヒトシクロフィリンA、ヒトシクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCおよびヒトCyp-60からなる群より選択される、単離されたポリペプチド。

【請求項37】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、ポリヒスチジン、ポリリジン、赤血球凝集素エピトープタグ、FLAG（登録商標）エピトープタグおよびXPRESS™エピトープタグからなる群より選択される、請求項36に記載のポリペプチド。

【請求項38】 前記融合されているさらなるポリペプチドが、Mycエピトープポリペプチド、FLASHペプチド、免疫グロブリン定常領域ポリペプチド、ストレプトアビジン、グリーン蛍光タンパク質ポリペプチド、エクオリンポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼポリペプチドおよびStaphylococcus aureusプロテインAポリペプチドからなる群よ

り選択される、請求項36に記載のポリペプチド。

【請求項39】 前記グリーン蛍光タンパク質が、青色シフトGFP、シアン色シフトGFP、赤色シフトGFPおよび黄色シフトGFPからなる群より選択される、請求項31、34および38のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項40】 ミトコンドリア透過性変化を変更する薬剤を同定するための宿主細胞であって、少なくとも1つのミトコンドリアおよび請求項18~27のいずれか1項に記載の核酸発現構築物を含む、宿主細胞。

【請求項41】 前記宿主細胞が、原核生物細胞である、請求項40に記載の宿主細胞。

【請求項42】 前記宿主細胞が、真核生物細胞である、請求項40に記載の宿主細胞。

【請求項43】 前記真核生物細胞が、293、COS-7、Sf9、CHO、Hep-2、MDCK、SH-SY5YおよびJurkatからなる群より選択される細胞株に由来する、請求項42に記載の宿主細胞。

【請求項44】 前記真核生物細胞が、T.ni細胞である、請求項42に記載の宿主細胞。

【請求項45】 前記組換え発現構築物が、染色体外にある、請求項40に記載の宿主細胞。

【請求項46】 前記核酸発現構築物が、宿主細胞染色体内に組み込まれている、請求項40に記載の宿主細胞。

【請求項47】 前記宿主細胞染色体が、ミトコンドリア染色体である、請求項46に記載の宿主細胞。

【請求項48】 さらにポリペプチドに融合されているシクロフィリンポリペプチドを調製するための方法であって、以下の工程：

(a) 融合タンパク質の発現を可能にする条件下で、核酸発現構築物を含む宿主細胞を培養する工程であって、該核酸発現構築物は、以下：

(i) さらにポリペプチドまたはその改変体に融合されたシクロフィリンポリペプチドまたはその改変体をコードするポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドに、発現制御配列が作動可能に連結されている、核酸発現構築物であ

って、該シクロフィリンは、シクロフィリンDであり、そして該さらなるポリペプチドは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ以外である、核酸発現構築物；および

(i i) さらなるポリペプチドまたはその改変体に融合されたシクロフィリンポリペプチドまたはその改変体をコードするポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドに、発現制御配列が作動可能に連結されている、核酸発現構築物であって、該シクロフィリンポリペプチドは、ヒトシクロフィリンA、シクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCおよびヒトCyp-60からなる群より選択される、核酸発現構築物

からなる群より選択され、

エネルギー移動分子ポリペプチドまたはその誘導体に融合されたシクロフィリンポリペプチドまたはその誘導体を含む融合タンパク質をコードする、
工程；ならびに

(b) 該培養物から融合タンパク質を回収する工程
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、ミトコンドリア膜透過性変化に影響する薬剤を同定するための方法に一般に関する。より具体的に、本発明は、ミトコンドリアアデニンヌクレオチドトランスロケーターとシクロフィリンDとの間の相互作用を変更する薬剤を同定する際に有用な組成物およびスクリーニング方法に関する。

【0002】**(発明の背景)**

ミトコンドリアは、高等生物の細胞における主要なエネルギー源であり、そして細胞呼吸プロセス、酸化的プロセスおよび代謝プロセスの広範な集団の直接的および間接的生化学的調節を提供する。このようなプロセスは、電子輸送鎖(ETC)活性を含み、これは、アデノシン三リン酸(ATP)の形態の代謝エネルギーを生成するための酸化的リン酸化を駆動し、そしてまた、細胞内カルシウムホメオスタシスにおけるミトコンドリアの中心的な役割を強調する。

【0003】

ミトコンドリアの超構造的特徴は、オルガネラと細胞質ゾルとの間の界面として機能する外部ミトコンドリア膜、複数の部位で外部膜への付着を形成するようである高度に折り畳まれた内部ミトコンドリア膜、および2つのミトコンドリア膜の間の膜間空間の存在を明らかにする。内部ミトコンドリア膜内のサブコンパートメントは、一般に糸粒体基質といわれる。(総説について、例えば、Ernstlerら、1981、J. Cell Biol. 91:227を参照のこと)。内部ミトコンドリア膜の包囲物(infolding)として生じると本来仮定される、クリスタは、最近、3次元電子断層撮影法を使用して、ネットワークを形成し得、そして開口した円形(30nmの直径)のジャンクションによって内部膜に接続され得る管状コンジットを含むと特徴付けられている(Perkinsら、1997、Journal of Structural Biology 119:260)。外部膜は、約10kDa未満の分子量を有するイオン性基質および非イオン性基質を自由に透過可能であるが、この内部ミトコンドリア

ア膜は、多くの小分子（特定のカチオンを含む）に対して選択的で調節された透過性を示し、そして大きい（ $> \sim 10 \text{ kDa}$ ）分子に対して不透過性である。

【0004】

改変または不完全なミトコンドリア活性（ETCの任意のステップにおける不全を含むが、これに限定されない）は、「透過性変化」（PT）または「ミトコンドリア透過性変化」（MPT）と呼ばれる局破的ミトコンドリア収縮を生じ得る。ミトコンドリア機能の一般的に受容された理論に従って、適切なETC呼吸活性は、カップルした化学浸透機構によって内部ミトコンドリア膜における電気化学的ポテンシャル（ m ）の維持を必要とする。変更または不完全なミトコンドリア活性は、この膜ポテンシャルを散逸し、それによってATP合成を防止し、そして重要な生化学的エネルギー源の生成を停止させる。さらに、シトクロムcのようなミトコンドリアタンパク質は、透過性変化の後に、ミトコンドリアからしみだし得、そしてアポトーシスまたはプログラムされた細胞死（PCD）として知られる遺伝的にプログラムされた細胞自殺シーケンスを誘導し得る。

【0005】

ETC活性を媒介する5つのマルチ-サブユニットタンパク質複合体（複合体I、III、IV、およびV）のうちの4つが、内部ミトコンドリア膜に局在化し、この内部ミトコンドリア膜は、細胞中の生物学的膜のなかでも最もタンパク質リッチな膜である（75重量%）；残りのETC複合体（複合体II）は、マトリックスに位置する。ECT内で起こることが知られる少なくとも3つの別個の化学反応において、正電荷のプロトンは、糸粒体基質から、内部膜を横切って、膜間空間に移動する。荷電種のこの不均衡は、約220mVの電気化学ポテンシャル（「プロトン移動力」とよばれる）を生成し、このポテンシャルは、しばしば、表記 m または m によって表され、そして内部ミトコンドリア膜を横切る電氣的ポテンシャルおよびpH差の合計を表す（例えば、Ernst et al., 1981 J. Cell Biol. 91:227sおよびそこに引用される参考文献を参照のこと）。

【0006】

この膜ポテンシャルは、ETC複合体VによってATPを得るために、アデノ

シンニリン酸 (ADP) がリン酸化される (プロトンのマトリックスへの輸送と化学量論的に「カップルした」プロセス) 場合に生成されるリン酸結合に寄与するエネルギーを提供する; m はまた、細胞質ゾル Ca^{2+} のミトコンドリアへの流入のための駆動力である。通常の代謝条件下で、内部膜は、膜間空間からマトリックスへのプロトンの移動に対して非常に非透過性であり、ETC 複合体 V を主要な手段として残し、それによって、プロトンがマトリックスに戻り得る。しかし、内部ミトコンドリア膜の整合性が妥協される (変更されたミトコンドリア機能と関連する疾患に付随し得る MPT の間に起こるような) 場合、プロトンは、ATP を生成することなく複合体 V のコンジットを回避し得、これによって、「カップルしていない」呼吸を回避し得る。なぜなら、電子移動および付随するプロトンポンピングは、ATP を生じないからである。従って、ミトコンドリア透過性変化は、ミトコンドリア膜「細孔」の開口 (特に、ETC および m がカップルされないプロセス) に関係し、 m は減少し、そしてミトコンドリア膜は、小さい (例えば、イオン性 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 H^+) および大きい (例えば、タンパク質) の両方の溶質に対する透過性を選択的に調節する能力を失う。

【0007】

ミトコンドリア透過性変化「細孔」は、別個のアセンブリまたはマルチサブユニット複合体でなくてもよく、そしてこの用語は、代わりに、任意のミトコンドリア分子成分 (例えば、ミトコンドリア膜自体を含む) をいい、この成分は、このような調節機能が、MPT の間に損なわれる内部膜選択的透過性を調節する。ミトコンドリア分子成分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸またはそれらの誘導体; 脂質、脂肪酸など、またはそれらの誘導体; 炭水化物、サッカリドなど、またはそれらの誘導体; 核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン、ピリミジンまたは関連分子、あるいはそれらの誘導体であり得るか; またはミトコンドリアの構成要素である任意の他の生物学的分子であり得る。ミトコンドリア透過性変化細孔成分 (これはまた、ミトコンドリア細孔成分といわれる) は、上記のようなミトコンドリア膜の選択的な透過性特徴を調節する任意のミトコンドリア分子成分 (m を確立する原因であるものおよび MPT 間に機能

的に改変されたものを含む)であり得る。ミトコンドリア細孔成分はまた、MPTを制御する様式で、例えば、他のミトコンドリア細孔成分との一過性または安定な会合を介して、ミトコンドリアと相互作用する因子を含み得る。このような因子の例としては、シクロフィリン(以下により詳細に記載される)、カルシウム調節シクロフィリンリガンド(CAML、例えば、以下の表1、およびそこに引用される参考文献を参照のこと)、およびBcl-2(例えば、Greenら、1998 Science 281:1309)、Bax(Marzoら、1998 Science 281:2027)およびBak(Naritaら、1998 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:14681)を含むBcl-2ファミリーのメンバーが挙げられる。

【0008】

理論に束縛されることを望まないが、この細孔が、例えば、特定のミトコンドリアおよび/または細胞質ゾルタンパク質、ならびに可能な他の分子種のアセンブルまたは凝集によって、ミトコンドリア膜に形成される物理的に別個のコンジットであるか否か、あるいは「細孔」の開口が、ミトコンドリア膜の多孔性における一般的な増加を単に表し得るか否かは、未解決である。任意の事象において、特定のミトコンドリア分子成分がMPT機構に寄与し得、例えば、本明細書中に記載されるETC成分または他のミトコンドリア成分を含む。例えば、MPT機構に寄与するようであるミトコンドリア透過性変化細孔成分のいくつかの非限定的な例は、遺伝子産物の以下のファミリーのメンバーを含む(例えば、以下の表1およびそこに引用される参考文献を参照のこと): アデニンヌクレオチドトランスロケーター(ANT); 末梢ベンゾジアゼピンレセプター(PBzR; McEneryら、1992 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3170); PBzR-関連タンパク質(PRAX); 電圧依存性アニオンチャネル(VDAC、ポーリンとしても公知); シクロフィリン(Cyp); カルシウム調節シクロフィリンリガンド(CAML); ミトコンドリアカルシウムユニポーター、ミトコンドリア関連ヘキソキナーゼおよびミトコンドリア膜間クレアチンキナーゼ。

【0009】

MPTは、ミトコンドリア遺伝子、遺伝子産物または下流メディエーター分子および/またはミトコンドリア内遺伝子、遺伝子産物または下流メディエーターの直接的または間接的効果から生じ得る。MPTはまた、他の既知また未知の原因から生じる。ミトコンドリアポテンシャルの損失は、変更されたミトコンドリア機能と関連した疾患（変性疾患を含む）の進行における重要な事象であり得る。

【0010】

ミトコンドリア欠損は、変更されたミトコンドリア機能と関連する疾患の病因に有意に寄与し得る。このような欠損は、ミトコンドリアDNAに存在する別個のミトコンドリアゲノム（すなわち、ミトコンドリア染色体）および/またはミトコンドリア内ゲノム（核染色体DNAおよび他のミトコンドリア内DNAを含む）に関連し得る。例えば、ミトコンドリア成分の構造および/または機能的特性における変更（遺伝的因子および環境的因子に由来する変更または細胞代償機構に由来する変更を含む）は、変更されたミトコンドリア機能と関連した任意の疾患の病原において役割を果たし得る。多くの変性疾患は、ミトコンドリア機能における変更によって引き起こされるか、またはその変更に関連すると考えられる。これらとしては、アルツハイマー病（AD）；真性糖尿病；パーキンソン病；ハンティングトン病；失調症；レーバー遺伝性視神経障害；精神分裂病；ミトコンドリア脳障害、乳酸アシドーシスおよび発作（MELAS）；癌；乾癬；過剰増殖性障害；ミトコンドリア性糖尿病および難聴（MIDD）およびミオクロヌス癲癇ぼろ赤筋線維症候群（myoclonic epilepsy ragged red fiber syndrome）が挙げられる。変更されたミトコンドリア機能と関連したさらなる疾患の広範なリストは、広がり続ける。なぜなら、異常なミトコンドリア活性またはミト核（mitonuclear）活性が、特定の疾患プロセスにおいて、関連付けられるからである。

【0011】

ADおよび変更したミトコンドリア機能に関連する潜在的な他の疾患の特徴的な症状は、病気に冒された特定の組織における選択された細胞集団の死であり、これは、アポトーシス（これはまた、「プログラムされた死」またはPCDとい

われる)から生じる。ミトコンドリア機能不全は、種々の細胞型におけるアポトーシスを導く事象のカスケードにおいて重要であると考えられ(Kroemerら、FASEB J. 9:1277-87、1995)、そしてAD脳の神経細胞におけるアポトーシス細胞死の原因であり得る。変更されたミトコンドリア的
症状は、PCDにおける最も初期の事象内であり得(Zamzamiら、J. Exp. Med. 182:367-77、1995; Zamzamiら、J. Exp. Med. 181:1661-72、1995)、そしてこのような変更されたミトコンドリア機能から生じる上昇した反応性酸素種(ROS)レベルは、アポトーシスカスケードを開始し得る(Aussererら、Mol. Cell. Biol. 14:5032-42、1994)。

【0012】

従って、増殖細胞中でのエネルギー生成におけるそれらの役割に加えて、ミトコンドリア(または、少なくともミトコンドリア成分)は、アポトーシスに関与する(Newmeyerら、1994、Cell 79:353-364; Liuら、1996、Cell 86:147-157)。アポトーシスはまた、明らかに、特に神経系の正常な発達および免疫系の適切な機能化を必要とする。さらに、いくつかの疾患状態は、アポトーシスの不十分なレベル(例えば、癌、自己免疫疾患)または過剰なレベル(例えば、発作損傷、AD関連神経変性)のいずれかに関連すると考えられる。アポトーシスの一般的な総説およびそこでのミトコンドリアの役割について、GreenおよびReed(1998、Science 281:1309-1312)、Green(1998、Cell 94:695-698)、およびKromer(1997、Nature Medicine 3:614-620)を参照のこと。従って、アポトーシス事象(ミトコンドリア成分と関連するものを含む)に影響を及ぼす薬剤は、種々の緩和的用途、予後用途および治療用途を有し得る。

【0013】

アデニンヌクレオチドトランスロケーター(ANT)は、本明細書中に提供されるような1つの特定のミトコンドリア細孔成分の例である。ANT(内部ミトコンドリア膜の主要な成分であるポリペプチドをコードする核)より、内部ミト

コンドリア膜を横切るADPおよびATPの輸送を媒介される。例えば、ANTは、内部ミトコンドリア膜を横切る化学量論的ATP/プロトン交換または同時輸送を媒介すると考えられ、そしてANTインヒビター（例えば、アトラクチロシドまたはボンクレキン酸）が、特定の条件下でMPTを誘導する。それらの組織発現パターンが異なる3つのヒトANTアイソフォームが記載され、そして他の哺乳動物ANTホモログが記載されている（例えば、Wallaceら、1998、*Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal, Howell and Bodis-Wollner編、Wiley-Liss、New York、283-307頁、およびそこに引用される参考文献を参照のこと）。ANTはまた、ミトコンドリア透過性変化細孔（上記のようにアポトーシスプロセスにおける重要な調節的役割を演じるCa²⁺調節内部膜チャネル）の重要な分子成分として関係付けられる。

【0014】

高度に保存されたタンパク質のシクロフィリンファミリーのメンバーは、本明細書中に提供されるようなミトコンドリア細孔成分の例を提供し、この成分は、上記のように、MPTを調節する様式で、他のミトコンドリア細孔成分と、安定にまたは一過的に相互作用し得る因子である。シクロフィリン(Cyp)は、全ての生物において発現される遍在的なタンパク質のファミリーである。全てのCypファミリーメンバーは、約109アミノ酸の保存コアを共有するが、オルガネラおよび膜輸送において機能する、固有の伸長において互いに異なる（例えば、Walshら、1992 *J. Biol. Chem.* 267:13115-18）。少なくとも8個のヒトCypアイソフォームが知られており、これは、単一ドメインおよび2ドメインシクロフィリンを含む（例えば、Taylorら、1997 *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67:155-81）。別個のアイソフォーム（細胞質アイソフォーム、小胞体(RE)アイソフォーム、ミトコンドリアアイソフォーム、および細胞表面アイソフォームを含む）は、異なる細胞コンパートメントに局在する（Handlerら、*EMBO J.* 6:947-50、1987；Priceら、*Proc. Natl. Acad*

e. Sci. USA 88:1903-07, 1991; Bergsmaら J. Biol. Chem. 266:23204-14; Cacalanoら、Proc Natl Acad Sci USA 89:4353-57, 1992)。例えば、以下により詳細に記載されるように、シクロフィリンD (CypD) は、ミトコンドリア透過性を調節し得る別の分子である。

【0015】

シクロフィリンは、細胞内の複数の機能を実行すると考えられる。例えば、Cypは、ペプチドおよびタンパク質におけるペプチジルプロイル結合のシスおよびトランス異性体の相互変換を触媒し、それによって、ペプチジルプロイル結合の異性体化が速度制限されるタンパク質の折り畳みを容易にする(例えば、Galat、Eur J. Biochem. 216:689-707, 1993; Fischerら、Biochem. 29:2205-2212, 1990; Stamnesら、Cell 65:219-27, 1991を参照のこと)。このペプチジルプロイルシス-トランス-イソメラーゼ活性が、免疫抑制剤シクロスポリンAによってブロックされ得る(例えば、Frumanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3741-45, 1992)。Cypファミリーメンバーはまた、完全に折り畳まれた機能的タンパク質との複合体を形成することによって、タンパク質の活性を媒介するようである(例えば、Jaschkeら、J. Mol. Biol. 277:763-69, 1998; Rajczkら、J. Biol. Chem. 268:13187-92, 1993; Wuら、J. Biol. Chem. 270:14209-19; Hollowayら、J. Biol. Chem. 273:16346-50, 1998; Frankeら、Adv. Exp. Med. Biol. 374:217-28, 1995を参照のこと)。

【0016】

CypDは、今日まで同定されているCypファミリーの唯一のミトコンドリアのアイソフォームである。ヒトCypDポリペプチドは、207アミノ酸長であり、そしてCypDポリペプチドをミトコンドリア膜を通過させてマトリクスへ輸送する作用を有し得る、NH₂末端の疎水性伸張を有する(Bergsma

ら、*J. Biol. Chem.* 266:23204-14、1991)。CypDは、電位依存性アニオンチャンネル(VDAC)およびANTとの相互作用によって、ミトコンドリアの外膜と内膜との間の接触部位において、ミトコンドリア透過性変化細孔(mitochondrial permeability transition pore)の形成に関与すると考えられている(Cromptonら、*Eur. J. Biochem.* 258:729-35、1998; Woodfieldら、1998、*Biochem. J.*、336:287-90)。ANTに対するCypDの結合はまた、孔複合体を、 Ca^{2+} 濃度に対して感受性にし得る(Halestrapら、*Biochem. Biophys. Acta.* 1366:79-94、1998)。インビトロにおいて、比較的高濃度の Ca^{2+} は、ミトコンドリア膜の透過性を増加し、低分子溶質の内膜を横切る自由拡散を生じる(例えば、Halestrapら、*Mol. Cell. Biochem.* 174:167-172、1997; Hunterら、*Arch. Biochem. Biophys.* 195:453-59、1979)。酸化的ストレス、アデニンヌクレオチドの枯渇および膜電位の減少もまた、ミトコンドリアの透過性を増加し得る(例えば、Bernardiら、*J. Bioenerg. Biomembr.* 26:509-17、1994; Zorattiら、*Biochim. Biophys. Acta* 1241:139-76、1995)。ミトコンドリア透過性変化細孔の開口は、変更したミトコンドリア機能に関連する疾患(例えば、上記の疾患)の病因における事象であり得る。例えば、MPTは、心臓バイパス外科手術、血栓崩壊、および器官の移植後に生じ得る、脈管の虚血/再灌流障害後の壊死性の細胞死に寄与し得る(例えば、Halestrapら、*Biochem. Soc. Trans.* 21:353-58、1993; Halestrapら、*Mol. Cell. Biochem.* 174:167-172、1997)。別の例として、VDAC-ANT-CypD複合体はまた、膜間腔からのアポトーゲン性(apoptogenic)タンパク質の放出を生じる、ミトコンドリア外膜の破裂に関与し得る(例えば、Petitら、*FEBS Lett.* 426:111-16、1998; Marzoら、*J. Exp. Med.* 187:1261-71、1998)。

【0017】

例えば、上記に考察した、変更したミトコンドリア機能に関連する疾患のための改善された治療を提供するために、ミトコンドリア透過性変化を変更させる薬剤は、有益であり得、そしてそのような薬剤を特異的に検出するアッセイが必要とされる。本発明は、これらの必要性を満たし、さらに他の関連する利点を提供する。

【0018】

(発明の要旨)

本発明は、ミトコンドリア透過性変化を変更する薬剤を同定し、そして使用するアッセイ、ならびに関連する組成物および方法に関する。1つの局面において、本発明は、エネルギー移動分子ポリペプチドに融合したミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチド、またはその改変体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを含む核酸発現構築物を提供する。1つの実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、アデニンヌクレオチドトランスロケーターであり、特定のさらなる局面において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ヒトANT1、ヒトANT2またはヒトANT3である。1つの実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ポーリン、ヘキソキナーゼ、クレアチンキナーゼ、PRAX、CAMLまたは末梢のベンゾジアゼピンレセプターである。本発明はまた、特定の実施形態において、エネルギー移動分子ポリペプチドに融合したシクロフィリン(cyclophilin)ポリペプチド、またはその改変体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを含む核酸発現構築物を提供する。1つの実施形態において、シクロフィリンは、シクロフィリンDであり、別の実施形態において、シクロフィリンは、ヒトシクロフィリンA、シクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCまたはヒトCyp-60である。特定の実施形態において、発現構築物は、プラスミド、コスミド、シャトルベクター、ウイルスベクターまたは複製の染色体起源を含むベクターであるベクターを含む。特定の実施形態において、ベクターは、pBAD-His、pEYFP-C1、またはpECFP-N1であるプラスミドを含む。

【0019】

本発明の特定の実施形態に従って、プロモーターは外部から制御される。ある実施形態において、エネルギー移動分子は、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、FLASH配列、またはエクオリンタンパク質である。特定のさらなる実施形態において、グリーン蛍光タンパク質は、青色シフトしたGFP、シアンシフトしたGFP、赤色シフトしたGFPまたは黄色シフトしたGFPである。特定の他の実施形態において、エネルギー移動分子は、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、FLASH配列またはエクオリンタンパク質である選択されたエネルギー移動分子の誘導体である。

【0020】

別の局面において、本発明は、エネルギー移動分子ポリペプチドに融合したミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチド、またはその改変体を含むポリペプチドを提供する。特定の実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、アデニンヌクレオチドトランスロケーターであり、特定のさらなる局面において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ヒトANT1、ヒトANT2またはヒトANT3である。特定の他の実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ポーリン、ヘキソキナーゼ、クレアチンキナーゼ、PRAX、CAMLまたは末梢のベンゾジアゼピンレセプターである。別の実施形態において、本発明は、エネルギー移動分子ポリペプチドに融合したシクロフィリン(cyclophilin)ポリペプチド、またはその改変体を含むポリペプチドを提供する。特定の実施形態において、シクロフィリンは、シクロフィリンDであり、別の特定の実施形態において、シクロフィリンは、ヒトシクロフィリンA、シクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCまたはヒトCyp-60である。特定の実施形態において、エネルギー移動分子は、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、FLASH配列またはエクオリンタンパク質である。特定のさらなる実施形態において、グリーン蛍光タンパク質は、青色シフトしたGFP、シアンシフトしたGFP、赤色シフトしたGFPまたは黄色シフトしたGFPである。

【0021】

別の局面において、本発明は、ミトコンドリア透過性変化を変更する薬剤を同

定するための宿主細胞を提供し、この宿主細胞は：(a)第1のエネルギー移動分子またはその改変体をコードするポリヌクレオチドに融合した、ミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを含む第1の核酸発現構築物；および(b)第2のエネルギー移動分子またはその改変体をコードするポリヌクレオチドに融合した、シクロフィリンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを含む第2の核酸発現構築物、を含み、ここで、シクロフィリンポリペプチドに対するミトコンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドの結合は、第1のエネルギー移動分子と第2のエネルギー移動分子との間の検出可能なエネルギー移動を生じる。特定の実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、アデニンヌクレオチドトランスロケーターであり、特定のさらなる実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ヒトANT1、ヒトANT2またはヒトANT3である。別の特定の実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ポーリン、ヘキソキナーゼ、クレアチンキナーゼ、P R A X、C A M Lまたは末梢のベンゾジアゼピンレセプターである。特定の実施形態において、シクロフィリンは、ヒトシクロフィリンA、シクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCまたはヒトC y p - 6 0である。特定の他の実施形態において、宿主細胞は、原核生物細胞であり、特定の他の実施形態において、宿主細胞は、真核生物細胞である。特定のさらなる実施形態において、真核生物細胞は、293細胞、COS-7細胞、Sf9細胞、CHO細胞、Hep-2細胞、MDC K細胞またはジャーカット細胞(Jurkat細胞)である。特定の他の実施形態において、第1および第2のエネルギー移動分子は、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、青色シフトしたGFP、シアンシフトしたGFP、赤色シフトしたGFPまたは黄色シフトしたGFPである。特定の別の実施形態において、第1および第2のエネルギー移動分子は、300nm~650nmの範囲の波長において最大励起を有し、そして350nm~675nmの範囲の波長において最大発光を有する。特定の他の実施形態において、第1のエネルギー移動分子および第2のエネルギー移動分子は、異なる波長における最大励起および最大発光を有する。なお別の特定の実施形態において、少なくとも1つの核酸発現構築物は、

染色体外にあり、一方、他の実施形態において、少なくとも1つの核酸発現構築物は、宿主細胞染色体に組み込まれている。特定のさらなる実施形態において、宿主細胞染色体は、ミトコンドリア染色体である。

【0022】

本発明のなお別の局面において、ミトコンドリア透過性変化(MPT)を変更する薬剤についてのスクリーニング方法を提供し、この方法は、以下の工程：(a)上記の本発明に従って、ミトコンドリアを含む宿主細胞を、候補薬剤およびMPTのインデューサーと接触させる工程；(b)その細胞を、励起エネルギーに曝露する工程；(c)第1および第2のエネルギー移動分子間のエネルギー移動のレベルを検出する工程；(d)エネルギー移動のレベルを、候補薬剤の非存在下において生成された第1の参照レベルと比較し、それによってMPTを変更する薬剤を同定する工程、を包含する。1つの実施形態において、宿主細胞を、さらにMTPのインヒビターと接触させ、第2の参照レベルを生成し、そしてさらなる実施形態において、MTPのインヒビターは、低pH、ミトコンドリアの高い膜電位のインデューサー、またはサイクロスポリンAである。別の実施形態において、MTPのインデューサーは、アトラクチロシド(atractyloside)またはボンクレキン酸(bonkrekinic acid)である。別の実施形態において、MTPのインデューサーは、ミトコンドリア内のCa²⁺濃度を増加する化合物を含み、そして特定のさらなる実施形態において、この化合物は、イオノフォア、イオノマイシン、タブシガルギン、アミノ酸神経伝達物質、グルタメート、N-メチル-D-アスパラギン酸、カルバコール、アポトーゲン(apoptogen)、またはカリウム脱分極のインデューサーである。別の実施形態において、宿主細胞を、酸化的ストレスのインデューサーにさらに接触させ、そして特定のさらなる実施形態において、その酸化的ストレスのインデューサーは、エタクリン酸、ブチオニンスルホキシミン(buthionine sulfoximine)、ジアミド、メナジオン、t-ブチルヒドロペルオキシド、フェニル-アルシンオキシドまたは酸化窒素である。特定の他の実施形態において、候補薬剤は、第1および第2のエネルギー移動分子の間のエネルギー移動を増加し、一方、特定の他の実施形態において、候補薬剤は、第1および

第2のエネルギー移動分子の間のエネルギー移動を減少する。別の実施形態において、第1および第2のエネルギー移動分子は、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、青色シフトしたGFP、シアンシフトしたGFP、赤色シフトしたGFPまたは黄色シフトしたGFPである。いくつかの実施形態において、励起エネルギーは、300nm~650nmの範囲の波長を有する光である。他の実施形態において、第1および第2のエネルギー移動分子は、300nm~650nmの範囲の波長において最大励起を有し、そして350nm~675nmの範囲の波長において最大発光を有する。

【0023】

特定の他の実施形態において、第1のエネルギー移動分子および第2のエネルギー移動分子は、異なる波長における最大励起および最大発光を有する。特定の他の実施形態において、(a)第1のエネルギー移動分子は、400nm~500nmの範囲の波長の最大励起、および450nm~525nmの範囲の波長の最大発光を有し、そして第2のエネルギー移動分子は、450nm~525nmの範囲の波長の最大励起、および500nm~550nmの範囲の波長の最大発光を有するか、または(b)第2のエネルギー移動分子は、400nm~450nmの範囲の波長の最大励起、および450nm~500nmの範囲の波長の最大発光を有し、そして第1のエネルギー移動分子は、500nm~525nmの範囲の波長の最大励起、および525nm~550nmの範囲の波長の最大発光を有する。特定の他の実施形態において、(a)第1のエネルギー移動分子は、約433nmの波長の最大励起、および約475nmの波長の最大発光を有し、そして第2のエネルギー移動分子は、約513nmの波長の最大励起、および約527nmの波長の最大発光を有するか、または(b)第2のエネルギー移動分子は、約433nmの波長の最大励起、および約475nmの波長の最大発光を有し、そして第1のエネルギー移動分子は、約513nmの波長の最大励起、および約527nmの波長の最大発光を有する。

【0024】

本発明は、別の局面において、ミトコンドリア透過性変化(MPT)を変更する薬剤を検出するための方法を提供し、この方法は、シクロフィリンDポリペプ

チドをアデニンヌクレオチドトランスロケターポリペプチドおよび候補薬剤と、シクロフィリンD、アデニンヌクレオチドトランスロケター、および候補薬剤が相互作用するのに十分な条件および時間で接触させる工程；ならびに（b）候補薬剤の非存在下で検出される結合レベルと比較して、アデニンヌクレオチドトランスロケターポリペプチドに対してシクロフィリンDポリペプチドが結合するレベルを検出し、それからMPTを変更する薬剤を検出する工程を包含する。特定の実施形態において、シクロフィリンDポリペプチドが支持体に固定化され、特定の実施形態において、シクロフィリンDポリペプチドが融合タンパク質である。特定の他の実施形態において、アデニンヌクレオチドトランスロケターポリペプチドが、支持体に固定され、特定の実施形態において、アデニンヌクレオチドトランスロケターポリペプチドが融合タンパク質である。特定のさらなる実施形態において、融合タンパク質は、プロテアーゼ認識配列を含み、一方、特定の他のさらなる実施形態において、融合タンパク質は、レセプターに対するリガンドを含む。特定の他の実施形態において、候補薬剤は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または小分子である。いくつかの実施形態において、候補薬剤は、コンビナトリアルライブラリー内に存在する小分子である。従って、本発明はまた、特定の実施形態において、ミトコンドリア透過性変化を変更し得る薬剤を提供し、ここで、この薬剤は、ちょうど記載された方法によって同定される。特定の他の実施形態において、本発明は、ちょうど記載された方法に従って同定される薬剤と細胞を、細胞生存を調節するのに十分な条件および時間で接触させる工程を包含する。特定の他の実施形態において、本発明は、ミトコンドリア透過性変化（MPT）を変更するための方法を提供し、この方法は、ミトコンドリアをちょうど記載された方法に従って同定される薬剤と、MPTを変更するのに十分な条件および時間で接触させる工程を包含する。特定のさらなる実施形態において、ミトコンドリアは、細胞内に存在する。特定のさらなる実施形態において、細胞は、生きた生物内に存在する。他の実施形態において、細胞は、サイブリッド細胞である。

【0025】

なお別の局面において、本発明は、エネルギー移動分子に融合された、ミトコ

ンドリア透過性変化細孔成分ポリペプチドを調製するための方法を提供し、この方法は、(a) エネルギー移動分子ポリペプチドまたはその誘導体に融合されたアデニンヌクレオチドトランスロケーターポリペプチドまたはその誘導体を含む融合タンパク質をコードする核酸発現構築物を含む宿主細胞を、この融合タンパク質の発現を可能にする条件下で培養する工程；および(b) この培養物からこの融合タンパク質を回収する工程を包含する。特定の実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分がアデニンヌクレオチドトランスロケーターであり、このアデニンヌクレオチドトランスロケーターは、特定の実施形態において、ヒトANT1、ヒトANT2またはヒトANT3である。特定の他の実施形態において、ミトコンドリア透過性変化細孔成分は、ポーリン、ヘキソキナーゼ、クレアチンキナーゼ、PRAX、CAMLまたは末梢ベンゾジアゼピンレセプターである。別の実施形態において、本発明は、エネルギー移動分子に融合されるシクロフィリンポリペプチドを調製するための方法を提供し、この方法は、(a) エネルギー移動分子ポリペプチドまたはその誘導体に融合されたシクロフィリンポリペプチドまたはその誘導体を含む融合タンパク質をコードする核酸発現構築物を含む宿主細胞を、この融合タンパク質の発現を可能にする条件下で培養する工程；および(b) この培養物から融合タンパク質を回収する工程を包含する。特定の実施形態において、シクロフィリンポリペプチドは、シクロフィリンDポリペプチドであり、そして特定の他の実施形態において、シクロフィリンポリペプチドは、ヒトシクロフィリンA、シクロフィリンB、ヒトシクロフィリンCまたはヒトCyp-60である。特定の実施形態において、宿主細胞は、原核生物細胞であり、特定の他の実施形態において、宿主細胞は、真核生物細胞であり、これは、特定のさらなる実施形態において、293細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、Sf9細胞、CHO細胞、Hep-2細胞、MDCk細胞またはジャーカット細胞である。他の実施形態において、核酸発現構築物は、染色体外である。他の実施形態において、核酸発現構築物は、宿主細胞染色体に組み込まれ、これは、特定のさらなる実施形態において、ミトコンドリア染色体である。特定の他の実施形態において、融合タンパク質は、プロテアーゼについての認識配列を含み、特定の他の実施形態において、融合タンパク質は、レセプターに対するリ

ガンドを含む。

【0026】

特定の他の実施形態において、本発明は、ミトコンドリア透過性変化を変更する薬剤をスクリーニングするためのキットを提供し、これは、(a)シクロフィリンDポリペプチドまたはその誘導体；(b)単離されたアデニンヌクレオチドトランスロケーターポリペプチドまたはその誘導体；および(c)前出のポリペプチドの少なくとも1つに特異的に結合する検出試薬を含む。特定の実施形態において、シクロフィリンDポリペプチドは、支持体に固定される。特定の他の実施形態において、アデニンヌクレオチドトランスロケーターポリペプチドは、支持体に固定される。他の実施形態において、検出試薬は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。別の実施形態において、本発明は、ミトコンドリア透過性変化(MPT)を変更する薬剤をスクリーニングするためのキットを提供し、これは、(a)宿主細胞；(b)第1核酸発現構築物(第1エネルギー移動分子またはその改変体に融合されるアデニンヌクレオチドトランスロケーターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されるプロモーターを含む)；および(c)第2核酸発現構築物(第2エネルギー移動分子またはその改変体に融合されるシクロフィリンDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されるプロモーターを含む)を含む。さらなる実施形態において、宿主細胞は、原核生物細胞であり、異なるさらなる実施形態において、宿主細胞は、真核生物細胞であり、これは、特定のさらなる実施形態において、293細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、Sf9細胞、CHO細胞、Hep-2細胞、MDC K細胞またはジャーカット細胞である。特定の他の実施形態において、第1および第2のエネルギー移動分子は、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、青色シフトGFP、シアンシフトGFP、赤色シフトGFP、または黄色シフトGFPである。

【0027】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明白である。本明細書中に開示されるすべての参考文献は、それぞれ個別に援用されるように、その全体において参考として本明細書中に援用される。

【0028】

(発明の詳細な説明)

上に記載されるように、本発明は、ミトコンドリア透過性変化(MPT)を変更する薬剤を同定する際における使用のための組成物およびアッセイを提供する。従って、本発明は、一般的に、ミトコンドリア透過性変化の変更が、本明細書中に記載される、エネルギー移動分子融合ポリペプチドを提供するように改変されたミトコンドリア透過性変化細孔成分の選択された対間の相互作用を検出することによって推定および/または観測され得るという驚くべき発見に関する。従って、本発明は、このような相互作用の開発を意図し、ここで、任意の対のミトコンドリア細孔成分ポリペプチドが、本発明の開示に従って、本明細書中で提供される方法における使用について適切なエネルギー移動分子に融合され得る。本開示は、種々の実施形態を記載し、ここで、相互作用は、ミトコンドリア透過性変化細孔成分(特定の実施形態において、アデニンヌクレオチドトランスロケターポリペプチドである)とシクロフィリンポリペプチドとの間で検出され得るが、本発明は、第1ミトコンドリア細孔成分と第2ミトコンドリア細孔成分との間の相互作用に限定されることは意図しないが、一般的にこれらに関する。

【0029】

従って、例えば、本発明は、特定の実施形態においてより詳細には、アデニンヌクレオチドトランスロケター(ANT)およびシクロフィリンD(CypD)ポリペプチド(例えば、融合タンパク質);このようなポリペプチドをコードする核酸発現構築物;およびこのようなポリペプチドおよび/またはその複合体と相互作用する天然または合成の薬剤(例えば、小分子、ANTリガンドおよびCypDリガンド)を検出するためのスクリーニング方法に関する。しかし、本明細書中に開示される種々の実施形態の精神および範囲は、ANT-シクロフィリン相互作用に限定されることは意図されず、本明細書中に提供される任意のミトコンドリア細孔成分間の相互作用を包含することを意図し、これは、例えば、MPTを調節する様式で、他のミトコンドリア細孔成分との一過性または安定な会合によってミトコンドリアと相互作用する因子である多孔性成分に關与する相互作用を含む。

【0030】

上に記載されるように、ミトコンドリア内膜の選択的透過性は、膜に沿った電気化学的電位を維持するためにETCの適切な機能を必要とする。アデニンヌクレオチドトランスロケーター(ANT)は、ATP/プロトン交換を媒介するかまたはミトコンドリア内膜を共輸送し、そして特定の条件下において、MPT「細孔」の形成を増強するためにシクロフィリンD(CypD)に特異的に結合すると考えられる。これらおよび他のミトコンドリア分子成分のMPTにおける役割およびこのような成分に影響する因子は、本明細書中に提供される方法を使用して調査され得る。特に好ましい局面において、本発明は、ANTとCypDとの間の相互作用が、MPTを変更する薬剤をスクリーニングし、同定するために検出される結合および機能アッセイに関する。

【0031】

(アデニンヌクレオチドトランスロケーター(ANT)およびシクロフィリンD(CypD)ポリペプチド)

本発明は、一般的に、アデニンヌクレオチドトランスロケーター(ANT)およびシクロフィリンD(CypD)ポリペプチド(例えば、融合タンパク質)に関する。このようなポリペプチドは、任意のANTまたはCypDのアイソフォームを含み得る。本発明はさらに、ANTコード核酸発現構築物および/またはCypDコード核酸発現構築物を含む宿主細胞を培養することによって、組換えANTおよびCypDポリペプチド(融合タンパク質を含む)を産生するための方法を提供する。本発明はまた、単離された組換えANTおよびCypDポリペプチド(例えば、融合タンパク質)を使用してMPTを変更する薬剤をスクリーニングするための方法に関する。

【0032】

本発明のポリペプチドおよび核酸は、好ましくは、単離された形態で提供され、そして特定の好ましい実施形態において、均質になるまで精製される。本明細書中で使用されるように、用語「単離された」は、材料が、そのもともとの環境(例えば、それが天然に存在する場合には、天然の環境)から取り出されることを意味する。例えば、生存にしている動物中に存在している天然に存在する核酸

またはポリペプチドは、単離されないが、天然系に同時に存在している材料のいくつかまたは全てから分離された同じ核酸またはポリペプチドは単離される。このような核酸は、ベクターの一部であり得、そして/あるいは、このような核酸またはポリペプチドは、組成物の一部であり得、そしてなお、このようなベクターまたは組成物が、その天然の環境の一部ではないように、単離される。

【0033】

本明細書中に提供されるANTおよびCypDポリペプチドは、図1および図8（配列番号 および ）の一つ以上の推定アミノ酸配列を含み得る。あるいは、このようなポリペプチドは、本明細書中に提供されるANT/CypD核酸発現構築物によってコードされる一つ以上のポリペプチド配列を含み得る。このようなポリペプチド配列のフラグメント、アナログおよび誘導体を含むポリペプチドならびに融合タンパク質が、さらに、意図される。本明細書中において使用されるように、用語「フラグメント」「誘導体」および「アナログ」は、ANTおよびCypDポリペプチドまたは融合タンパク質を参照する場合、このようなポリペプチドと本質的に同じ生物学的機能または活性を保有する任意のANTおよびCypDポリペプチドまたは融合タンパク質をいう。例えば、アナログは、活性なANTおよび/またはCypDポリペプチドを産生するように切断によって活性化され得るプロタンパク質であり得る。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチドまたは合成ポリペプチドであり得、好ましくは、組換えポリペプチドである。

【0034】

ANTまたはCypDポリペプチドのフラグメント、誘導体、またはアナログ（核酸発現構築物によってコードされるANTおよびCypDのポリペプチドおよび融合タンパク質を含む）は、(i) 1つ以上のアミノ酸残基が、保存されたかまたは保存されていないアミノ酸残基（好ましくは、保存されたアミノ酸残基）と置換されているものであり、そしてそのような置換されたアミノ酸残基は、その遺伝子コードによってコードされたものであってもなくてもよく、(ii) 1つ以上のアミノ酸残基が値喚起を含むもの、(iii) ANTおよび/またはCypDポリペプチドが別の化合物（例えば、そのポリペプチドの半減期を増大

させる化合物（例えば、ポリエチレングリコール）と融合されているもの、および/または（i v）さらなるアミノ酸がANTおよび/またはC y p Dポリペプチドに融合したもの（以下により詳細に記載されるANTおよび/またはC y p Dポリペプチドの検出に用いられる、および/またはANT / C y p Dポリペプチドまたはプロタンパク質の配列の精製のために用いられるアミノ酸配列を含む）であり得る。このようなフラグメント、誘導體、およびアナログは、本明細書の教示から当業者の技術範囲内であると考えられる。

【0035】

本明細書において提供される特定の方法内において、細菌、昆虫、酵母、および/または哺乳動物の発現系は、検出可能な組換えANTおよび/またはC y p Dポリペプチドの顕著な量での信頼性のある産生のために設計され得る。特定の実施形態において、組換えANTおよびC y p D融合タンパク質を産生するための組成物および方法が提供され、ここで、その融合タンパク質は、エネルギー移動分子ポリペプチド配列を含む。これらおよび他の特定の実施形態内において、外部的に調節されるプロモーターに由来する検出可能な組換えANT融合タンパク質およびC y p D融合タンパク質を産生するための組成物および方法が提供される。特定の好ましい実施形態において、その発現系の設計には、少なくとも1つのミトコンドリアを含む宿主細胞の使用が含まれる。

【0036】

ANTおよびC y p Dポリペプチド（例えば、融合タンパク質）は、インタクテナ宿主細胞内で、またはインタクテナ細胞小器官（例えば、ミトコンドリア、細胞膜または細胞内粒子）の調製において、有用であり得る。このようなポリペプチドは、さらに、細胞ホモジネートまたは溶解物、亜ミトコンドリア粒子、単層膜粒子および多層膜粒子、または他の調製物を含むがこれらに限定されない破壊された細胞調製物において有用であり得る。あるいは、ANTおよびC y p Dポリペプチドは、組換え細胞培養物から、硫酸沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマ

トグラフィーを含む方法によって、回収および精製され得る。タンパク質のリフォーリング工程は、必要に応じて、機能的タンパク質のコンフィギュレーションを完了するにおいて使用され得る。最後に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、最終精製工程のために使用され得る。

【0037】

本発明のポリペプチドは、天然に精製された産物、化学的合成手順の産物、または原核生物または真核生物の宿主（例えば、培養中の細菌、酵母、高等植物、昆虫、または哺乳動物細胞を含む）からの組換え技術の産物であり得る。組換え産生手順に使用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドおよび融合タンパク質は、グリコシル化されていてもよいし、グリコシル化されていなくてもよい。ポリペプチドはまた、開始メチオニンアミノ酸残基を含み得る。

【0038】

本明細書において提供される組成物および方法は、植物および動物のANTを含む任意の原核生物または真核生物ANTに適合され得、これはさらにアミノ酸配列および/またはコードする核酸が当業者に公知の例えば、酵母、脊椎動物および哺乳動物ANT（げっ歯類、非ヒト霊長類、およびヒトANT）を含み得る。それらの組織発現パターンにおいて異なる3つのヒトANT（huANT）アイソフォームが記載されている（Stepienら、1992 J. Biol. Chem. 267:14592を参照のこと；また、Wallaceら、1998 Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases. Beal, Howell and Bodis-Wollner編、Wiley-Liss, New York、283-307頁、およびそこで引用されている文献も参照のこと）。cDNAの核酸配列（huANT1 cDNAについては、Neckelmanら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 84:7580-7584（1987）；huANT2 cDNAについては、Battiniら、J. Biol. Chem. 262:4355-4359（1987）；およびhuANT3 cDNAについては、Cozensら、J. Mol. Biol. 206:261-280（1989））、およびこれらの3つのヒトANTア

イソフォームについてのアミノ酸配列が報告されている；そしてANT遺伝子配列は、多数の種について決定されている（例えば、huANT1ゲノムDNAについてのLiら、1989 J. Biol. Chem. 264:13998；huANT2についてのLiewら、GenBank Acc. No. N86710；ラットANT遺伝子についてのShinoharaら、1993 Biochim. Biophys. Acta 1152:192を参照のこと；その他については、例えば、Kuら、1990 J. Biol. Chem. 265:16060；Adamsら、1991 Science 252:1651；およびWongら、1971を参照もまたこと）。哺乳動物種の中でANT配列は、高度に保存されている；例えば、アミノ酸レベルにおいて、マウスANT1およびANT2は、ヒトANT2と98%の配列同一性を示す。少なくとも29のANTタンパク質の全長アミノ酸配列が、現在までに、種々の動物および植物種から報告されており、これらのうちのほとんどが核酸配列から推定されている（Fioreら、1998 Biochimie 80:137-150）。

【0039】

同様に、本発明の組成物および方法はまた、任意の原核生物または真核生物Cyp（例えば、CypD（植物および動物のCypDを含む）（これはさらに、そのアミノ酸配列および/またはコードする核酸が当業者に公知である例えば、酵母、寄生生物、無脊椎動物、げっ歯類、およびヒトのCypDを含む（例えば、前掲の表1を参照のこと）））に適合され得る。3つのヒトCypD（Cyp3としても知られる）アイソフォーム（例えば、Bergsmaら、1991、J. Biol. Chem. 266:23204-14、ヒトCyp3のcDNAについてはGenBank Acc. No. M80254、および推定アミノ酸配列についてはAcc. No. AAA58434を参照のこと）の核酸およびアミノ酸配列に加えて、他の種由来のCypD配列が報告されている（例えば、ラットCypDのcDNAについてはGenBank Acc. No. U68544、および推定アミノ酸配列についてはNo. AAB08453を参照のこと）。

【0040】

本発明のポリペプチドには、当該分野で公知の配列と同一または類似のアミノ酸配列を有するANTおよびCypDポリペプチドおよび融合タンパク質が含まれる。例えば、例示のためであって限定するものではないが、図1、2、7、および8（配列番号 ）のヒトANTおよびCypDポリペプチドは、本発明にしたがって使用されることが意図され、図1、2、7、および8のポリペプチドおよびそのようなポリペプチドの部分に対して少なくとも70%の類似性（好ましくは、70%の同一性）、そしてより好ましくは、図1、2、7、および8のポリペプチドおよびそのようなポリペプチドの部分に対して90%の類似性（より好ましくは、90%の同一性）、そしてなおより好ましくは、図1、2、7、および8のポリペプチドおよびそのようなポリペプチドの部分に対して95%の類似性（なおより好ましくは、95%の同一性）を有するポリペプチドもまた本発明にしたがって使用されることが意図され、ここで、このようなANTおよびCypDポリペプチドの部分は、一般的に、少なくとも8個の連続するアミノ酸、好ましくは、少なくとも12個の連続するアミノ酸、より好ましくは、少なくとも20個の連続するアミノ酸、より好ましくは、少なくとも30個の連続するアミノ酸、そしてより好ましくは、少なくとも50個の連続するアミノ酸を含有する。

【0041】

2つのポリペプチドの間の「類似性」は、一般に、アミノ酸配列およびそのポリペプチドの保存されたアミノ酸置換を、第二のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。本発明のポリペプチドのフラグメントまたは部分は、ペプチド合成により対応する全長ポリペプチドを産生することによって利用され得る；したがって、そのフラグメントは、全長ポリペプチドを産生するための中間体として利用され得る。本発明の核酸のフラグメントまたは部分は、本発明の全長核酸を合成するために使用され得る。

【0042】

上記のように、本発明はANTおよびCypDポリペプチド（ヒトANTおよびヒトCypDポリペプチドならびにANT融合タンパク質およびCypD融合タンパク質を含む）を産生および単離するための方法の一部関する。ANTポリ

ペプチドは、一般に、ANTポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを有する核酸発現ベクターを使用して、有用な量で産生され得る。同様に、CypDポリペプチドは、一般に、CypDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを有する核酸発現ベクターを使用して有用な量で産生され得る。好ましい実施形態において、核酸発現構築物は、本発明において提供されるようにエネルギー移動分子ポリペプチドに融合したANTまたはCypDポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする。本明細書に記載されるANTおよびCypDをコードする核酸発現構築物は別々のベクターであり得るが、本発明はそのように限定されることを意図せず、当業者は、容易にANTおよびCypDポリペプチドおよび/または融合タンパク質が単一の核酸構築物上に配置され得ることを理解する。例えば、単一の核酸発現構築物は、単一のプロモーターに作動可能に連結されたANTおよびCypD融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有し得、あるいは融合タンパク質をコードする各ポリヌクレオチド配列は、それ自身の作動可能に連結したプロモーターを有し得る。いずれかの構築物において、両方の融合タンパク質は、実質的に同時に発現され得る。

【0043】

特定の実施形態において、例えば、本発明は、本明細書において提供されるように、組換えANTおよびCypDポリペプチドおよび融合タンパク質を、外部から制御されるプロモーターを使用することによって産生するための組成物および方法を提供する。他の実施形態において、例えば、本発明は、例えば、CypDポリペプチドに対してANTポリペプチドの異なる産生レベルを可能にするために、1つ以上の外部的に制御されるプロモーターを含むように適合され得る。

【0044】

本発明はまた、全長タンパク質およびポリペプチド、フラグメント、およびその改変体を含み、そしてさらに本明細書において提供されるANT融合タンパク質およびCypD融合タンパク質を含むANTおよびCypDポリペプチドの使用に一部関する。以下により詳細に記載される特定の好ましい実施形態において、ヒトANTおよびCypDポリペプチドは、種々の結合アッセイ、スクリーニ

ングアッセイ、機能的アッセイなどにおいて使用され得る。特定の特に好ましい実施形態において、ANT融合タンパク質は、エネルギー移動分子ポリペプチドを含む、そしてCy p D融合タンパク質は、ANT融合タンパク質に存在するものとは区別されるエネルギー移動分子ポリペプチドを含み、ここで、適切なエネルギー移動分子ポリペプチドの選択は、本明細書において提供されるように行われる。組換えANTおよびCy p Dポリペプチドの発現は、このようなアッセイに老いてANTおよびCy p Dポリペプチド産物の使用を可能にするレベルで達成され得、そして本発明は、ANTとCy p Dポリペプチドとの間および/または融合タンパク質の間の相互作用を変更する因子（例えば、ANTリガンドおよびCy p Dリガンドを含む）を同定するためのアッセイ（ハイスループットアッセイを含む）を提供する。本発明はさらに、ANTおよびCy p Dポリペプチドの因子およびリガンドの一部関する。このような因子は、例えば、本明細書に記載されるものを含むがこれらに限定されない当該分野で公知のANTおよびCy p D機能を増強または減弱し得る。

【0045】

（エネルギー移動分子および融合タンパク質）

上記のように、本発明はまた、ANTおよびCy p Dポリペプチド（ANTおよびCy p D融合タンパク質を含む）を産生および単離するため、ANT、Cy p D、およびANT / Cy p D複合体と相互作用する因子を同定するための組成物および方法の一部関する。本発明の特定の局面は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）技術が、ANTとCy p D融合タンパク質との間のANT - Cy p D相互作用を検出するために使用され得るという発見に基づいている。ここで、一方の融合タンパク質は、エネルギー移動分子ポリペプチドに融合したANTポリペプチド（例えば、適切なエネルギー移動ドナーポリペプチド配列、ドメインまたは領域）を含み、そして他方の融合タンパク質は、適切なエネルギー移動アクセプターポリペプチド配列、ドメインまたは領域のようなエネルギー移動分子ポリペプチドに融合したCy p Dポリペプチドを含む。別の非限定的な例として、一方の融合タンパク質が、エネルギー移動分子ポリペプチドに融合したANTポリペプチド（例えば、適切なエネルギー移動アクセプターポリペプチド配列、ド

メイン、または領域)を含み得、そして他方の融合タンパク質が、エネルギー移動分子ポリペプチドに融合したCypDポリペプチド(適切なエネルギー移動ドナーポリペプチド配列、ドメイン、または領域)を含み得る。

【0046】

エネルギー移動ドナー分子(例えば、適切なエネルギードナーであるエネルギー移動分子ポリペプチド)のエネルギー放射スペクトルは、FRETにおいて使用するにおいて対合されるエネルギー移動アクセプター分子(例えば、適切なエネルギーアクセプターであるエネルギー移動分子ポリペプチド)のエネルギー吸収スペクトルと少なくとも部分的に重複しているべきであり、そのようにしてドナーからアクセプターへのエネルギー移動が生じ得る。代表的には、エネルギー移動ドナー分子は、エネルギー移動アクセプター分子の励起ピーク波長(ここでは、「A(ex)」)の数nm以内である放射ピーク波長(ここでは、「D(em)」)を有する。すなわち、D(em)とA(ex)との間の差異は、代表的には、約70nmから約20nm以下までであり、その差

$$= D(em) - A(ex)$$

の代表的な値は、60nm以下、50nm以下、40nm以下、30nm以下、25nm以下、20nm以下、15nm以下、10nm以下、5nm以下、または1nm以下である。

【0047】

しかし、励起または放射が波長の関数としてプロットされた場合、エネルギー移動ドナー分子またはエネルギー移動アクセプター分子としての使用のために適切である特定の化合物は、広範なピークを有し得、それにより、エネルギーが、上記のD(em)とA(ex)との間の差よりも大きな差を有する特定の対合されたエネルギー移動ドナーおよびエネルギー移動アクセプター分子間で検出可能に移動され得る。例えば、特定のドナー-アクセプター対は、それらの間のエネルギー移動が高度に非効率的である場合(すなわち、1つまたは両方のエネルギー移動ドナーおよびアクセプターが、エネルギー移動分子のための励起ピーク波長および/または放射ピーク波長から離れた波長を有するリガンドとともに使用され得る場合)でさえも、エネルギー移動ドナーおよびエネルギー移動アクセプ

ターが、検出可能なエネルギー移動が生じるために互いに充分近接領域内にある限り、本明細書において提供されるエネルギー移動方法論にとって適切であり得る。当業者は、蛍光共鳴エネルギー移動が存在する場合、適切な（すなわち、適した）エネルギー移動ドナー - アクセプター対が確立された基準および本明細書の教示に従って達成されるように、過度の実験を要することなく、容易に決定し得る。

【0048】

例えば、慣用のスクリーニングが、検出可能なFRETシグナルが生成され得るか否かを決定するために、試験溶液中で（例えば、本明細書中に提供されるような宿主細胞の非存在下で）少なくとも候補エネルギー移動ドナー分子および候補エネルギー移動アクセプター分子（例えば、本明細書中に開示されるようなドナーおよびアクセプターエネルギー移動分子ポリペプチド）を組み合わせることにより用いられ得る。特定のエネルギー移動ドナー - アクセプターポリペプチド組み合わせについて、FRETシグナルの特異的生成は、ドナーポリペプチドおよびアクセプターポリペプチドの各々が融合される機能的ドメインの結合（例えば、本明細書中に提供されるようなANTポリペプチドとCypDポリペプチドとの間の結合相互作用）に依存し得る。溶液中の検出可能なFRETシグナルのそれらの容易化について特定のこのようなドナー - アクセプター対をスクリーニングすることは、試験溶液に、機能的ドメインの性質（例えば、ANT - CypD結合を好む補因子または他の条件）の精通に基づいて当業者によって選択される少なくとも1つの適切な生体分子（例えば、タンパク質またはペプチド含有種、脂質含有種、核酸含有種、または炭水化物含有種）を添加することをさらに包含し得る。理論に縛られることを望まないが、FRETシグナルを検出するために、このようなパイロット実験において使用されるエネルギー移動ドナー分子およびアクセプター分子の濃度は、特定のこのような場合においては、本明細書中で提供されるような本発明の方法において用いられる濃度を超え得る。しかし、このようなエネルギー移動分子の同様に検出可能な濃度は、エネルギー移動分子ポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を調節するプロモーターの誘導後、本明細書中に記載のような宿主細胞において（例えば、このような宿主細胞の亜細

胞区画（例えば、ミトコンドリア）において）蓄積し得る。当業者はまた、エネルギー移動ドナー分子およびエネルギー移動アクセプター分子（例えば、エネルギー移動分子ポリペプチド）の蛍光スペクトル特性が、用いられる溶液およびサンプル条件（例えば、選択される溶媒、溶媒およびイオン強度、pH、サンプルの性質など）の関数として変動し得ることを容易に理解する。

【0049】

本発明に従う使用について適切なエネルギー移動ドナー - アクセプター対（例えば、対合したエネルギー移動分子ドナーポリペプチドおよびアクセプターポリペプチド）を選択する際に有用な別の基準は、励起エネルギー移動アクセプターにより生成した放射シグナルが、励起エネルギー移動ドナーにより生成した放射シグナルと区別可能でなければならないことである。励起ドナーからの放射シグナルは、例えば、（1）励起アクセプターからの放射シグナルの波長が、励起ドナーからの放射シグナルの波長と十分に異なるか、または（2）アクセプターが励起ドナーからの放射シグナルを消光する場合、非常に区別され得る。

【0050】

エネルギー移動ドナーおよびアクセプター分子ポリペプチドとして働き得るタンパク質の例は、「FLASH」（フルオレセイン含砒素ヘリックス結合剤）配列（Griffinら、Science 281:269-272, 1998）、またはエクオリンタンパク質もしくはグリーン蛍光タンパク質（GFP）配列（Kendallら、Trends in Biotechnology 16:216-224, 1998、およびその中で引用される文献）を含む融合タンパク質を含む。本明細書中で使用されるように、用語「グリーン蛍光タンパク質」は、野生型グリーン蛍光タンパク質（野生型GFP）、ならびに野生型GFPの青色シフト、青緑色シフト、赤色シフト、および黄色シフト誘導体（それぞれBFP、CFP、RFPおよびYFPと称される；公開PCT出願WO98/06737を参照のこと）を包含する。表2（以下の実施例17を参照のこと）は、代表的なGFPエネルギー移動分子ポリペプチドドナー - アクセプター対の例を提供し、そしてアミノ酸の一文字表記を用いて種々のGFP誘導体において示した数のアミノ酸配列位置でのアミノ酸置換の記述を包含する。表2は、これら

の GFP の励起および放射のそれぞれのピーク波長もまた示す。

【0051】

エネルギー移動分子ポリペプチド（例えば、エクオリン、GFP、またはFLASHポリペプチド）に融合されたANTポリペプチドまたはCypDポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする発現構築物を生成するために、遺伝子発現について適当なポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、（1）本明細書中で提供されるようなANTポリペプチドまたはCypDポリペプチドをコードする第一の核酸および（2）エクオリンポリペプチド、GFP誘導体またはFLASHポリペプチドをコードする第二の核酸を含むように操作され得、ここで第一の核酸および第二の核酸は、両核酸を含む共通読み枠を有するように連結される。

【0052】

以下で議論するように、このようなポリペプチドは、タンパク質 - タンパク質相互作用（結合事象（Mahajanら、Nature Biotechnology 16 : 547 - 562 , 1998を参照のこと）またはタンパク質開裂（Xuら、Nucl. Acids Res. 26 : 2034 - 2035 , 1998を参照のこと）を含む）を検出するためにFRETアッセイ内で用いられ得る。このようなアッセイは、例えば、本明細書中に提供されるように、一方のエネルギー移動分子（エネルギードナー発蛍光団）の放射スペクトルが他方のエネルギー移動分子（エネルギーアクセプター発蛍光団）の励起スペクトルと重複するように選択される2つの蛍光転移分子（例えば、エネルギー移動分子ポリペプチド）を用いる。従って、本明細書中で提供されるFRETに基づくスクリーニング方法は、一般に、それらが蛍光エネルギーを転移することにより宿主細胞において相互作用するような、重複する励起 / 放射スペクトルを有する2つのエネルギー移動分子を用いる。好ましい実施形態においては、エネルギー移動分子は、蛍光、リン光、生物発光、または化学発光性のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドであり得、そしてより好ましくは、蛍光性のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドであり得る。エネルギー移動分子（例えば、エネルギー移動分子ポリペプチド配列）（例えば、ANTおよび / またはCypDポリペプチドに融合されて、本明細書中に記載のような検出可能なANTまたはCypD融合

タンパク質を形成し得る)は、それが、物理的(例えば、光子もしくは電子)または化学的(例えば、酵素もしくはインデューサー)であり得る励起エネルギーに曝露されたときに検出され得る。好ましい実施形態においては、励起エネルギーは化学的であり、より好ましくは、励起エネルギーは物理的であり、そして最も好ましくは、励起エネルギーは、約300nm~約650nmの範囲の波長を有する光である。

【0053】

本明細書中に記載されるように、本発明は、例えば、例示としてであって限定ではないが、ANTおよびCypD融合タンパク質の検出、単離および/または精製を可能にするさらなる機能的もしくは非機能的ポリペプチド配列に融合されたANTまたはCypDポリペプチドを含むANTおよびCypD融合タンパク質を提供する。例えば、さらなる機能的ポリペプチド配列は、本明細書中で提供されるようなエネルギー移動分子ポリペプチドであり得る。本明細書中で記載されたANTおよびCypD融合タンパク質は、FRET、蛍光、リン光、生物発光、または化学発光によって検出され得、そして、特定の実施形態においては、タンパク質-タンパク質アフィニティー(例えば、レセプター-リガンド)、金属アフィニティーまたは電荷アフィニティー方法によって検出、単離、および/または精製され得る融合タンパク質を含む。特定の他の実施形態においては、本発明の融合タンパク質は、プロテアーゼ認識配列を含む配列を有する融合タンパク質の特異的プロテアーゼ開裂(これにより、ANTおよびCypDポリペプチドが、さらなるポリペプチド配列から分離可能であり得る)によって検出され得る。特定の好ましい実施形態においては、例えば、各ANTおよび/またはCypDポリペプチド配列は、エネルギー移動分子ポリペプチド配列にインフレームに融合される。ANTおよびCypD融合タンパク質に存在する他のポリペプチド配列は、ANTおよびCypDポリペプチドのアフィニティー検出および単離を容易にし得、そして、例えば、ポリ-Hisまたは規定の抗原性ペプチドエピトープ(米国特許第5,011,912号およびHoppら、(1988 Bio/Technology 6:1204)に記載)、またはXPRESS™エピトープタグ(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含み得る。

アフィニティー配列は、細菌宿主の場合マーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供するために、例えば、pBAD/His (Invitrogen) またはpQE-9ベクターによって供給されるような、ヘキサ-ヒスチジンタグであり得る。あるいは、アフィニティー配列は、哺乳動物宿主細胞（例えば、COS-7細胞）が用いられる場合、ヘマグルチニン（HA）タグであり得る。HAタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来する抗体規定エピートープに対応する（Wilsonら、1984, Cell 37:767）。

【0054】

ANTおよびCypD融合タンパク質は、ANTおよびCypDの検出、単離、および/または局在化を容易にするために、ANTおよびCypDに付加された免疫グロブリン定常領域ポリペプチドをさらに含み得る。免疫グロブリン定常領域ポリペプチドは、好ましくは、ANTまたはCypDポリペプチドのC末端に融合される。抗体由来ポリペプチド（Fcドメインを含む）の種々の部分に融合された異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の一般的な調製は、例えば、Ashkenaziら（1991 Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88:10535）およびByrnら（1990 Nature, 344:677）によって記載されている。ANT:FcまたはCypD:Fc融合タンパク質をコードする遺伝子融合は、適当な発現ベクターに挿入される。本発明の特定の実施形態においては、ANT:FcおよびCypD:Fc融合タンパク質は、ほとんど抗体分子のように組み立てられ得、ここでは鎖間ジスルフィド結合がFcポリペプチド間で形成し、ダイマーANT融合タンパク質およびダイマーCypD融合タンパク質を生じる。

【0055】

ANTおよびCypDをコードする配列にインフレームに連結されたDNA配列によりコードされた免疫グロブリンV領域ドメインを含む融合ポリペプチドによって予め選択された抗原について特異的結合アフィニティーを有するANTおよびCypD融合タンパク質もまた、本発明の範囲内であり、これは、本明細書中に提供されるような、それらの改変体およびフラグメントを含む。免疫グロブリンV領域融合ポリペプチドを有する融合タンパク質の構築のための一般的なス

トラテジーは、例えば、EP 0318554 ; U.S. 5,132,405 ; U.S. 5,091,513 ; およびU.S. 5,476,786において開示される。

【0056】

融合タンパク質は、特定の実施形態においては、所望のアフィニティー特性（例えば、レセプター - リガンド）を有する1つ以上の他のポリペプチドに融合されたANTまたはCypDポリペプチドを含む。アフィニティー特性を有するポリペプチドのいくつかの特異的な例は、限定なく、酵素（例えば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ（GST））および*Staphylococcus aureus* プロテインAポリペプチドを含む。プロテインAをコードする核酸および免疫グロブリン定常領域についてアフィニティーを有する融合タンパク質の構築におけるそれらの使用は、一般に、例えば、米国特許第5,100,788号に開示される。ANTおよびCypD融合タンパク質の構築のための他の有用なアフィニティーポリペプチドは、ストレプトアビジン融合タンパク質（例えば、WO89/03422 ; U.S. 5,489,528 ; U.S. 5,672,691 ; WO93/24631 ; U.S. 5,168,049 ; U.S. 5,272,254 および他に開示されるような）およびアビジン融合タンパク質（例えば、EP 511,747を参照のこと）を含み得る。本明細書中および引用された文献において提供されるように、ANTおよびCypDポリペプチド配列は、全長融合ポリペプチドであり得る融合ポリペプチド配列、および、あるいはそれらの改変体またはフラグメントであり得る融合ポリペプチド配列に融合され得る。

【0057】

（核酸発現構築物）

本発明の核酸構築物は、RNAの形態またはDNAの形態（例えば、cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNA）であり得る。DNAは、二本鎖または一本鎖であり得、一本鎖であればコード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。本明細書中で提供されるようなミトコンドリア細孔成分のコード配列は、当該分野で公知である（例えば、以下の表1を参照のこと）。例えば、例示のため

に(限定ではない)、本発明に従って使用するためのANTまたはCypDポリペプチドをコードするコード配列は、上記のような、ならびに例えば、図1、7、および8においてヒトANT1 [配列番号 ___]、ヒトANT2 [配列番号 ___]、ヒトANT3 [配列番号 ___]、ヒトCypA [配列番号 ___] およびヒトCypD [配列番号 ___] について示されているような、任意の所定のANTまたはCyp (例えば、CypAもしくはCypD) について当該分野で公知のコード配列に同一であり得るか、あるいは例えば図1、7、または8のcDNAと、遺伝子暗号の重複性もしくは同義性の結果として、同じANTまたはCypポリペプチドをコードする、異なるコード配列であり得る。

【0058】

ANTまたはCypDポリペプチドをコードする核酸配列は、以下を含む配列を包含するが、これらに限定されない：ANTまたはCypDポリペプチドのコード配列のみ；ANTまたはCypDポリペプチドのコード配列およびさらなるコード配列；ANTまたはCypDポリペプチドのコード配列(および必要に応じてさらなるコード配列)および非コード配列(例えば、イントロンまたはANTまたはCypDポリペプチドのコード配列の5'および/または3'の非コード配列(例えば、調節され得る調節核酸配列、外部で調節されるかまたは調節可能なプロモーター、エンハンサー、他の転写調節配列、リプレッサー結合配列、翻訳調節配列または任意の他の調節核酸配列))。従って、用語「ANTポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」および「CypDポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、それぞれのポリペプチドのコード配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびにさらなるコード配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

本発明はさらに、本明細書中に記載のポリヌクレオチドの改変体に関し、これは、ネイティブなANTポリペプチドおよびCypDポリペプチドのフラグメント、アナログ、または誘導体をコードし得る。例えば、図2および8 [配列番号 ___] の推定アミノ酸配列を有するヒトANT1、ANT2およびANT3ポリペプチドならびにヒトCypDポリペプチド、または任意のANTおよびCypDポリペプチドが使用され得る。ANTおよびCypDをコードする核酸配列の改

変体は、核酸の天然に生じる対立遺伝子改変体または天然に生じない改変体であり得る。当該分野で公知であるように、対立遺伝子改変体は、1つ以上のヌクレオチドの少なくとも1つの置換、欠失、もしくは付加（これらのいずれもが、コードされるANTおよびCypDポリペプチドの機能を実質的に変更しない）を有し得る核酸配列の代替の形態である。従って、本発明は、例えば、図2および8〔配列番号__〕に示されるのと同じANTおよびCypDポリペプチドをコードする核酸、ならびにこのような核酸の改変体（この改変体は、図2および8〔配列番号__〕のポリペプチドのいずれかのフラグメント、誘導体、またはアナログをコードする）を包含する。

【0059】

ANTおよびCypDの改変体および誘導体は、それぞれANTおよびCypDポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の変異により得られ得る。ネイティブなアミノ酸配列の変更は、多数の従来の方法のいずれかによって達成され得る。変異は、ネイティブ配列のフラグメントへの連結を可能にする制限部位に隣接して変異体配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することによって、特定の遺伝子座で導入され得る。連結後、得られる再構築配列は、所望のアミノ酸挿入、置換、または欠失を有するアナログをコードする。

【0060】

あるいは、オリゴヌクレオチドに指向された部位特異的変異誘発手順は、変更された遺伝子を提供するために使用され得、ここで、所定のコドンは、置換、欠失、または挿入によって変更され得る。このような変更を作製するための例示的な方法は、Walderら(Gene 42:133, 1986); Bauerら(Gene 37:73, 1985); Craik(BioTechniques, 1985年1月, 12-19); Smithら(Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkelら(Methods in Enzymol. 154:367, 1987);ならびに米国特許第4,518,584号および同第4,737,462によって開示される。

【0061】

アミノ酸残基または配列の種々の付加または置換、あるいは生物学的活性に必要でない末端残基または内部残基または配列の欠失をコードする等価なDNA構築物はまた、本発明に含まれる。例えば、生物学的活性に必須ではないCys残基をコードする配列は、欠失または他のアミノ酸で置換されるCys残基を生じるために変更され得、復元の際の不正確または所望でない分子内ジスルフィド架橋の形成を防止する。他の均等物は、隣接する二塩基性アミノ酸残基の改変によって調製され得、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を増大する。EP 212,914は、タンパク質におけるKEX2プロテアーゼプロセシング部位を不活性化するための部位特異的変異誘発の使用を開示する。KEX2プロテアーゼプロセシング部位は、残基を欠失、付加または置換し、Arg-Arg、Arg-Lys、およびLys-Arg対を変更し、これらの隣接する塩基性残基の出現を除去することによって不活性化される。Lys-Lys対形成は、KEX2切断に対してほとんど感受性でなく、そしてArg-LysまたはLys-Argの、Lys-Lysへの転化は、KEX2部位の不活性化のための保存的かつ好ましいアプローチを表す。

【0062】

短縮型分子（例えば、短縮型のANTまたはCypDポリペプチドあるいは核酸）は、この分子の全長バージョン未満を含む任意の分子であり得る。特定の好ましい実施形態において、本発明は、短縮型のANTおよびCypDポリペプチドを提供し、そして特定の実施形態において、本発明は、このような短縮型ポリペプチドをコードする核酸を提供する。短縮型核酸分子は、全長未満の既知または記載される核酸分子のヌクレオチド配列を有し、ここで、このような既知または記載される核酸分子は、当業者がこれを全長分子であるとみなす限り、天然に存在するか、合成核酸分子であるか、または組換え核酸分子であり得る。

【0063】

従って、例えば、遺伝子配列に対応する短縮型核酸分子は、全長未満の遺伝子を含み、ここで、この遺伝子は、コード配列および非コード配列、プロモーター、エンハンサーおよび他の調節配列、隣接配列など、ならびに遺伝子の一部とし

て認識される他の機能的および非機能的配列を含む。別の例において、mRNA配列に対応する短縮型核酸分子は、全長未満のmRNA転写物（これは、種々の翻訳領域および非翻訳領域、ならびに他の機能的および非機能的配列を含み得る）を含む。他の好ましい実施形態において、短縮型分子は、特定のタンパク質の全長未満のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。本明細書中で使用される場合、「欠失」は、当業者によって理解されるようなその通常の意味を有し、そして、対応する全長分子（例えば、本明細書中で提供される短縮型分子の場合）と比較して、いずれかの末端または非末端領域から配列の1つ以上の部分が欠如した分子をいい得る。直鎖状の生物学的ポリマー（例えば、核酸分子またはポリペプチド）の短縮型分子は、この分子のいずれかの末端からの欠失、またはこの分子の非末端領域からの欠失のうちの1つ以上を有し得、ここで、このような欠失は、1～1500個連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基、好ましくは1～500個連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基、そしてより好ましくは1～300個連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基の欠失であり得る。

【0064】

ANTおよびCypD短縮化欠失変異体の分析は、本明細書中で提供されるように、特定の機能的特性（例えば、ANT、シクロスポリンAおよび/またはVDACへのCypDの結合を媒介し得るポリペプチド領域を含む）の原因であるANTおよびCypD構造ドメインの同定を可能にする（Cromptonら、1998 Eur. J. Biochem. 258:729）。従って、ANTおよびCypD短縮化欠失変異体の使用は、ミトコンドリアの分子成分の間のインビトロ結合相互作用および/またはミトコンドリアのインビボの機能の分子の微細な調節を可能にする。従って、本発明の特定の実施形態において、ANTおよび/またはCypD短縮化欠失変異体を用いてトランスフェクトされた細胞における、MPTの誘導物質に対して直接的に変更された（例えば、増加または減少した）細胞応答は、特定のミトコンドリア機能（例えば、ETC活性、酸素消費、ATP生成、変更したミトコンドリア膜電位、変更したミトコンドリアの透過性、アポトーシスの誘導など）を有する特定のANTまたはCypD構造ドメインの存在の相関関係を可能にする。特定の他の実施形態において、ANTおよび

C y p Dの単離された組換え短縮型形態間のインビトロで検出可能に変更された結合は、分子の相互作用（例えば、認識および結合など）に貢献する特定のA N TおよびC y p D構造ドメインの同定を可能にする。また、本明細書中でより詳細に記載されるように、短縮型のA N Tおよび/またはC y p Dポリペプチドならびに核酸は、A N Tおよび/またはC y p Dの機能的活性を変更する因子を同定するために設計されるスクリーニングアッセイにおける使用のための分子標的を提供する。

【0065】

本発明はさらに、本明細書中で提供されるA N TまたはC y p Dをコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする核酸配列に関する。好ましくは、このような配列は、ネイティブのA N TまたはC y p D配列に対して、少なくとも70%、好ましくは少なくとも90%、そしてより好ましくは少なくとも95%の同一性を示す。より好ましくは、このような核酸配列は、ストリンジェントな条件下で、ネイティブのA N TまたはC y p Dをコードする核酸配列にハイブリダイズする。本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件」は、少なくとも95%、および好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在する場合のみにハイブリダイゼーションが起こることを意味する。A N TまたはC y p Dをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするこの核酸配列は、好ましい実施形態において、図1または8 [配列番号__]のcDNAによってコードされるA N TまたはC y p Dポリペプチドの、生物学的機能または活性を実質的に保持するポリペプチドをコードする。

【0066】

本明細書中で使用される場合、2つのヌクレオチド配列は、特定のストリンジェンシー条件下で安定なハイブリッドが形成される場合に「ハイブリダイズ」といわれる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、代表的には、このようなハイブリッドがアニールおよび洗浄されるイオン強度および温度の条件において表される。代表的には、「高」、「中程度」、および「低」ストリンジェンシーは、以下の条件またはその等価な条件を含む：高ストリンジェンシー：0.1×SSPEまたはSSC、0.1% SDS、65；中程度のストリ

ンジェンシー：0.2×SSPEまたはSSC、0.1% SDS、50 : および低ストリンジェンシー：1.0×SSPEまたはSSC、0.1% SDS、50。

【0067】

本発明はまた、核酸ベクターおよび本発明の核酸配列を含む構築物（特に、上記に提供されるようなANTまたはCypDポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドを含む「核酸発現構築物」）；本発明のベクターおよび/または構築物を用いて遺伝子操作された宿主細胞、ならびに生化学的技術および遺伝的技術によるANTおよびCypDポリペプチドの産生およびスクリーニングにおける使用に関する。ANTおよびCypDポリペプチドは、哺乳動物細胞、酵母、細菌または他の細胞において適切なプロモーターの制御下で発現され得る。無細胞翻訳系はまた、本発明のDNA構築物由来のRNAを使用してこのようなタンパク質を生成するために使用され得る。原核生物および真核生物宿主を用いる使用のための適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989)によって記載され、そしてプラスミド、コスミド、シャトルベクター、ウイルスベクター、および本明細書中で開示されるような染色体複製起源を含むベクターを含み得る。

【0068】

本発明の核酸発現構築物は、ANTおよび/またはCypDポリペプチド（例えば、本明細書中に記載されるような、MPTを変更する因子についてのスクリーニングにおいて有用な融合タンパク質）をコードし得る。従って、核酸発現構築物は、エネルギー伝達分子ポリペプチドに融合されたANTまたはCypDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結するプロモーターを含み得る。第1のエネルギー伝達分子ポリペプチドに融合されたANTポリペプチドおよび第2のエネルギー伝達分子ポリペプチドに融合されたCypDポリペプチドの両方を発現する、以下に記載されるような宿主細胞（そしてここで、適切な第1および第2エネルギー伝達分子ポリペプチドは、本明細書中に記載され

るように選択される)は、例えば、MPTを変更する因子を同定するためのFRETAッセイにおいて使用され得る。一般に、核酸発現ベクターは、宿主細胞の検出可能な形質転換を可能にする複製起源および選択マーカー(例えば、*E. coli*および*S. cerevisiae* TRP1遺伝子のアンピシリン耐性遺伝子)、ならびに下流構造配列の転写を指向するための高度に発現された遺伝子由来のプロモーターを含む。このようなプロモーターは、糖分解酵素(例えば、とりわけ3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)、因子、酸ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質)をコードするオペロン由来であり得る。異種構造配列は、翻訳開始配列および終結配列を用いて適切な期で構築される。必要に応じて、この異種配列は、所望の特徴(例えば、発現される組換え産物の安定化または精製の単純化)を付与するN末端(またはC末端)同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードし得る。

【0069】

細菌での使用のための発現構築物は、機能的プロモーターを用いて、作動可能な読み出し期において、適切な翻訳開始シグナルおよび翻訳終結シグナルと一緒に所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を発現ベクターに挿入することによって構築され得る。この構築物は、ベクター構築物の維持を保証するために、そして所望の場合、この宿主内での増幅を提供するために、1つ以上の表現型選択マーカーおよび複製起源を含み得る。形質転換のために適切な原核生物宿主としては、*E. coli*、*Bacillus subtilis*、*Salmonella typhimurium*、ならびに*Pseudomonas*、*Streptomyces*、および*Staphylococcus*の属内の種々の種が挙げられるが、他のものもまた、選択できるものとして使用され得る。任意の他のプラスミドまたはベクターは、それらが宿主中で複製可能かつ生存可能である限り、使用され得る。

【0070】

代表的であるが非限定的な例として、細菌での使用のための発現ベクターは、周知のクローニングベクター pBR322(ATCC 37017)の遺伝的エレメントを含む市販のプラスミド由来の選択マーカーおよび細菌複製起源を含

み得る。このような市販のベクターとしては、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) および pGEM1 (Promega Corp., Madison, WI, USA) が挙げられる。これらの pBR322 「幹」 部分は、適切なプロモーターおよび発現される構造配列と組み合わせられ得る。

【0071】

他のベクターおよび構築物は、染色体、非染色体、および合成のDNA配列 (例えば、SV40の誘導體; 細菌プラスミド; ファージDNA; バキュロウイルス; 酵母プラスミド; 酵母人工的染色体(YAC); プラスミドおよびファージDNAの組み合わせ由来のベクター; プラスミドおよびウイルスDNAの組み合わせ由来のシャトルベクター: ウイルスDNA (例えば、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病) を含む。しかし、任意の他のベクターは、これが目的の宿主細胞において複製可能かつ生存可能である限り、核酸発現構築物の調製のために使用され得る。さらに、いくつかの好ましい実施形態において、ANTおよびCypDポリペプチドのためのポリヌクレオチドコード配列を含む核酸発現構築物、ならびに融合タンパク質は、染色体外のままであり得、そして別の好ましい実施形態において、発現構築物は、少なくとも1つの宿主細胞の染色体に組み込まれ得る。

【0072】

適切なDNA配列は、種々の手順によってベクターに挿入され得る。一般に、DNA配列は、当該分野で公知の手順によって、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入され得る。クローニング、DNAの単離、増幅および精製、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどに関する酵素反応についての標準的な技術、ならびに種々の分離技術は、当業者に公知でありそして通常利用される技術である。多くの標準的な技術は、例えば、Ausubelら (1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrookら (1989 Molecular Cloning, Second Ed.,

Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatisら(1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); および他の個所に記載される。

【0073】

発現ベクターにおけるコード配列は、mRNA合成を指向するために、少なくとも1つの適切な発現制御配列(例えば、プロモーター、制御されたプロモーターおよび/または外部から制御されたプロモーター)に作動可能に連結される。このような発現制御配列の代表例としては、LTRまたはSV40プロモーター、E. coli lacまたはtrp、ファージ P_Lプロモーターおよび原核生物または真核生物の細胞またはそのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することが公知の他のプロモーターが挙げられる。プロモーター領域は、CAT(クロラムフェニコールトランスフェラーゼ)ベクターまたは選択マーカーを有する他のベクターを使用して、任意の所望の遺伝子から選択され得る。2つの適切なベクターは、pKK232-8およびpCM7である。特に有名な細菌プロモーターとしては、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、P_R、P_Lおよびtrpが挙げられる。真核生物プロモーターとしては、CMV前初期(例えば、シャトルベクターpEYFP-C1およびpECFP-N1(Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA)中に提供される)、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスメタロチオネイン-1が挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベル内であり、そしてANTおよび/またはCypDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーターまたは制御されたプロモーターを含む特定の特に好ましい核酸発現構築物の調製が、本明細書中に記載される。

【0074】

特定の好ましい実施形態において、発現制御配列は、「外部から制御されるプロモーター」であり、これはさらなるエレメント、因子、分子、成分、補因子などによって変更(例えば、増加または減少)され得る活性を有する機能的プロモ

ーター配列を含む。外部から制御されるプロモーターは、例えば、リプレッサー結合部位、アクチベーター結合部位または本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列の発現を制御する任意の他の制御配列を含み得る。特定の特に好ましい実施形態において、この外部から制御されるプロモーターは、当業者に公知であり、例えば、Guzmanら(J. Bacteriol., 1995, 177: 4121)、Carraら(EMBO J., 1993, 12: 35)、Mayer(Gene, 1995, 163: 41)、Haldimannら(J. Bacteriol., 1998, 180: 1277)、Lutzら(Nuc. Ac. Res., 1997, 25: 1203)、Allgoodら(Curr. Opin. Biotechnol., 1997, 8: 474)およびMakrides(Microbiol. Rev., 1996, 60: 512)に記載されるように、特異的誘導性であり、誘導シグナルの非存在下でその制御下でポリヌクレオチド配列の転写をほとんどまたは全く行わない、厳重に制御されるプロモーターである。本発明の他の好ましい実施形態において、誘導性であるが厳密には制御され得ない外部から制御されるプロモーターが存在する。特定の他の好ましい実施形態において、本発明の組換え発現構築物にプロモーターが存在し、これは制御されるプロモーターではない；このようなプロモーターとしては、例えば、構成的プロモーター(例えば、昆虫ポリヘドリンプロモーターまたは酵母ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター)が挙げられ得る(例えば、Giraudら, 1998 J. Mol. Biol. 281: 409を参照のこと)。核酸発現構築物はまた、翻訳開始および転写終結のためのリボソーム結合部位を含み得る。ベクターはまた、発現の増幅のための適切な配列を含み得る。

【0075】

高等な真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNA配列の転写を、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増加させ得る。エンハンサーは、DNAのcis-活性エレメント(通常、約10~300bp)であり、これは、その転写を増加させるためにプロモーター上で作用する。例としては、複製起点bp100~270の後部上のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後部上のポリオーマエンハ

ンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

【0076】

上記のように、特定の実施形態において、このベクターは、レトロウイルスベクターのようなウイルスベクターであり得る。例えば、レトロウイルスプラスミドベクターが誘導され得るレトロウイルスには、モロニー Maus 白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、レトロウイルス、例えば、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0077】

ウイルスベクターは、一般に、1以上のプロモーターを含む。適切なプロモーターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：レトロウイルスLTR；SV40プロモーター；およびヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(Millerら、Biotechniques 7:980-990(1989)に記載される)、または任意の他のプロモーター、例えば、真核生物細胞プロモーターのような細胞プロモーター(ヒストン、pol III、およびアクチンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない)。他のウイルスプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーター、およびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。適切なプロモーターの選択は、本願明細書中に含まれる技術から当業者に理解され、そして調節プロモーターまたは上記のようなプロモーターのいずれかの中から選択され得る。

【0078】

レトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞株の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller、Human Gene Therapy、1:5~14(1990)にて記載されるようなPE501、PA317、-2、-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、CRE、CRIP、GP+E-

86、GP+envAm12およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。このベクターは、当該分野で公知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、およびCaPO₄沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。1つの代替法において、このレトロウイルスプラスミドベクターをリポソームにカプセル化するか、または脂質に結合して、次いで宿主に投与し得る。

【0079】

このプロデューサー細胞株は、ANTおよび/またはCypDポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロまたはインビボのどちらかにおいて、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、一般に、ANTおよび/またはCypDポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現する。形質導入され得る真核生物細胞としては、真核生物幹細胞、真核生物癌細胞、および造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、および気管支の上皮細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0080】

ウイルスベクターが、ANTおよびCypDの核酸発現構築物を調製するために使用される本発明の実施形態の別の例として、ANTまたはCypDポリペプチドの発現に関する組換えウイルス構築物によって形質導入された宿主細胞は、ウイルスの発芽の間にウイルス粒子によって取り込まれた宿主細胞株の一部から誘導される、発現したANTおよび/またはCypDポリペプチドを含むウイルス粒子を産生し得る。別の好ましい実施形態において、ANT-またはCypD-コードポリペプチド配列は、バキュロウイルスシャトルベクターにクローニングされ得、次いで、組換えバキュロウイルス発現構築物を産生するために、バキュロウイルスを用いて組換えし、これを使用して、例えば、Sf9宿主細胞を感染する(Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, 第39巻, Christopher D. Richardson, Editor, Human

Press, Totowa, NJ, 1995; Piwnicka-Worms, 「Expression of Proteins in Insect Cell Using Baculoviral Vector」、第II節、第16章、Short Protocols in Molecular Biology, 第2版、Ausubelら編、John Wiley & Sons, New York, New York, 1992, 16-32 to 16-48頁に記載されている)。

【0081】

適切な宿主株の形質導入および適切な細胞密度に対する宿主細胞の増殖後に、選択されたプロモーター(それが、外部的に制御されたプロモーターである場合)は、適切な手段で(例えば、温度シフトまたは化学的誘導)によって導入され、そして細胞が、さらなる期間、培養される。代表的に、細胞を遠心分離により回収して、物理的手段または化学的手段により壊し、そして得られた粗抽出物を、さらなる精製のために保持した。タンパク質の発現において使用した微生物細胞を、任意の従来の方法(凍結乾燥サイクル(freeze-thaw cycling)、音波破碎、機械的崩壊、または細胞溶解剤(このような方法は、当業者に周知である))によって壊した。

【0082】

(宿主細胞)

上記のように、上記のANTおよびCypD発現構築物を含む宿主細胞ならびにANTおよびCypDポリペプチドを調製するため方法はまた、本発明に包含される。宿主細胞は、一般に、1以上のベクターおよび/または上記のような発現構築物を用いて遺伝子操作(形質移入、形質転換、またはトランスフェクト)される。遺伝子操作された宿主細胞を、プロモーターを活性化するため、形質転換株を選択するため、または特定の遺伝子(ANTおよびCypDポリペプチドをまたは融合タンパク質をコードする遺伝子)を増幅するために適切なものとして、改変された従来栄養培地中で培養し得る。特定の宿主細胞のために適切な培養条件は、当業者に容易に理解される。本明細書中で提供されるような、ANTおよび/またはCypD融合タンパク質を含む、ANTおよびCypDポリペ

プチドを調製するために、ANTまたはCypDポリペプチドをコードする核酸発現構築物を含む宿主細胞が、ポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養される。次いで、ANTまたはCypDポリペプチドを培地から回収する。

【0083】

宿主細胞を、アッセイにおいてさらに使用して、ANTポリペプチドとCypDポリペプチドとの間の相互作用を検出する。一般に、このような宿主細胞は、ANTおよびCypD融合タンパク質（各々、エネルギー伝達分子を含む）を発現する。好ましくは、このエネルギー伝達分子は、異なる波長において励起および発光最大を有する。最も好ましい実施形態において、ANTおよびCypDポリペプチドに融合されたこのエネルギー伝達分子は、緑色の蛍光タンパク質（GFP）および色素シフトしたその誘導体（例えば、YFP、BFP、CFP、およびRFP（公開されたPCT出願WO98/06737を参照のこと））であり得る。特定の局面において、発現したANTおよびCypDポリペプチド内に存在するこのエネルギー伝達分子は、約300nm～650nmの範囲の波長に励起最大を有し、そして約350nm～675nmの範囲に発光最大を有する。好ましい実施形態において、1つのエネルギー伝達分子は、約400nm～500nmの範囲に励起最大を有し、そして約450nm～525nmの範囲に発光最大を有し、そして第2のエネルギー伝達分子は、約450nm～525nmの範囲に励起最大を有し、そして約500nm～約550nmの範囲に発光最大を有する。より好ましい実施形態において、1つのエネルギー伝達分子は、約433nmに励起最大を有し、そして約475nmの波長に発光最大を有し、そして第2のエネルギー伝達分子は、約513nmの波長に励起最大を有し、そして約527nmの波長に発光最大を有する。好ましくは、2つのエネルギー伝達分子の励起/発光スペクトルが重なり合い、その結果、CypDポリペプチドとANTポリペプチドとの結合により、エネルギー伝達分子の間の検出可能なエネルギー伝達が得られる。

【0084】

例えば、MPTを変更させる薬剤を同定するための宿主細胞は、野生型GFPのシアンシフト誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合されたヒトCypD

ポリペプチド（CFP、すなわち、第1エネルギー伝達分子ポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを有する第1核酸発現構築物および野生型GFPの黄色シフト誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合されたヒトANT3（huANT3）ポリペプチド（YFP、すなわち、第2エネルギー伝達分子ポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを有する第2核酸発現構築物を含み得る。CFPエネルギー伝達分子は、433nmの励起最大を有し、そして475nmの発光最大を有する一方で、YFPは、527nmの発光最大を有する。433nmの波長の光は、CFPを励起するのに十分であるが、YFPを励起するには、十分でなく、しかし、CFPによって475nmで発光された光は、YFPを励起して、527nmの光を発光するのに十分である。従って、このようなhuANT3およびCypD融合タンパク質を発現する宿主細胞は、適切な励起エネルギー（すなわち、433nmの光）に曝露され得、そしてこの融合タンパク質が、隣接する場合、または相互作用する場合、発光スペクトルCFP（ドナー発蛍光団）が励起スペクトルYFP（アクセプター発蛍光団）と重なり合い、その結果として、検出可能なエネルギー伝達（すなわち、527nmでの蛍光）が得られる。huANT3およびCypD融合タンパク質は、例えば、相互作用を絶ち切る薬剤に起因して、隣接しない場合、または相互作用しない場合、475nmに発光が存在し、検出可能なエネルギー伝達の欠如を示す。増加した発光または減少した（クエンチされた）発光のいずれかが、検出され得る。

【0085】

宿主細胞は、より高等な真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞）、もしくはより下等な真核生物細胞（例えば、酵母細胞）であり得、またはこの宿主細胞は、原核生物細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。本発明に従う、適切な宿主細胞の代表的な例は、微生物細胞（例えば、E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium）；真菌細胞（例えば、酵母）；昆虫細胞（Drosophila S2およびSpodoptera Sf9）；動物細胞（例えば、MDCK、Hep-2、CHOもしくはCOS（例えば、COS-7））；ヒト細胞（例えば、Jurkatもしくは293細胞）

；アデノウイルス；植物細胞、またはインビトロでの伝播にすでに順応されたか、または、このように新規に構築された任意の適切な細胞が挙げられるが、これらに限定されない。適切な宿主の選択は、本明細書の技術から当業者の範囲内であることが理解される。

【0086】

種々の哺乳動物細胞の培地系をまた使用して、組換えタンパク質を発現し得る。哺乳動物の発現系の例は、Gluzman, Cell 23:175 (1981)に記載されるようなサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、および適合性ベクター（例えば、C127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株）を発現し得る他の細胞株を含む。哺乳動物の発現ベクターは、複製の起点、適切なプロモーターおよびエンハンサーを含み、そしてまた、任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシングドナーおよびアクセプター部位、転写性末端配列、および5'側方非転写性配列（例えば、ANTおよびCypD発現構築物の調製に関して、本明細書中に記載される）を含む。SV40スプライス由来のDNA配列、およびポリアデニル化部位を使用して、必要な非転写性遺伝子エレメントを提供する。この構築物を宿主細胞に導入することは、当業者に公知の種々の方法によって実施され、この方法としては、例えば、カルシウムホスフェートトランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、裸のDNAを用いたトランスフェクション、微粒子銃媒介トランスフェクション、DEAE-Dextran媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション（例えば、Davisら、1986 Basic Method in Molecular Biology）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の開示に従って、および当業者に理解されるように、特定の実施形態において、少なくとも1個の宿主細胞中の核酸発現構築物は、染色体外であり、一方で、特定の実施形態において、少なくとも1個の宿主細胞中の核酸発現構築物は、宿主細胞染色体中に一体化され得る。特定の実施形態において、この宿主細胞の染色体は、核酸染色体を有し、そして特定の実施形態において、この宿主細胞染色体は、上記のように、ミトコンドリア染色体を含む。

【0087】

ある好ましい実施形態において、宿主細胞は、細胞質雑種（例えば、共通の核酸成分を含むが、異なる個体由来のミトコンドリアを有する細胞質ハイブリット細胞）であり得る。細胞質雑種を調製するため、および使用するための方法は、米国特許第5,888,438号、公開されたPCT出願WO95/26973およびWO98/17826、KingおよびAttardi (Science 246:500-503, 1989)、Chomynら (Mol. Cell. Biol. 11:2236-2244, 1991)、Millerら (J. Neurochem. 67:1897-1907, 1996)、Swerdlowら (Annals of Neurology 40:663-671, 1996)、Cassarinoら (Biochim. Biophys. Acta 1362:77-86, 1997)、Swerdlowら (Neurology 49:918-925, 1997)、Sheehanら (J. Neurochem. 68:1221-1233, 1997) および Sheehanら (J. Neurosci. 17:4612-4622, 1997) に記載される。

【0088】

当業者に理解されるように、特定の状況において、内因性ANTおよび/またはCypD発現が妥協して処理される宿主細胞を使用することが所望され得る。例えば、特定のANT - および/またはCypD - コード核酸配列あるいはANTおよび/またはCypDポリペプチド（これは、宿主細胞ゲノムによってコードされるポリペプチドと高度に類似している）は、宿主細胞ANTおよび/またはCypD遺伝子発現を阻害することによって容易にされ得る。別の実施形態において、内因的に導入された組換えANTおよびCypDポリペプチドの機能活性が宿主細胞中で決定される場合、内因性宿主細胞ANTおよび/またはCypD遺伝子発現を阻害することがまた、利点があり得る。

【0089】

従って、本発明の特定の実施形態において、宿主細胞は、内因性ANTおよび/またはCypDの少なくとも1個のアイソフォーム (isof orm) を欠失し得、そして特定の好ましい実施形態において、宿主細胞は、内因性ANTおよび/またはCypDアイソフォームの全てを欠失し得る。例えば、Giraudら

(1998 J. Mol. Biol. 281:409) によって記載される酵母系において、全3つの酵母ANTイソフォームを欠失する*S. cerevisiae* 3重ヌル改変体が記載され、嫌氣的条件において成長し得ない。他の好ましい実施形態において、内因性ANTおよび/またはCypDイソフォームをコードする少なくとも1個の遺伝子の宿主細胞中の発現は、実質的に障害性である。内因性ANTおよびCypDイソフォームの発現の実質的な障害は、特定の遺伝子発現を阻害するために、当業者に周知の任意の種々の方法によって達成され得、この方法としては、上記のような部位特異的または部位直接的突然変異誘発、遺伝子発現のアンチセンス阻害、遺伝子発現のリボザイム媒介阻害、およびミトコンドリアDNA劣化(°)細胞の産生が挙げられる。

【0090】

アンチセンス剤としての使用のためのオリゴヌクレオチドおよびリボザイムならびに遺伝子治療のための標的送達のための遺伝子をコードするDNAを同定することは、当業者に周知の方法を含む。例えば、このようなオリゴヌクレオチドの記載された特性、長さおよび他の特徴は、周知である。アンチセンスヌクレオチドは、代表的に、このような結合を使用することで、内因性核酸酵素による分解を阻害するように設定されており、このような結合としては、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオエート、ホスホルアミデート、ホスフェートエステルおよび他のこのような結合(例えば、Agrwalら、Tetrahedron Lett. 28:3539-3542(1987); Millerら、J. Am. Chem. Soc. 93:6657-6665(1971); Stecら、Tetrahedron Lett. 26:2191-2194(1985); Moodyら、Nucl. Acids Res. 12:4769-4782(1989); Uznanskiら、Nucl. Acids Res. (1989); Letsingerら、Tetrahedron 40:137-143(1984); Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 54:367-402(1985); Eckstein, Trend Biol. Sci. 14:97-100(1989); Stein: Oligodeoxynucleotides. Antis

ense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, 97-117頁(1989); Jagerら, Biochemistry 27:7237-7246(1988)を参照のこと)。

【0091】

アンチセンスヌクレオチドは、配列特異的様式で核酸(例えば、mRNAまたはDNA)に結合するオリゴヌクレオチドである。相補配列を有するmRNAに結合する場合、アンチセンスは、mRNAの翻訳を妨げる(例えば、Altmanらに対する米国特許第5,168,053号; Inouyeに対する米国特許第5,190,931号、Burchに対する米国特許第5,135,917号; ダンベルアンチセンスオリゴヌクレオチドが記載されるSmithおよびCluselら(1993)Nucl. Acids Res. 21:3405-3411に対する米国特許第5,087,617号を参照のこと)。三重らせん分子は、共直線三重らせん分子を形成し、それにより転写を妨げる二重らせんDNAを結合する単一DNA鎖を指す(例えば、二重らせんDNA上の標的部位に結合する合成オリゴヌクレオチドを作製する方法が記載されるHoganらに対する米国特許第5,176,996号を参照のこと)。

【0092】

本発明のこの実施形態に従って、特に有用なアンチセンスヌクレオチドおよび三重らせん分子は、ANTもしくはCypDポリペプチドをコードするDNAもしくはmRNAのセンス鎖、または内因性のANTおよび/もしくはCypD遺伝子の発現に関連する任意の他のプロセスを媒介する他のタンパク質(例えば、ANTおよび/またはCypDポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の阻害をこうむる)に相補的なあるいは結合する分子である。

【0093】

リボザイムは、RNA基質(例えば、mRNA)を特異的に切断し、その結果細胞性遺伝子発現を特異的に阻害または干渉するRNA分子である。RNA鎖の切断および/または結合に関与する少なくとも5つの公知のクラスのリボザイムがある。リボザイムは、任意のRNA転写物に対して標的化され得、そしてこの

ような転写物を触媒的に切断し得る（例えば、米国特許第5,272,262号；米国特許第5,144,019号；ならびにCechらに対する米国特許第5,168,053号、同第5,180,818号、同第5,116,742号および同第5,093,246号を参照のこと）。本発明の特定の実施形態に従って、任意のこのようなANTもしくはCypD mRNA特異的リボザイム、またはこのようなりボザイムをコードする核酸は、宿主細胞へ送達され、ANTおよび/またはCypD遺伝子発現の阻害をもたらし得る。従ってリボザイムなどは、真核生物のプロモーター（例えば、真核生物ウイルスプロモーター）に連結されたりボザイムをコードするDNAによって宿主細胞へ送達され得、それにより核へ導入され、このリボザイムは、直接転写される。

【0094】

本明細書で使用される場合、内因性ANTまたはCypDアイソフォームをコードする遺伝子の発現は、任意の上の阻害の方法によって実質的に減損される。これは、細胞が実質的にしかし必然的に完全ではなく内因性ANTおよびCypDアイソフォームをコードする機能的DNAもしくは機能的mRNA、または関連したANTおよびCypDポリペプチドを奪われる場合である。ANTおよびCypDアイソフォーム発現は、細胞が好ましくは内因性ANTおよびCypDをコードするDNAまたはmRNAの少なくとも50%が奪われる（上に記載されるように高いストリンジェンシーハイブリダイゼーションを使用して測定される）か、またはANTおよびCypDポリペプチドが奪われる（本明細書に記載されるようなウエスタン免疫プロットによって測定される、例えば、Giraudら、1998 J. Mol Biol. 281:409をまた参照のこと）；そしてより好ましくは内因性ANTおよびCypD DNA、mRNAまたはポリペプチドの少なくとも75%が奪われる場合、実質的に減損される。最も好ましくは、細胞が、その内因性ANTおよびCypD DNA、mRNA、またはポリペプチドの>90%が奪われる場合、ANTおよびCypDアイソフォーム発現が、実質的に減損される。

【0095】

あるいは、内因性ANTおよび/またはCypDアイソフォームをコードする

遺伝子の発現は、ミトコンドリアDNA減損^o細胞の使用を介して実質的に減損され得る。この細胞は、ミトコンドリア複製ができず、それにより機能的ANTおよびCypDポリペプチドを発現し続け得ない。^o細胞を生成する方法は、公知であり、そして例えば、参考として援用されるPCT/UC95/04063で見出され得る。

【0096】

(スクリーニングアッセイおよびキット)

本発明は、ミトコンドリア透過性移行(MPT)を変更する薬剤を同定する使用のための組成物、方法およびキットを提供する。このようなスクリーニングおよびアッセイは、ANTとCypDポリペプチドとの間の結合(例えば、融合タンパク質)に対する候補薬剤の効果を検出するために設計される。理論によって結合させることを望まない場合、上に記載のようにMPTを一部分調節し得るANTとCypDとの間の装置相互作用を考慮して、インビボ(例えば、インタクト宿主細胞において)およびインビボ(例えば、単離されたANTおよびCypDの直接結合)におけるANT-CypD結合に基づくアッセイは、MPTの測定を提供し得る。

【0097】

本明細書で使用される場合、用語「スクリーニング」は、MPTを変化する(例えば、増加するまたは減少する)薬剤を同定するために設計されたアッセイの使用をいう。簡単には、ANTおよびCypDポリペプチドは、候補薬剤と接触し、そしてANTとCypDとの間の相互作用に対するこの薬剤の効果が、決定される。このようなアッセイは、ANTおよびCypDポリペプチドを発現する宿主細胞中で、または単離されたANTおよびCypDポリペプチドを使用して実施され得る。ついで、ANT-CypD結合または相互作用に対する効果は、モニターされ、候補薬剤の非存在下でコントロールアッセイと比較される(例えば、薬剤を送達するために使用されるビヒクルで処理された)。検出は、直接(例えば、競合結合アッセイによって)または非直接(例えば、ミトコンドリア機能またはCypDポリペプチドに結合するANTポリペプチドの検出によって)であり得る。

【0098】

候補薬剤は、MPTを直接的（例えば、ANT、CypD、および/またはANT-CypD複合体との物理的接触によって）または非直接的（例えば、1つ以上の付加分子成分との相互作用によって（例えば、ミトコンドリア分子成分が宿主細胞中に存在し、そこでこのような付加成分が薬剤との接触に应答してANT-CypD相互作用を変化する））に変化し得る。いくつかの実施形態において、候補薬剤は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質または低分子であり得る。代表的に、そしてより好ましい実施形態（例えば、高いスループットスクリーニングについて）において、候補薬剤は、「ライブラリー」または化合物、組成物もしくは分子のコレクションとして提供される。このような分子は、代表的に「低分子」として当該分野で公知の化合物を含み、そして 10^5 ダルトン未満、好ましくは 10^4 ダルトン未満およびさらにより好ましくは 10^3 ダルトン未満の分子量を有する。例えば、試験化合物のライブラリーのメンバーは、多数のサンプルに投与され得、各メンバーは、本明細書において提供されるような少なくとも1つのANTポリペプチドまたは融合タンパク質および少なくとも1つのCypDポリペプチドまたは融合タンパク質を含み、ついで細胞ベースアッセイにおいてMPTを変化するまたは非細胞ベース（例えば、インビトロ）アッセイにおいてANT-CypD結合を高めるまたは阻害する能力についてアッセイされる。

【0099】

さらに、候補薬剤は、無作為配列ライブラリーのメンバーとして提供され得る。好ましくは、このライブラリーが、多数の反応容器内で実施される多数の前もって決定された化学反応に従って調整された合成薬剤を含む。例えば、種々の開始化合物は、1つ以上の固相合成、記録されたランダム混合方法論および所定の成分が追跡可能に多数の反応条件の順列および/または組み合わせをこうむり得る記録された反応分離技術を使用して調整され得る。生じた産物は、反復選択および合成手順に続いてスクリーニングされ得るライブラリー（例えば、ペプチド（例えば、PCT/US91/08694およびPCT/US91/04666を参照のこと）または本明細書中に提供されるような低分子を含み得る他の組成

物(例えば、PCT/US94/08542、欧州特許第0774464号、米国特許第5,798,035号、米国特許第5,789,172号、米国特許第5,751,629号を参照のこと)の合成組み合わせライブラリー)を含む。当業者は、このようなライブラリーの多様な組み合わせが、確立された手順に従って調整され、そしてCSP標的(例えば、p95.6/YN52ポリペプチド)または本開示に従うホモログを使用して試験され得ることを理解する。

【0100】

特定の局面において、スクリーニング方法は、ANTのCypDへの検出可能な結合を可能にするのに十分な条件下および時間において、ANTおよびCypDポリペプチドを接触させる工程を包含する。このアッセイは、候補薬剤の存在および非存在下で行われ、候補薬剤のANT-CypD結合に及ぼす影響は、この薬剤の存在および非存在下におけるCypDのANTへの結合のレベルを比較することによって評価される。

【0101】

ポリペプチド間の結合相互作用を検出ための、当該分野で公知の種々のアッセイフォーマットが存在する。例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。1実施形態において、1つのポリペプチドが、ビーズ、マトリクス、細胞、オルガネラ(例えば、以下でより詳細に記載されるようなミトコンドリア粒子またはサブミトコンドリア粒子)またはリポソームのような膜ベシクル、タンパクリポソーム、天然もしくは人工の単層膜ベシクルもしくは多層膜ベシクルなどのような粒子の成分として提供される。従って、特定の好ましい実施形態において、このような結合相互作用に關与する1つのポリペプチドは、ミトコンドリアまたはサブミトコンドリア粒子と結合され、特定の他の好ましい実施形態において、このようなポリペプチドは、リポソームまたはタンパクリポソームと結合される。他の好ましい実施形態において、このようなポリペプチドは、固相マトリクスと結合される。例えば、1つの実施形態において、少なくとも1つのポリペプチドは、他のポリペプチドとの接触の前に、固体支持体上に固定化される。次いで、ポリペプチ

ド結合は、相互作用するポリペプチド（例えば、抗体またはそのフラグメント）の一方または両方に特異的に結合する検出試薬を使用して、またはこのポリペプチドの一方または両方の検出可能な部分を使用して、検出され得る（例えば、色素の直接検出、または2つの分子間のエネルギー移動の検出）。

【0102】

固体支持体は、当業者に公知の任意の材料であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレート中の試験ウエルまたはニトロセルロースまたは他の適切な膜であり得る。あるいは、この支持体は、ビーズまたはディスクであり得、例えば、ガラス、ガラス繊維、ラテックスもしくはプラスチック材料（例えば、ポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル）であり得る。ポリペプチドは、当業者に公知の種々の技術を使用して、固体支持体上に固定化され得、これは、特許文献および科学文献に十分に記載される。本発明の状況において、用語「固定化」は、例えば、吸着のような非共有結合および共有結合（薬剤と固体支持体上の官能基との間の直接結合であり得るか、または架橋剤による結合であり得る）の両方をいう。マイクロタイター中のウエルまたは膜への吸着による固定化が、好ましい。このような場合、吸着は、適切な緩衝液中の結合剤を、適切な時間で、固体支持体と接触させることによって達成され得る。

【0103】

結合は、一般に、結合ポリペプチドを検出するのに十分な時間量で起こることが許容される。適切な量の時間は、一般に、期間にわたって起こる結合のレベルをアッセイすることによって決定され得る。CypD、ANT、および候補薬剤の相互作用を可能にするのに十分な条件下および時間、インキュベートした後、CypD - ANT結合のレベルが検出され、薬剤の非存在下における結合のレベルと比較される。幾つかの好ましい実施形態において、ANTおよびCypDポリペプチドは、GST、ヘキサ - ヒスチジン、およびFLAG（登録商標）ポリペプチドのような、本明細書中で提供されるさらなるポリペプチド配列に融合される。従って、好ましい実施形態において、ANTおよびCypDに融合されたさらなるポリペプチドは、本明細書中に記載されるように、レセプター（例えば、抗体またはストレプトアビジン / アビジン）によって結合されるリガンド（例

例えば、抗原またはビオチン)である。他の実施形態において、ANTおよびCypD融合タンパク質は、ANTおよびCypDポリペプチドが、本明細書中に記載されるように、さらなるポリペプチド配列からタンパク質分解的に分離され得るように、プロテアーゼ認識配列を含み得る。なお別の実施形態において、ANTおよびCypDは、GFPまたは関連した変異GFP(WO98/06737)(例えば、YFP、BFP、CFP、またはRFP)に融合され得、これが使用され、例えば、ミトコンドリアに対する亜細胞性位置を変更し得るか、あるいは本発明に従う核酸発現構築物によってコードされた発現ANTまたはCypD融合タンパク質の改変されたMPTを検出し得る。本発明のこのような実施形態は、高スループットスクリーニングアッセイとして有用である。

【0104】

次いで、結合していないポリペプチドは除去され、結合したポリペプチドは、連結されたレポーター基、またはレポーター基を含む個別の検出可能なマーカ―を使用して検出される。結合を検出するために使用される方法は、使用されるレポーター基の性質に依存する。エネルギー移動が検出される際、本明細書中に記載されるようなFRET技術が使用され得る。放射性基の場合、シンチレーションカウンティングまたはオートラジオグラフィ法が、一般に適切である。分光学的方法は、色素、発光基および蛍光基を検出するために使用され得る。ビオチンは、異なるレポーター基(通常は、放射性基もしくは蛍光基または酵素)に結合したアビジンを使用して検出され得る。酵素レポーター基は、一般に、基質の添加によって検出され得(一般に、特定の時間において)、次いで、反応生成物の分光学的または他の分析によって検出され得る。

【0105】

ANT、CypD、および/またはANT-CypD複合体に結合する薬剤は、ANT-CypD結合における検出可能な減少または増加を生じ得る。ANT-CypD結合タンパク質のこのような改変したレベルは、モニターされるポリペプチドまたは融合タンパク質、および特定の試薬、機器および選択される方法に依存して定量的に変更し得る、容易に検出可能な増加または減少に関する。好ましくは、ANT-CypD結合の改変したレベルは、統計学的に重要な増加ま

たは減少をいう。

【0106】

MPTを変更する薬剤についてスクリーニングするための他の方法は、ミトコンドリアを有する宿主細胞におけるFRETに関し、これは、ANT融合タンパク質およびCypD融合タンパク質を発現し、ここで、各融合タンパク質は、適切なエネルギー移動分子ポリペプチドを含む。簡略すると、このような細胞は、候補薬剤およびMPTの誘導因子と接触される。次いで、この細胞は、励起エネルギーに対して曝露され、エネルギー移動分子間のエネルギー移動のレベルが検出され、本明細書中に提供される参照シグナルのような参照レベルと比較され、この参照レベルは、候補薬剤の非存在下で発生され得る。非限定的な理論により、ANT、CypD、ANT-CypD複合体に結合し、および/または他に、ANT-CypD相互作用を妨害する薬剤は、例えば、本明細書中に記載されるANT-CypD結合を改変することによって、FRETシグナルの検出可能な改変（例えば、減少または増加）を生じ得る。

【0107】

このようなアッセイにおいて、宿主細胞は、一般的に、MPTの誘導因子と接触される。このような誘導因子は、例えば、本明細書中に記載されるような、ANT融合タンパク質とCypD融合タンパク質との間のエネルギー移動のレベルを測定することによって、または当該分野で公知の任意の他の適切な方法によって決定される場合、MPTを誘導するのに十分な量および時間で、使用され得る。「MPTの誘導因子」は、ミトコンドリア膜浸透性を向上することが公知の任意の化合物であり得る。MPTの誘導因子は、例えば、アトラクチロシド、bonkrekic acid、タブシガルジン、アミノ酸神経伝達物質、グルタメート、N-メチル-D-アスパラギン酸、カルバコール、イオノフォア、イノマイシン、カリウム脱分極の誘導因子、およびプログラムされた細胞死、すなわち「アポトーシス」を誘導する「アポプトゲン (apoptogen)」(Greenら、1998 Science 281:1309)のような、ミトコンドリアのCa²⁺濃度を増加する化合物が挙げられる。MPTを改変する薬剤は、MPTの誘導因子の存在下および/または非存在下においてANT-CypD結

合に及ぼす影響を發揮し得る。別の実施形態において、宿主細胞は、mPTの第2誘導因子、好ましくは、酸化性応力の誘導因子と接触され、最も好ましくは、この誘導因子は、エタクリン酸、ブチオニンスルホキイミン、ジアミド、メナジオン、t-ブチル過酸化水素、フェニル-アルシン酸化物および酸化窒素から選択される。当業者は、過度の実験なしに決定し得、MPTの誘導因子の組み合わせは、ANTおよびCypD融合タンパク質からの最も検出可能なシグナルを生じる。

【0108】

特定の好ましい実施形態において、本発明の方法に従って検出されるシグナルを、少なくとも1つの参照シグナルと比較することが所望され得る。幾つかの実施形態において、参照シグナル(単数または複数)は、特定の条件下で、適切なエネルギー移動分子(例えば、本明細書中に提供されるようなエネルギー移動分子ポリペプチド)間で検出可能であるエネルギー移動の1つ以上のレベルであり得る。このような適切な参照シグナルの選択は、当業者に精通された基準に従い、特定のアッセイ条件(例えば、宿主細胞、MPTの誘導因子、速度論、MPTのインヒビター、励起エネルギー、候補薬剤)および使用される特定のエネルギー移動分子ドナー-アクセプター対に依存して変化し得る。例えば、参照シグナルは、エネルギー移動分子ドナーポリペプチドまたはエネルギー移動分子アクセプターポリペプチドまたは本明細書中で提供されるようなインジケータである個別のレポーター分子のような参照化合物によって発生され得、サンプルの非存在下または存在下でさらに発生され得る。このようなレポーター分子またはインジケータは、一種以上の一定量の検出可能な成分の指標または検出可能な成分の位置などとして検出され得る検出可能な化合物を含み得る。例えば、例示のために、限定することなく、参照シグナルは、存在する細胞の番号に従って検出されるエネルギー移動シグナルの規格化を可能にするレポーター分子によって発生され得る(例えば、このレポーターは、細胞核についての選択的染色(例えば、ヨウ化プロピジウムまたは臭化エチジウム)のような細胞番号の多数の公知のインジケータのいずれかであり得る)。

【0109】

特定の他の実施形態において、参照シグナルは、存在するミトコンドリア量、ミトコンドリア数またはミトコンドリア容量のインジケータによって発生される。例えば、ミトコンドリア量のインジケータが選択される場合、ノニルアクリジンオレンジのようなレポーター分子が使用され得る。ミトコンドリア量、容量、および/またはミトコンドリア数を定量するための方法は、当該分野で公知であり、例えば、代表的な生物学的サンプルの定量的な染色を含み得る。代表的には、ミトコンドリアの定量的染色は、オルガネラ選択性プローブまたは色素を使用して行われ得、これには、ミトコンドリア分子成分（例えば、ノニルアクリジンオレンジ、Mitochondria Trackers™）に結合する蛍光色素またはミトコンドリア内側膜電気化学的電位の関数としてミトコンドリア内に蓄積する電位差測定色素（potentiometric dye）のようなミトコンドリア選択性試薬が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Haugland, 1996 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals - 第6編, Molecular Probes, Eugene, OR）。別の例として、ミトコンドリア量、容量および/または数は、形態計測学的分析によって定量され得る（例えば、Cruz-Oriveら、1990 Am. J. Physiol. 258:L148; Schwerzmannら、1986 J. Cell Biol. 102:97）。サンプル中のミトコンドリア量、容量および/またはミトコンドリア数を定量するための当該分野で公知のこれらの手段または任意の他の手段は、本発明の考慮された範囲内にある。例えば、ミトコンドリア密度を計算するためのこのような定量的決定の使用が考えられ、限定することを意図しない。特定の非常に好ましい実施形態において、サンプル中のミトコンドリアタンパク質の量は、周知の手順を使用して決定される。例えば、当業者は、確立された細胞分別技術を使用して、生物学的サンプルから単離されたミトコンドリア画分を容易に調製し得、それより、当業者に周知の多数のタンパク質定量法のうちのいずれかを使用してタンパク質含量を決定し得る。

【0110】

他の実施形態において、参照シグナルは、存在するタンパク質の量に従って検

出されるエネルギー移動シグナルの規格化を可能にするレポーター分子（例えば、*coomassie blue*、フルオレスカミン、*bicinchoninic acid*）または存在する核酸の量に従って検出されるエネルギー移動シグナルの規格化を可能にするレポーター分子（例えば、臭化エチジウム、アクリジンオレンジ、メチレンブルー）によって発生され得る。別の例として、参照シグナルは、サンプルを含む液体媒体中に可溶である検出可能なレポーター分子によって発生され得るが、これは、細胞膜を横断し得ず、従って、細胞外媒体のマーカーとして、例えば、流体体積のインジケータとして作用する。例えば、特別な感度の機器（例えば、以下を参照のこと）がFRETシグナルを検出するために使用され得る場合、このようなインジケータは、サンプル容量の校正/規格化によって、改善された定量精度を可能にし得る。このような参照シグナルとしての使用に適切である多くの化合物は、当業者に公知であり、彼らは、特に、特定のアッセイ条件（例えば、宿主細胞、MPTの誘導因子、速度論、MPTのインヒビター、励起エネルギー、候補薬剤）および使用される特定のエネルギー移動分子ドナー - アクセプター対に依存する様式で、参照シグナルの供給源としてこのような化合物を選択し得る。

【0111】

本明細書中で使用される場合、シグナルの「相対量」を検出することは、上に提供されるように、参照シグナルに対してシグナルを比較する目的のためにシグナルを検出することが挙げられるが、これに限定されない。従って、シグナルの相対量を検出することは、シグナルの一部のみを検出すること（例えば、100%未満の効率でシグナルを検出すること）、またはエネルギー移動によって発生されるシグナルの一部のみを検出すること、またはコントロールサンプルのような別のサンプルから検出されるシグナルに対してシグナルの一部を検出することを言及し得る。これは、本明細書中に提供されるように、このような検出される他のシグナルのいずれかが参照シグナルであるかどうかに関わらない。本明細書中に開示される方法に従うシグナルの検出は、通常通りまたは任意に割り当てた尺度の単位によるエネルギー移動の定量を含み得る。特定の実施形態において、シグナルは、シグナルの1つ以上の挙動が時間の関数として分析され得るような時

間にわたって検出され得る。例えば、本明細書中に記載される幾つかの実施形態において、シグナルは、ある一定時間にわたって検出され得、これは、シグナル検出事象より多くを提供する様式でサンプルを検出する任意の方法をいい、その結果、検出シグナルの別々の時間点との相関が確立され得る。従って、例えば、特定の実施形態において、シグナルの量の変化は、2つ以上の点にわたって検出され得、シグナルのレベルにおける変化の割合が決定される（例えば、シグナルレベルが時間の関数としてプロットされる場合、一次導関数のような傾きまたは傾きの割合変化が決定される）。別の例として、特定の他の実施形態において、シグナルの量は、別々の時間間隔にわたって累積的に決定され得、合計されたシグナルを提供する（例えば、積分されたシグナル）。定量データを分析するための、特に、時間成分を有するこのようなデータを分析するための、当該分野で公知のこれらおよび他の技術は、考慮された本発明の範囲内にある。

【0112】

従って、本発明によって提供される方法のいずれも、例えば、細胞数の標準化、細胞性タンパク質または細胞性核酸の定量、ミトコンドリアの質量、ミトコンドリアタンパク質またはミトコンドリア核酸の定量、液量の表示などの目的のために、目的の参照パラメーターと相関する参照シグナルをまた含むように改変され得る。内部標準として使用され得るこの参照シグナルは、エネルギー移動からの結果である必要はなく、そして所望の参照パラメーターと相関し得るが、試験/アッセイシグナルの検出を妨害しない任意のシグナルを含み得る。本発明の文脈において、参照化合物は、これが、試験/アッセイシグナルから分離され得ないシグナルを生成する場合、またはこれが、エネルギー移動供与体分子ポリペプチドおよびエネルギー移動受容体分子ポリペプチドとして同一の亜細胞区画に局在化し、そしてそれ自体が、エネルギー移動受容体またはエネルギー移動供与体として作用する場合、試験/アッセイシグナルを妨害し得る。

【0113】

FLIPR™のような機器をセットし、約1秒の周期時間を有する2つの異なる波長におけるリーディングシグナル間で交互になり得る；この様式において、参照シグナルおよび試験/アッセイシグナル（例えば、FRET、 ）は、同

一の時間経過にわたって読まれ得る。しかし、この参照は、試験/アッセイシグナルと同一の時間に読まれることを必要としない。例えば、本発明のいくつかの局面において、参照シグナルを検出するために細胞を破壊する必要があり、そしてこれは、代表的に、この参照シグナルが、試験またはアッセイが完了した後に読まれることを必要とする。

【0114】

参照シグナルのいくつかの非限定的な例としては、以下が挙げられる。試験またはアッセイの後に、当該分野で公知のように、細胞性タンパク質（ミトコンドリアタンパク質を含む）は、BradfordアッセイまたはLowryアッセイのような方法を用いて測定され得、そして核酸は、ヨウ化プロピジウム（PI）のような蛍光色素の使用を介して測定され得る。核酸はまた、生存細胞において測定され得る。例えば、ジギトニン透過性細胞において、ヨウ化プロピジウム（PI；核酸に結合した場合、励起ピーク、536 nm；発光ピーク、617 nm）は、核および細胞質核酸に結合するが、ミトコンドリアマトリックスおよびその中に含まれるミトコンドリア核酸に到達し得ない；従って、PIは、細胞性核酸の量についての参照シグナルを提供する。浸透化合物アクリジンオレンジ（AO）は、生存細胞において使用され、RNAおよびDNAを識別する。これは、アクリジンオレンジが結合する核酸の型に依存して異なる励起/発光スペクトルを有するためである（AO：DNA、励起ピーク、500 nm；発光ピーク、526 nm；AO：RNA、励起ピーク、460 nm；発光ピーク、650 nm）。SYTO染色をまた使用し、生存細胞における核酸を検出し得る；このSYTO染色の製造業者（Molecular Probes, Inc., Eugene, OR）は、SYTO染色の全てが、核性核酸および細胞性核酸に到達し、そしていくつかはまた、ミトコンドリア核酸に到達し得ることを示す；当業者は、例えば、蛍光顕微鏡のような技術を適用し、どの型の核酸が特定のSYTO染色の使用によって決定されるかを決定し得る。JC-1緑蛍光およびNAO蛍光を使用して、生存細胞におけるミトコンドリアの質量を測定し得る（それぞれ、Manciniら、Ann. Surg. Oncol. 5：287-295, 1998；Vayssiereら、In Vitro Cell. Dev. Biol

. 28A : 763 - 772 , 1992)。

【0115】

このアッセイの他の実施形態において、MPT細孔は、シクロスポリンAによって選択的に阻害され得、これは、シクロフィリンDペプチジル-プロリルイソメラーゼ活性を阻害することによって、そしてそれによりそのANTとの相互作用を阻害することによってMPTを遮断し得る (Murphyら、1998 *Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal, HowellおよびBodis-Wollner編、Wiley-Liss、New York、第159頁~第186頁; WhiteおよびReynolds, 1996 *J. Neurosci.* 16 : 5688)。好ましくは、本発明は、第2の参照レベルを生成する方法として、MPTのインヒビターを添加することを提供し; MPTの他のインヒビターとしては、低pHおよび高いミトコンドリア膜電位のインデューサーが挙げられる。

【0116】

アポトーシスを調節する因子の能力もまた評価され得る。一般的に、細胞は、候補因子の存在下および非存在下で、アポトーゲン (apoptogen) で処理され、そしてアポトーシスに対する影響を評価される。種々のアポトーゲンが当業者に公知であり、そして例えば以下のアポトーゲンが例示として挙げられ得るがこれらに限定されない: 当業者がよく知っている適切な条件下で細胞に対して添加される場合には、腫瘍壊死因子、FasL、グルタメート、NMDA、IL-3、コルチコステロン、ミネラルコルチコイド、またはグルココルチコイドレセプター (単数または複数) のような特異的なレセプターを必要とするアポトーゲン。アポトーゲンとしてさらに、以下が挙げられ得る: ヘルビマイシンA、(Manciniら、1997、*J. Cell. Biol.* 138 : 449 - 469); パラコート (Constantiniら、1995、*Toxicology* 99 : 1 - 2)、エチレングリコール類; プロテインキナーゼインヒビター (例えば、スタウロスポリン、カスホスチンC、カフェー酸フェネチルエステル、キレリチン (chelerythrine) クロライド、ゲニステイン); 1

- (5 - イソキノリンスルホニル) - 2 - メチルピペラジン ; N - [2 - ((p - プロモシンナミル) アミ) エチル] - 5 - 5 - イソキノリンスルホンアミド ; KN - 93 ; クエリシチン (quercitin) ; d - エリスロ - スフィンゴシン誘導体 ; UV照射 ; イオノフォア (例えば、イオノマイシン、バリノマイシン、および当該分野で公知の他のイオノフォア) ; MAPキナーゼインデューサー (例えば、アニソマイシンおよびアナンダミン) ; 細胞周期ブロッカー (例えば、アフィジコリン (aphidicolin)、コルセミド、5 - フルオロウラシル、およびホモハリングトニン) ; アセチルコリンエステラーゼインヒビター (例えば、ベルベリン) ; 抗エストロゲン (例えば、タモキシフェン) ; 酸化促進剤 (例えば、tert - ブチルペルオキシド、過酸化水素 ; フリーラジカル (例えば、一酸化二窒素) ; 無機金属イオン (例えば、カドミウム) ; DNA合成インヒビター (例えば、アクチノマイシンD) ; DNAインターカレーター (例えば、ドキシソルピシン、硫酸ベロマイシン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、マイトマイシンC、カンプトセシン、およびダウノルビシン ; タンパク質合成インヒビター (例えば、シクロヘキシミド、プロマイシン、およびラパマイシン) ; 微小管の形成または安定性をもたらす因子 (例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、コルヒチン、4 - ヒドロキシフェニルレチナミド、およびパクリタキセルなど) ; ならびに他のMPTインデューサー (例えば、Baxタンパク質 (J u r g e n m e i e r ら、1998 PNAS 95 : 4997 - 5002)、カルシウムおよび無機リン酸塩 (K r o e m e r ら、1998 Ann . Rev . P h y s i o l . 60 : 619)) 。

【0117】

候補因子のアポトーシスの開始を阻害するかまたは遅らせる能力は、当該分野で公知の任意の方法を使用して評価され得る。例えば、細胞は、形態学的変化、浸透性の変化、またはアポトーシスの状態の指標である他の変化について試験され得る。このような変化としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : 変更された形態学的な外観 (例えば、原形質膜の気泡、細胞の形状の変化、基質の接着特性の欠失、または光学顕微鏡を使用することによって当業者によって容易に検出され得る他の形態学的変化) ; 染色体の断片化および崩壊 (これは、

顕微鏡によって、そして/または当該分野で公知であるDNA特異的色素もしくはクロマチン特異的色素(蛍光色素を含む)の使用により、明らかであり得る); および/または変更された原形質膜の浸透性の特徴(生命体の色素(例えば、ヨウ化プロピジウム、トリパンブルー)の使用により、または細胞外環境への乳酸デヒドロゲナーゼの漏出の検出によって、容易に検出され得る)。別のアポトーシスアッセイにおいては、原形質膜の内のリーフレットから外のリーフレットへの細胞膜のホスファチジルセリン(PS)のトランスロケーションについては、PS特異的タンパク質アネキシンによる外部のリーフレットへの結合を測定することによって評価され得る。(Martinら、J. Exp. Med. 182: 1545、1995; Fadokら、J. Immunol. 148: 2207、1992)。

【0118】

本発明のなお別のアポトーシスアッセイにおいては、アポトーシス誘導因子に対する細胞性の応答が、カスパーゼとして公知のアポトーシスによって活性化されるプロテアーゼのファミリーにおける特異的なプロテアーゼ活性の誘導は、例えば、特異的に認識されるタンパク質基質のカスパーゼ媒介切断の決定により、測定され得る。このような基質として、例えば、当該分野で公知であるカスパーゼによって切断される、ポリ-(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)または他の天然に存在するかもしくは合成のペプチドおよびタンパク質が挙げられ得る(例えば、Ellerbyら、1997 J. Neurosci. 17: 6165を参照のこと)。合成のペプチド

Z-Tyr-Val-Ala-Asp-AFC [配列番号 ___]、
(ここで、「Z」は、ベンゾイルカルボニル部分を示し、そしてAFCは7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン(Kluckら、1997 Science 275: 1132; Nicholsonら、1995 Nature 376: 37)を示す)がこのような基質1つである。他の基質として、U1-70kDaおよびDNA-PKcsのような核タンパク質が挙げられる(RosenおよびCasciola-Rosen、1997、J. Cell Biochem. 64: 50; Cohen、1997 Biochem. J. 326: 1)

。

【0119】

さらなるアポトーシスアッセイは、アポトーシス細胞においてミトコンドリアにより放出されたミトコンドリアタンパク質シトクロムcの検出に基づく(Liuら、Cell 86:147、1996)。シトクロムcのこのような検出は、分光測光的に、免疫化学的に行われ得るか、または特定のタンパク質の存在を決定するための十分に確立された方法によって行われ得る。親和性による捕捉と組合せたマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間(MALDI-TOF)質量スペクトル分析は、アポ-シトクロムcおよびハロ-シトクロムcがそれらの特有の分子量に基づいて区別され得るので、このような分析に特に適切であり得る。例えば、表面増感レーザー脱離/イオン化(Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization)(SELDI™)システム(Ciphergen, Palo Alto, California)は、アポトーシス刺激物質(stimulus)(例えば、イオノマイシン、周知のカルシウムイオノフォア)で処理された細胞中のミトコンドリアからのシトクロムcの放出に対する因子の影響を決定するために利用され得る。このアプローチにおいては、固体支持体上に固定されたシトクロムc特異的抗体が、可溶性の細胞抽出物中に存在する、放出されたシトクロムcを捕捉するために使用される。捕捉されたタンパク質は、次いで、エネルギー吸収分子(EAM)のマトリックス中に入れられ、そしてパルスレーザー励起を使用して固体支持体の表面から脱離させられる。タンパク質の分子量は、SELDI™質量分析計の検出器へのその飛行時間によって決定される。

【0120】

本発明はさらに、MPTを変更する因子についてのスクリーニングのためのキットを提供する。このようなキットは、一般的に、単離されたCypDポリペプチド、単離されたANTポリペプチドおよび、必要に応じて、CypDまたはANTの少なくとも1つに特異的に結合する検出試薬を含む。好ましくは、CypDポリペプチドまたはANTポリペプチドは、固体支持体上に固定化され、そして必要に応じた検出試薬は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【0121】

本発明はまた、細胞ベースのアッセイにおいてMPTを変更する因子についてのスクリーニングのためのキットを提供する。このキットは、本明細書中に記載されるように、宿主細胞、第1のエネルギー移動分子に融合されたANTポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを有する第1の核酸発現構築物、および第2のエネルギー移動分子に融合されたCypDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを有する第2の核酸発現構築物を含み得る。この宿主細胞は、原核生物細胞でも真核生物細胞でもよい。第1および第2のエネルギー移動分子は、本明細書中に記載されるように、好ましくは、GFP、BFP、CFP、RFPまたはYFPである。

【0122】

(治療方法)

MPTを変更し、かつまた好ましくはアポトーシスの開始を阻害するかまたは遅らせる因子は、種々の目的のために使用され得る。例えば、このような因子は、ミトコンドリアにおけるMPTを変更するために使用され得る。ミトコンドリアは、単離され得るか、または細胞内に存在し得る。簡潔には、ミトコンドリアは、上記のような因子とMPTを変更するために十分な条件および時間で接触される。種々の標準的な技術のいずれかを使用して、ミトコンドリアにおけるMPTの変化を検出し得る。

【0123】

代表的には、ミトコンドリアの膜電位は、当業者に容易に知られている方法に従って決定され得る。これらには、以下が含まれるが、これらに限定されない：蛍光指標のような検出可能な化合物の検出および/または測定、光学的なプローブ、および/または感受性のpH、ならびにイオン選択性電極(例えば、Ernstlerら、1981 J. Cell Biol. 91:227sおよび引用される参考文献を参照のこと、Haugland、1996 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 第6版、Molecular Probes, Eugene

, OR、266-274頁および589-594頁をもまた参照のこと)。例えば、例示であって限定的ではないが、蛍光プローブである、2,4-ジメチルアミノスチリル-N-メチルピリジニウム(DASPMI)およびテトラメチルローダミンエステル(例えば、テトラメチルローダミンメチルエステル、TMRM; テトラメチルローダミンエチルエステル、TMRE)、または関連する化合物(例えば、Haugland、1996、前出)が、ミトコンドリア膜電位に依存しそしてそれに対して比例するプロセスであるミトコンドリア中での蓄積の後に定量し得る(例えば、Murphyら、1998、Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Disease、Beal, HowellおよびBodis-Wollner編、Wiley-Liss、New York、159-186頁およびその中で引用されている参考文献; ならびに、Molecular Probes Online Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、<http://www.probes.com/handbook/toc.html>を参照のこと)。本発明において使用され得る他の蛍光検出可能な化合物として、以下が挙げられるがこれらに限定されない: ローダミン123、ローダミンBヘキシルエステル、DiOC₆(3)、JC-1[5,5',6,6'-テトラクロロ-1,1',3,3'-テトラエチルベンズイミダゾール-カルボシアニンヨウダイド](Cossarizzaら、1993 Biochem. Biophys. Res. Comm. 197:40; Reersら、1995 Meth. Enzymol. 260:406)、rhod-2(米国特許第5,049,673号を参照のこと; 上記の化合物の全てが、Molecular Probes, Eugene, Oregonから入手可能である)およびローダミン800(Lambda Physik, GmbH, Goettingen, Germany; Sakanoueら、1997, J. Biochem. 121:29)。

【0124】

ミトコンドリアの膜電位はまた、蛍光ではない手段によって、例えば、TTP(テトラフェニルホスホニウムイオン)およびTTP-感受性電極を使用するこ

とによって、測定され得る (Kamoら、1979 J. Membrane Biol. 49:105; PorterおよびBrand, 1995 Am. J. Physiol. 269:R1213)。当業者は、mを測定するための、適切な検出可能な化合物または他の適切な手段を選択することが可能である。例示であって、限定的ではないが、TMRMはTMREよりもいくらか好ましい。なぜなら、ミトコンドリアからの流出後に、TMREは、TMRMよりも、小胞体および細胞質中にわずかにより残存しているシグナルを生じるからである。

【0125】

別の限定的ではない例として、膜電位は、分光測光的な定量または蛍光による定量と組み合わせた、マトリックスの容積および/またはピリジンヌクレオチドの酸化還元の使用して、検出可能に荷電した溶質に対する、ミトコンドリアの浸透性の間接的測定から、さらにまたは代替的に計算され得る。ミトコンドリア内膜を横切る膜電位依存性の基質交換拡散の測定もまた、膜電位の間接的な測定を提供し得る。(例えば、Quinn、1976、The Molecular Biology of Cell Membranes、University Park Press、Baltimore、Maryland、2000-217頁、およびその中で引用されている参考文献を参照のこと)。

【0126】

従って、本明細書中で提供されるように、例えば以下を含む、MPTを受けたミトコンドリアを含む細胞についての任意の実験的に測定可能な結果が用いられ得る： の散逸の測定、ミトコンドリア膜間空間タンパク質(例えば、シトクロムc)の細胞質への損失の検出、アポトーシスシグナル伝達カスケード(以下を参照のこと)における下流の事象としての1つ以上のカスパーゼの活性化、細胞死および任意の他の表現型パラメーター、生化学的パラメーター、生物物理学的パラメーター、代謝パラメーター、呼吸パラメーターまたはその変化がMPTに依存し得る他の有用なパラメーター。変化したミトコンドリア機能に関連した疾患の処置に適切である、本発明の方法に従って同定された因子は、MPTおよび/またはMPT関連調節機構の頻度および/または発生を増強し得るか、損ない得るかまたは変更し得る。特に好ましいのは、MPTの1以上の上記のインジ

ケータの出現を阻害する因子である。

【0127】

またこのような薬剤を使用して細胞の生存度を変化させ得る。簡単には、細胞の生存度を調節するための条件下で、細胞の生存度を調節するのに十分な時間、細胞を薬剤と接触させる。次に生存細胞が、当業者にとって慣習的な標準技術を使用してアッセイされ得る。例えば、細胞の生存度および/またはアポトーシスに入る細胞を生存細胞の指標として使用し得、これらはさらに、変更したミトコンドリアの機能(例えば、MPT)についての1以上の指標を反映し得る(GreenおよびReed, Science 281:1309~1321、1998; Susinら、Biochim. et Biophys. Acta 1366:151~165、1998)。アポトーシスを起こすと思われる細胞は、アポトーシスの状態を示す形態学的変化、浸透性の変化または他の変化に対して調べられ得る。例示であって限定を意図しない例として、多くの細胞型におけるアポトーシスは、形態学的外観の変化(例えば、細胞膜小胞形成、細胞形状の変化、基質の付着特性の喪失または光学顕微鏡を使用して当業者により容易に検出され得る他の形態学的変化)を引き起こし得る。別の例として、アポトーシスが進行している細胞は、染色体の断片化および崩壊を示し得、このことは光学顕微鏡により、および/または当該分野で公知のDNA特異的またはクロマチン特異的色素(蛍光色素を含む)の使用を介して明らかにされ得る。このような細胞はまた、生体染色(例えば、ヨウ化プロピジウム、トリパンブルー)の使用または細胞外環境への乳酸デヒドロゲナーゼの漏出の検出により容易に検出され得る膜透過性の変化を示す。DNAの損傷はまた、電気泳動技術を用いてアッセイされ得る(例えば、Morrisら、BioTechniques 26:282-289、1999を参照のこと)。形態学的変化、浸透性の変化、および関連する変化によりアポトーシス細胞を検出するこれらの手段および他の手段が、当業者に明らかである。

【0128】

このアポトーシスアッセイの別の局面において、ホスファチジルセリン(PS)特異的タンパク質であるアネキシンによる外側のリーフレットとの結合を測定

することによって形質膜リーフレットの内側から外側への細胞膜PSのトランスロケーションが定量化される(Martinら、J. Exp. Med. 182: 1545、1995; Fadokら、J. Immunol. 148: 2207、1992)。好ましい形式において、形質膜PSの外面化は、標識されたアネキシン誘導体(例えば、アネキシン-フルオレセインイソチオシアネート複合体(annexin-FITC、Oncogene Research Products, Cambridge, MA))を使用して96ウェルプレート上で評価される。

【0129】

アポトーシスアッセイの別の局面において、ミトコンドリアタンパク質であるシトクロムc(アポトーシスの細胞ではミトコンドリアの外に漏出している)の定量化は、容易に検出され得るアポトーシスの標識を提供し得る(Liuら、Cell 86: 147~157、1996)。シトクロムcのこのような定量化は、分光光度法により免疫化学的に、または特定のタンパク質の存在を検出する十分に確立された他の方法により行われ得る。アポトーシス刺激物質(例えば、カルシウムイオノフォアとして周知のイオノマイシン)を用いて試みられる細胞内ミトコンドリアからのシトクロムcの放出の次に種々の免疫学的方法がなされ得る。アポシトクロムcとホロシトクロムcはそれらの固有の分子量に基づいて区別され得るので、親和性捕捉因子に結合させてのマトリックスアシスチドレーザーデソープションイオン化飛行時間型(MSLDI-TOF)質量分析が、このような分析に特に適している。例えば、SELDIシステム(Ciphergen, Palo Alto, USA)を使用して、イオノマイシン処置した細胞中のミトコンドリアからのシトクロムc放出に対するミトコンドリア保護剤による障害を追跡し得る。このアプローチにおいて、固体支持体上に固定されたシトクロムc特異的抗体を使用して可溶性細胞抽出物中に存在する放出されたシトクロムcが捕捉される。捕捉されたタンパク質は次に、エネルギー吸収分子(EAM)のマトリックスに混入され、そしてパルスレーザーエキサイテーションを使用して固体支持体表面から脱離される。タンパク質の分子量は、SELDI質量分析検出器でその飛行時間により検出される。

【0130】

アポトーシスアッセイの別の局面において、カスパーゼ (Thornberry および Lazebnik、Science 281:1312~1316、1998) として公知のアポトーシス活性化プロテアーゼファミリーに含まれる特定のプロテアーゼ活性の誘導が、例えば、特異的に認識されたタンパク質基質のカスパーゼ媒介切断の検出により測定される。これらの基質として、例えば、ポリ-(ADP-リボース)ポリメラーゼ (PARP) または他の天然に存在するペプチドまたは合成ペプチドおよび当該分野で公知であるカスパーゼにより切断されたタンパク質が挙げられ得る (例えば、Ellerbyら、1997 J. Neurosci. 17:6165)。標識された合成ペプチド Z-Tyr-V al-Ala-Asp-AFC (ここで「Z」は、ベンゾイルカルボニル部分を示し、そしてAFCは、7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン (Kluckら、1997 Science 275:1132; Nicholsonら、1995 Nature 376:37) を示す) は、このような基質の1つである。カスパーゼ-3に対する標識された別の合成ペプチド基質は、プロテアーゼに対する認識/切断部位を含むペプチドリンカーを介して相互に結合された2つのフルオレセインタンパク質から成る (Xuら、Nucleic Acids Res. 26:2034~2035、1998)。他の基質として、核タンパク質 (例えば、U1-70kDa および DNA-PKcs) が挙げられる (Rosen および Casciola-Rosen、1997 J. Cell. Biochem. 64:50; Cohen、1997 Biochem. J. 326:1)。

【0131】

アポトーシスアッセイの別の局面において、アポトーゲン (apoptogen) にさらされた細胞集団中の死滅細胞に対する生存細胞の比、または死滅細胞の割合は、アポトーシスの最終的な結果を測定して決定される。生存細胞は、当業者に公知の多くの任意の技術を使用して死滅細胞と区別され得る。非限定的な例として、ヨウ化プロピジウムまたはトリパンブルーのような生体色素を使用してアポトーゲンおよび本発明による化合物で処置された細胞集団中の死滅細胞の

割合を決定し得る（実施例7を参照のこと）。

【0132】

当業者は、細胞の生存および/またはアポトーシスを定量化する他の適切な技術があり得ること、および細胞の生存、またはアポトーシスの誘発および反応速度に対するMPTを変化される薬剤の影響を決定する目的のためのこのような技術は、本明細書中で開示されるアッセイの範囲内であることを容易に理解する。

【0133】

他の局面において、薬剤は変更したミトコンドリアの機能に関する疾患の処置または予防のために患者に投与され得る。このような使用のための好ましい薬剤は、MPTの喪失を阻害する。変更したミトコンドリア機能に関する疾患として、AD、真性糖尿病；パーキンソン病；ハンチントン病；失調症；レーバー遺伝性視神経萎縮；精神分裂病；ミトコンドリア脳障害、乳酸アシドーシス、および発作（MELAS）；癌；乾癬；過剰増殖障害；ミトコンドリア糖尿病ならびに難聴（MIDD）および不整赤色線維を伴うミオクローヌステんかん、が挙げられるがこれらに限定されない。このような疾患は、当該分野で周知の標準的な臨床基準を使用して診断され得る。

【0134】

MPT変更薬剤は、ANTおよびCypDポリペプチドの結合または活性に関する疾患の処置を可能にするので、一般的に、MPT変更薬剤は、治療目的のために有益である。ANT-CypD結合を直接的に増強するかまたは弱めることによってもしくはANT-CypD結合に影響を及ぼすミトコンドリアの分子成分に間接的に影響することによって、MPTを変更するこの薬剤は、本発明の方法で使用される場合、好ましくは薬学的組成物の一部である。薬学的組成物は、1以上のMPT変更薬剤に加えて、少なくとも1つの薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤、および必要に応じて他の成分を含む。

【0135】

治療的な使用のための「薬学的に受容可能なキャリア」は薬学的分野で周知であり、そして例えば、Remingtons Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co. (A.R. Gen

n a r o 編、1985)に記載される。例えば、滅菌生理食塩水およびリン酸緩衝生理食塩水が生理的pHで使用され得る。保存剤、安定化剤、色素、さらに香味剤が薬学的組成物に提供され得る。例えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸およびp - ヒドロキシ安息香酸エステルは、保存剤として添加され得る。さらに、抗酸化剤および懸濁剤が使用され得る。

【0136】

「薬学的に受容可能な塩」は、このような化合物と有機酸もしくは無機酸との組み合わせ(酸付加塩)、またはこの化合物と有機塩基もしくは無機塩基の組み合わせ(塩基付加塩)から誘導された本発明の化合物の塩を言う。本発明の化合物は、遊離塩基または塩の形態のいずれかにおいて使用され得、両形態は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0137】

1以上のMPT変更薬剤を含む薬学的組成物は、この組成物が患者に投与され得る任意の形態であり得る。例えば、組成物は固体、液体または気体(エアロゾル)の形態であり得る。局所投与経路として、経口、局所、非経口(例えば、舌下、頬)、舌下、直腸、膣、および鼻腔内が挙げられるが、限定ではない。本明細書中で使用される用語非経口は、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨下、硬膜下腔内、海綿体動脈内、道内、尿管間注射または注入技術を含む。薬学的組成物は、その中に含まれる活性成分が、患者への組成物の投与において生物学的に利用可能であるように処方される。患者に投与される組成物は、1以上の投薬単位の形態を取り、ここで例えば、錠剤は1の投薬単位であり得、そしてエアロゾル形態中の本発明の1以上の化合物の容器は複数の投薬単位を保持し得る。

【0138】

経口投与のために、賦形剤および/または結合剤が存在し得る。例として、スクロース、カオリン、グリセリン、デンプン、デキストリン、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、およびエチルセルロースが挙げられる。着色剤および/または芳香剤が存在し得る。コーティング殻が使用され得る。

【0139】

この組成物は液体の形態(例えば、エリキシル、シロップ、溶液、エマルジョ

ン、または懸濁液)であり得る。液体は、2つの例として、経口投与または注射による送達のためであり得る。経口投与が企図される場合、好ましい組成物は、1以上のMPT変更剤に加えて、1以上の甘味剤、保存剤、色素/着色料および芳香増強剤を含む。注射による投与が企図される組成物において、1以上の界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝剤、安定化剤および等張剤が含まれ得る。

【0140】

本明細書中で使用される液体の薬学的組成物は、溶液、懸濁液、または他の類似形態のいずれであっても、1以上の次のアジュバンドを含み得る：注射用水のような滅菌希釈物、生理食塩水溶液、好ましくは生理学的食塩水、リンガー溶液、等張性塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒体として役に立ち得る合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドのような不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸、または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸のようなキレート剤；酢酸、クエン酸またはリン酸のようなバッファーおよび塩化ナトリウムまたはデキストロースのような張度の調整のための薬剤。非経口の調製物は、アンプル、使い捨てシリンジもしくはガラスまたはプラスチックの複数投薬バイアルに封入され得る。生理学的生理食塩水は、好ましいアジュバンドである。注射可能な薬学的組成物は、好ましくは無菌である。

【0141】

非経口または経口投与のいずれかが企図される液体組成物は、適切な投薬量が得られるMPT変更剤量を含むべきである。代表的には、この量は、組成物中に少なくとも0.01wt%のMPT変更剤である。経口投与が企図される場合、この量は組成物の0.1~約70重量%の間で変化しうる。好ましい経口組成物は、約4%~約50%の間のMPT変更剤を含む。好ましい組成物および調製物は、非経口投薬単位が活性化合物の0.01~1重量%の間で含むように調整される。

【0142】

この薬学的組成物は局所投与が企図され得、このような場合、キャリアは溶液、エマルジョン、オイントメントまたはゲル基材を適切に含み得る。例えば、ゲル基材として、以下の1以上を含み得る：ペトロラタム、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蝋、鉱油、水およびアルコールのような希釈物、および乳化剤および安定化剤。濃化剤が局所投与のための薬学的組成物中に存在し得る。経皮投与が企図される場合、この組成物として経皮パッチまたはイオン導入デバイスが挙げられる。局所的な処方物は、約0.1～約10% w/v (重量/単位容量)の濃度のMPT変更剤を含み得る。

【0143】

組成物は、例えば、直腸で溶解し、薬物を放出する坐剤の形態で、直腸投与を企図され得る。直腸投与のための組成物は、適切な非刺激性の賦形剤として油性基材を含み得る。このような基材として、ラノリン、ココアバターおよびポリエチレングリコールが挙げられるが、限定ではない。

【0144】

本発明の方法において、MPT変更剤は、挿入物、ビーズ、徐放性処方物、パッチまたは高速放出处方物であり得る。MPT変更剤の最適な投薬量が、以下に依存し得ることは当業者には明白である；患者の体重および物理状態；処置される物理的状態の重症度および寿命；活性成分の特定の形態；使用される投与手段および組成物。化学療法におけるMPT変更剤の使用として、別の化合物に結合する薬剤、例えば、この化合物の送達を補助するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、タンパク質またはリポソームが挙げられ得ることが理解される。

【0145】

以下の実施例は、限定目的でなく例示目的で提供される。

【0146】

(実施例)

(実施例1：細菌におけるHisタグ化ヒトANT(6xHis-ANT)タンパク質のクローニングおよび発現)

(A.ANT cDNAのPCRによる増幅)

ヒトの脳全体から調製された細胞の総RNAを、市販の供給源物質から得た (Clontech, Palo Alto, CA)。このRNAを、37 で30分間RNaseフリーのDNase I (Roche Molecular Biochemicals、以前はBoehringer Mannheim Biochemicals、Indianapolis, IN) (緩衝液(40mM Tris-HCl (pH7.0)、6mM 塩化マグネシウム、および2mM 塩化カルシウムを含有する)中の1 μ gのDNase I (10U/ μ l)を用いた)処理により精製した。この処理の後に、2回のフェノール/クロロホルム抽出、1回のクロロホルム抽出、および酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿を行った。RNAのペレットを遠心分離により収集し、70%エタノールで洗浄し、風乾し、そしてRNaseフリー滅菌水に再懸濁した。RNase H欠損逆転写酵素 (SUPERSCRIPT™; Life Technologies, Rockville, MD)を用いてcDNAを生成するために、このRNAを逆転写した。

【0147】

ANT cDNAを、製造者の説明書に従って、以下のプライマー、AMPLITAQ™ DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer, Foster City, CA)、ならびにGENEAMP™ PCR Reagentキット (Perkin-Elmer)に供給された試薬および緩衝液を用いてサーマルサイクラーでのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)により増幅した。以下に記載のプライマーにおいて、下線が引かれたヌクレオチドは、ANT cDNAの5'末端および3'末端と相補的な配列を示し、二重線が引かれたヌクレオチドは、制限酵素Xho I (認識配列; 5' - CTCGAG)および制限酵素Asp718 (認識配列; 5' - GGTAAC)の認識配列を示し、そしてANT開始コドン (ATG)およびANT終止コドンの逆方向の相補鎖 (TAA)は、太字で示される。

【0148】

ヒトANT1 (huANT1; 配列番号1)に対して、次のヌクレオチド配列を有するプライマーを用いた:

正方向（センス）：

【0149】

【化1】

5'-TTATATCTCGAGTATGGGTGATCACGCTTGGAGCTTCCTAAAG

（配列番号4）、および

逆方向（アンチセンス）

【0150】

【化2】

5'-TATATAGGTACCTTAGACATATTTTTGATCTCATACAAC

（配列番号5）。

【0151】

ヒトANT2（huANT2；配列番号2）に対して、次のヌクレオチド配列を有するプライマーを用いた：

正方向（センス）：

【0152】

【化3】

5'-TTATATCTCGAGTATGACAGATGCCGCTGTGTCCTTCGCCAAG

（配列番号6）、および

逆方向（アンチセンス）

【0153】

【化4】

5'-
TATATAGGTACCTTATGTGTACTTCTTGATTTCATCATACAAG

(配列番号7)。

【0154】

ヒトANT3 (huANT3 ; 配列番号3) に対して、次のヌクレオチド配列を有するプライマーを用いた：

正方向 (センス) :

【0155】

【化5】

5'-TTATATCTCGAGTATGACGGAACAGGCCATCTCCTTCGCCAAA

(配列番号8)、および

逆方向 (アンチセンス)

【0156】

【化6】

5'-TATATAGGTACCTTAGATCACCTTCTTGAGCTCGTCGTACAGG

(配列番号9)。

【0157】

(B . ANT発現構築物の作製)

PCR産物を、製造者の推奨に従い、製造者の提供する反応緩衝液を用いて、制限エンドヌクレアーゼXhoIおよびA sp 718で消化した (両酵素は、Roche Molecular Biochemicalsから購入した)。制限処理したDNAを、水平方向のアガロースゲル電気泳動およびUltraCl

ean™ GelSpinキット(Mo Bio Laboratories、Inc.、Solana Beach、CA)を用いたバンドの抽出により精製した。

【0158】

発現ベクターpBAD/His(「B」誘導体; Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いた。このベクターは、5'から3'方向に作動可能に連結された以下のエレメントを含有する: 誘導性であるが、厳密に調節可能なaraBADプロモーター; E. coliに最適化された翻訳開始シグナル; アミノ末端ポリヒスチジン(6×His)をコードする配列(「Hisタグ」とも呼ばれる); XPRESS™エピトープをコードする配列; エンテロキナーゼ切断部位(タンパク質精製後に前述のN末端アミノ酸を除去するために使用され得るこのような方法が所望される場合); マルチクローニングサイト; およびインフレームの終止コドン。

【0159】

プラスミドpBAD/HisのDNAを、製造者の説明書に従い、制限エンドヌクレアーゼXhoIおよびAsp718で消化することにより調製し、そして水平方向のアガロースゲル電気泳動およびUltraClean™ GelSpinキット(Mo Bio Laboratories)を用いたバンドの抽出に供した。制限処理したANTのcDNAを、製造者の反応緩衝液を使用しそして製造者の説明書に従って、T4 DNAリガーゼ(New England Biolabs、Beverly、MA)を用いて、制限処理した発現ベクターのDNAに連結した。製造者の説明書に従って、コンピテントなrecA1 hsdR endA1 E. coli細胞(TOP10F'株; Invitrogen)を、この原核生物用ベクター構築物を含有するライゲーション混合物で形質転換した。単一のコロニーを選択し、そして50µg/mlのアンプシリン(Roche Molecular Biochemicals)を含有する3~5mlのLBブロス(Sambrook、J.、Fritsch、E.F.、およびManiatis、T.、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) 中で培養した。プラスミドDNAを、WIZARD™ Plus Series 9600 Miniprep Reagents System (Promega, Madison, WI) を用いて、細菌培養物から単離した。

【0160】

発現構築物中に存在する組み換え huANTヌクレオチド配列を決定し、PRISM™ Ready BIG DYE™ Terminator Cycle Sequencing Kit (The Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) および以下の配列決定用プライマーを用いたDNA配列決定により、公開されているANT配列 (huANT1については、図1; Neckelmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7580~7584 (1987); huANT2については、Battiniら、J. Biol. Chem. 262: 4355~4359 (1987)、およびhuANT3については、Cozensら、J. Mol. Biol. 206: 261~280 (1989) を参照のこと) と比較してその信頼性を確認した。

【0161】

【化7】

5'-TATGCCATAGCATTTTTATCC

配列番号10、おひか

5'-CGCCAAAACAGCCAAGCT

配列番号11

それぞれのヒト huANT 配列について、両方のプライマーは、挿入されたDNAに隣接するベクター配列の内側に位置付けされる。配列データを、SEQUENCE NAVIGATOR™ 分析ソフトウェアパッケージ (Perkin-Elmer) を用いて分析した。このヒト huANT 3 発現構築物を、pMK3A-huANT3 と命名した。

【0162】

H i s タグ化ヒトANT 1、ANT 2、およびANT 3をコードするこの発現プラスミドは、本明細書中で次のように呼ばれる：ヒトANT 1については、「pMK 1 (H i s タグ化 h u A N T 1) 」または「pMK 1」；ヒトANT 2については、「pMK 2 (H i s タグ化 h u A N T 2) 」または「pMK 2」；ヒトANT 3については、「pMK 3 A (H i s タグ化 h u A N T 3) 」または「pMK 3 A」；以下に詳述されるように、外側リンカーN末端アミノ酸が欠損されているヒトANT 3については、「pMK 3 B (エピトープリンカーを短縮された、H i s タグ化 h u A N T 3) 」または「pMK 3 B」。プラスミドpMK 1、pMK 2、およびpMK 3 Aは、1998年11月3日にアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC; Manassas, VA)に寄託され、そしてそれぞれ受託番号ATCC 98969、ATCC 98970、およびATCC 98971が付与されている。

【0163】

ヒトANT 1 (pMK 1 - h u A N T 1) およびヒトANT 2 (pMK 2 - h u A N T 2) をコードするヌクレオチド配列を含有する発現構築物を制限マップ化し、これらの構造を確認した。プラスミドpMK 1 - h u A N T 1 およびpMK 2 - h u A N T 2 のヌクレオチド配列を、上述の方法およびプライマー(配列番号10および配列番号11)を用いて決定する。

【0164】

pMK 3 A - h u A N T 3 から発現した組換えh u A N T 3 タンパク質のエンテロキナーゼ処理により、h u A N T 3 タンパク質からH i s - T a g / X P R E S S TM エピトープポリペプチドを遊離させた；しかし、生じたh u A N T 3 タンパク質は、いくらかの外側N末端アミノ酸(すなわち、P r o - S e r - S e r - S e r - M e t、「M e t」はh u A N T 3 の翻訳開始コドンによりコードされたアミノ酸を示す)を含有した。この外側アミノ酸はおそらく、組換えh u A N T 3 タンパク質に対して、ほとんど影響がないか、あるいは全く影響がないが、この外側アミノ酸をコードするヌクレオチド配列が欠損された誘導体発現構築物を、以下の様式で調製した。

【0165】

QUIK-CHANGE™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) は、本質的に製造者の説明書に従って使用した。簡単に言うと、製造者の提供する反応緩衝液中に精製されたプラスミド pMK3A-huANT3 DNA、変異誘導性オリゴヌクレオチドプライマー

【0166】

【化8】

5'-GGAGATGGCCTGTTCCGTCATCTTATCGTCATCGTCGTACAGATC

(配列番号12)

(下線が引かれた配列は、huANT3のリーディングフレームの5'末端に対して逆方向の相補である)、および

【0167】

【化9】

5'-GATCTGTACGACGATGACGATAAGATGACGGAACAGGCCATCTCC

(配列番号13)(下線が引かれた配列は、huANT3のリーディングフレームの5'末端に対応する)、Pfu DNAポリメラーゼおよびdNTPを含有する反応混合物を調製した。この変異誘導性オリゴヌクレオチドプライマーを過剰に存在させ、そして製造者のプロトコルに従って、DNA合成のサイクルを、サーマルサイクラーにおいて実行した。この反応産物を制限酵素DpnI(この酵素は、メチル化したDNAおよび半メチル化したDNAを切断するが、メチル化していないDNA(すなわち、アニーリングした反応産物)はインタクトなまま残す)で処理し、これを用いてEPICUREAN COLI™ XL-1-Blue E.coli細胞(Stratagene, Inc., La Jol

1 a、C A) を形質転換した。プラスミドDNAを無作為に選択した12個の形質転換体から調製し、そして上述の方法に従って、マルチクローニングサイトのカセットを含む領域のヌクレオチド配列を決定した。12個のうちわずか1つのプラスミドが、pMK-huANT3で見出される本来の配列を保持しており、そして3個のプラスミドが、望ましくない点変異を含んでいた。8個の「正確な」プラスミドのうちの1個を選択し、そしてpMK3B-huANT3と命名した。

【0168】

(C.Hisタグ化huANT3の発現)

pMK3A-huANT3を含有するE.coli細胞の培養物を、50µg/mlのアンピシリンを含有するLB培地で、対数増殖中期(OD₆₀₀約0.5)まで増殖し、そして漸増量のL-アラビノース(すなわち、0.00002%、0.0002%、0.002%、0.02%および0.2%)を用いて3~4時間誘導した。1mlの各培養物を5,000×g、4で10分間遠心分離し、細胞をペレットにした。細胞のペレットを、1% コール酸塩、1% n-ドデシルマルトシド、および0.1% 2-メルカプトエタノールを含有する100µlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS; pH7.4)を加えることにより再懸濁し、そして溶解した(前述のテキストにおいて、および本明細書を通して、別途特定されない限り、全ての化学物質は、Sigma、St. Louis、MOから購入した)。この溶解物に含まれる総タンパク質を、BCA(ビシンコニック(bicinchoninic)酸; Smithら、1985、Anal. Biochem. 150:76-85) Protein Assayキット(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を用いて決定した。SDSポリアクリルアミドゲル上のレーンごとに、10µgの総タンパク質をロードし、電気泳動し、そしてニトロセルロースメンブレン(HYBOND™ ECL Nitrocellulose Membrane、Amersham Pharmacia、Biotech、以前はAmersham Life Sciences、Piscataway、NJ)に転写した。ヒトANT3融合タンパク質を、製造者の説明書に従い、ANTI-XPRESS™ An

t i b o d y (I n v i t r o g e n) および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体抗マウス二次抗体 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いたウエスタンブロットで検出した。

【0169】

この結果を図3に示す。図の左から右に、次のサンプルが示される：レーン「M」、分子量マーカー；レーン「0」、形質転換されていないE . c o l i 細胞；レーン「o/n」、誘導せずに一晚培養したpMK3A - h u A N T 3を含有するE . c o l i ；レーン「1」～「5」、漸増量のL - アラビノース（それぞれ、0 . 0 0 0 0 2 %、0 . 0 0 0 2 %、0 . 0 0 2 %、0 . 0 2 %および0 . 2 %）で誘導培養したpMK3A - h u A N T 3を含有するE . c o l i 。予想した通り、形質転換されていないE . c o l i （レーン0）および誘導されていないE . c o l i （レーンo/n）は、X P R E S S TM - h u A N T 3物質を示さなかった。しかし、分子量36 . 6 k Dの組換えANT3融合タンパク質の発現が、レーン3およびレーン4（それぞれ、0 . 0 0 2 %および0 . 0 2 %のL - アラビノース）で観察された。X P R E S S TM - h u A N T 3物質は、レーン1およびレーン2（それぞれ、0 . 0 0 0 0 2 %および0 . 0 0 0 2 %のL - アラビノース）で検出されなかった。このことから、これらの条件下では誘導の程度が不十分であったことが示される。

【0170】

最も高い濃度のL - アラビノース（0 . 2 %、レーン5）の存在下で培養した細胞は、集菌の時より前に溶解し始め、そして死滅した；結果的に、組換えタンパク質が、検出されなかった。このことから、E . c o l i における、非常に高い組換えh u A N T の発現が、細胞死を引き起こしたことが示された。同様のことは、細菌における異種タンパク質の過剰発現の間のケースでもときどき起こる。

【0171】

（D . 組換えh u A N T 3は細菌の膜に局在化する）

E . c o l i 細胞内で発現されたヒトANT3を局在化するために、細胞を培地中で培養し、上述のようにL - アラビノースで誘導し、そして異なる区画に細

分化した(例えば、膜、封入体(inclusion bodies)およびサイトゾル)。細菌を、 $5,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で10分間遠心分離することでペレットにした。細胞のペレットを、 $1/10$ 量の細胞緩衝液A(50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、 2 mM EDTA 、 $100 \mu\text{g/ml}$ リゾチームおよび 0.1% TritonX-100)で再懸濁し、そして $30^\circ C$ で15分間、旋回性シェーカー内でインキュベートした。この細胞混合物を、2分間超音波破碎し、そして膜を、 $12,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で15分間遠心分離することによりペレットにした。サイトゾルを示すこの上清を、分析のために回収し(図4、レーン4)、膜および封入体を含有するペレットの一部を同様に回収した(図4、レーン3)。ペレットの残りの部分を、細胞緩衝液B(10 mM Tris-HCl (pH 7.0)、 0.1 mM EDTA 、および 1 mM DTT)で二度洗浄し、 $12,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で15分間遠心分離した。このペレットを、細胞緩衝液C(20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、 100 mM 塩化ナトリウム、 6 mM 塩酸グアニジウム)で再懸濁し、そして室温で1時間インキュベートした。次いでこの溶液を、 $12,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で15分間遠心分離した。この上清(可溶性封入体を含有する; 図4、レーン1)およびこのペレット(不溶性封入体を含有する; 図4、レーン2)を、上述のウエスタンブロットにより分析した。

【0172】

結果を図4に示す。組換えhuANT3(分子量 36.6 kD)は、レーン2、3、および4、ならびにポジティブコントロールレーン(+)(上記のようにウエスタン免疫ブロット分析によってANT3タンパク質の存在について以前に試験された総細胞溶解物)において検出した。最大量の組換えhuANT3をレーン3において検出し、これは膜画分を示す。このことは、huANT3融合タンパク質の大多数が、E.coli細胞膜に組み込まれたことを意味する。より小さいタンパク質シグナルが、レーン2および4において可視であり、組み込まれたANT3といくつかの膜を含んでいたかもしれない不溶性の封入体画分、およびタンパク質合成が生じる細胞質画分を示す。レーン1の可溶性封入体画分において検出可能なタンパク質は存在せず、細菌中のANT3の発現制御は、封入

体の形成において生じなかったことを示し、これは、細菌中のいくつかの異種タンパク質の過剰発現の望ましくない結果である。

【0173】

(E. ANTタンパク質の精製)

本明細書中に記載される発現系によって産生されるANTタンパク質、およびANT融合タンパク質は、種々の方法を使用して精製されてきた。ANTタンパク質の精製、特にヒトANTタンパク質が、この実施例において記載される。

【0174】

以下のタンパク質精製方法のいずれが使用されるか、または、本開示に由来し得る他の方法が使用されるかにも関わらず、細菌細胞が溶解されている場合(またはそのすぐ後に)、いくつかの細菌溶解物(代表的には、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の各酵素;共にRoche Biochemicalsより)に関連した粘性を除去するのに、十分な量のDNaseおよびRNaseを添加することが重要である。粘性が除去され、そして、ANT溶解性が最適化される代替的なまたは付加的な手段は、標準的な超音波処理と反対に、溶解物の激しい超音波処理である。用語「激しい超音波処理」は、例えば、テーパー状の先端が平らのプローブを使用する(カップアンドホーン(cup and horn)装置を用いる超音波処理と反対に)50%の義務サイクルおよび80%の出力で、2回の(各回30秒)、Branson Sonifier(Model 450)を使用する超音波処理をいう。超音波処理のいずれかのタイプが十分であるが、激しい超音波処理が使用される場合、代表的により優れた収率が観察される。

【0175】

さらに、使用される種々のANT精製方法において、最大の可能な量のANTタンパク質を可溶化するために、少なくとも1%Triton-Xで、溶解物を作製することがしばしば所望であり、その後、不溶性物質を高速(すなわち、約100,000g)遠心分離によって除去した。代表的には、例えば、ペプスタチン、ロイペプチン、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)および/またはアプロチニン(全てSigmaより)が、調製の間、効果的なレベル(代表的には $10\mu\text{g}/\text{mL}$)で存在する。単離される特定のANTタンパク

質またはANT融合タンパク質に依存して、4つ全てのプロテアーゼインヒビターまたは効果的なその任意の組み合わせが使用される。例えば、GST-huANT3融合タンパク質の調製において、ロイペプシンおよびペプスタチンのみが使用される場合、許容範囲の結果が得られるが、4つ全てのプロテアーゼインヒビターが使用される場合、もっとも優れた結果が観察される。

【0176】

1つの方法は、非ヒト哺乳動物(すなわち、ウシ心臓組織およびラット)由来のANTタンパク質を精製するためだけに以前使用された、いくつかの技術と新規の方法を組み入れる(Aquilaら、1982、Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363:345-349;およびSterling, 1986, Endocrinology 119:292-295)。手短かに言うと、GST-ANT3融合タンパク質を発現する細菌細胞をリゾチム処理によって溶解し、そして、E. coliの1グラム当たり50nmolの濃度で、¹⁴C-パルミチル-CoA(Sigma)を添加した。それは、ANTタンパク質と会合するので、¹⁴C-パルミチル-CoAは、引き続き精製工程におけるANTタンパク質に伴うように使用され得る放射性標識トレーサーとして作用する。次いで、溶解物を超音波処理し、6% Triton X-100(Sigma)を作製し、4で1時間インキュベートして物質を可溶化した。高速遠心分離を使用して、不溶性物質を除去し、そして、基本的に製造業者の指示に従って、得られた溶質を(1)小規模調製のために、ヒドロキシアパタイトビーズ(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)か、または(2)大規模の調製の場合(すなわち、1リットルを超える細菌培養物)、ヒドロキシアパタイトカラム(Bio-Rad)のいずれかに適用した。他の膜内のミトコンドリアタンパク質とは異なり、ANTは、ヒドロキシアパタイトについて低い親和性を有する(Klingenbergら、1978、Biochim. et Biophys. Acta 503:193-210)。ヒドロキシアパタイトカラムをColumn Buffer A(10mM MOPS, pH 7.2, 100mM NaCl, 9.5% Triton X 100)を使用して溶出し、そして、Column Buffer B(10m

M MOPS, pH 7.2, 100mM NaCl, 400mM リン酸ナトリウム)を使用して洗浄した。非ヒト種由来の非組換えANTタンパク質を、Column Buffer Aを使用して空間(void)容量で溶出し、そして、GST-huANT3融合タンパク質が、空間容量にも同様に存在することが予想される; Column Buffer Bを使用して、GST-huANT3融合タンパク質が異なって挙動する事象においてカラムを洗浄する。最終濃度30mM オクチルグリコシド(Calbiochem)(活性に対する最小の効果を有するANTタンパク質を可溶化するのを助ける非イオン性界面活性剤)を有するような様式で、サンプルを収集した(Sterling, 1986, Endocrinol. 119:292-295)。ビーズ抽出された上清またはカラム溶出液を収集し、そして、基本的に製造業者の指示に従って、EXTRACTI-GEL™アフィニティマトリックス(Pierce)を使用して、そこからTriton X-100を除去した(また、Bermanら、1985、Biochemistry 24:7140-7147を参照のこと)。

【0177】

上記方法で調製された種々の量のGST-huANT3をPAGEに供し、そして、ゲルを、コロイド性青色タンパク質染色(Novex, San Diego, CA)を使用して染色した。この染色されたゲルは、融合タンパク質について推定された分子量に対応する分子量を有する単一バンドを示した。種々の容量のサンプル由来のバンド強度、そして、公知の調製物の容量および染色の最小感受性に基づいて、100mLの細菌培養物由来の収量は、約50µgであると推定される。ゲルの1つのレーンにおいて、約500ngのタンパク質をロードし、そして、混入したバンドは検出されなかった;このことは、GST-huANT3タンパク質が、少なくとも約90%純粋~少なくとも約95%純粋であることを示す。

【0178】

GST-huANT3融合タンパク質(前述の実施例を参照のこと)は、この方法によって精製され、そして他のANT融合タンパク質(Hisタグ化huANT3および他のHisタグ化ANTタンパク質を含む)が同様の様式で精製さ

れる。精製されたhuANT3融合タンパク質を使用して、以下のように精製されたヒトANTタンパク質を産生する。

【0179】

GST-huANT3融合タンパク質は、基本的に製造業者の指示に従って、グルタチオン-アガロースビーズ(Sigma)を介してさらに精製される。手短に言うと、GST-huANT融合タンパク質を含む溶液をグルタチオン-アガロースビーズと接触させ、そして、ビーズを洗浄して所望でない混入物を放出する。次に、[樹脂:GST-huANT]複合体を適切な酵素(すなわち、融合タンパク質の残りに由来するhuANTポリペプチドを分離する酵素)で処理する。本明細書中で記載されるGST-huANT3融合タンパク質(すなわち、pMK3Cによってコードされる)の場合、トロンピン(Sigma)は、2つのポリペプチド:GST部分に対応する第1のポリペプチド、および6つのさらなるアミノ酸(すなわち、Gly-Ser-Pro-Gly-Ile-Leu)がそのN末端に存在するヒトANT3に対応する第2のポリペプチド、を産生するような方法で、融合タンパク質を切断する。

【0180】

Hisタグ化huANT融合タンパク質を、基本的に製造業者の指示に従って、ニッケルコーティング樹脂(例えば、PROBOUND™Ni²⁺電荷アガロース樹脂;Invitrogenなど)を介してさらに精製した。手短に言うと、Hisタグ化huANT融合タンパク質を含む溶液をニッケルコーティング樹脂と接触させ、そして、この樹脂を洗浄して所望でない混入物を放出した。次に、[樹脂:Hisタグ化-huANT]複合体を適切な酵素(すなわち、融合タンパク質の残りに由来するhuANTポリペプチドを分離する酵素)で処理する。本明細書中で記載されるHisタグ化-huANT3融合タンパク質の場合、エンテロキナーゼ(Sigma、またはInvitrogenからのEKMAX™も使用され得る)は、2つのポリペプチド:Hisタグ化およびXPRESS™エピトープ部分を含む第1のポリペプチド、およびヒトANT3に対応する第2のポリペプチド、を産生するような方法で、融合タンパク質を切断する。使用される発現構築物がpMK3Aである場合、得られた精製されたヒトANT3タ

ンパク質は、そのN末端に4つのさらなるアミノ酸(すなわち、Pro-Ser-Ser-Ser)を有する。pMK3Bが、Hisタグ化huANT3が単離される細胞中に存在する発現構築物である場合、得られた精製されたヒトANT3タンパク質は、ネイティブなhuANT3の配列(すなわち、配列番号3)を有する。

【0181】

前述の両方の精製工程において、固体支持体に結合されたANT融合タンパク質を、融合タンパク質の残り(これは固体支持体に結合されたままである)からANTタンパク質を遊離酵素(すなわち、トロンビンまたはエンテロキナーゼ)で処理する。ANTタンパク質は液相に放出され、次いで、収集されて、ANTタンパク質を含む溶液およびいくらかの量の遊離酵素を産生する。必要とされる遊離酵素の量は最小である。なぜなら、この処理は、天然で触媒性であるためである;それにも関わらず、いくつかの酵素は、調製物中に残ったままである。所望であれば、酵素分子は、当該分野で公知の種々の手段のいずれかを使用して、調製物中から除去され得る。例えば、酵素は、その酵素について高い親和性を有するリガンドに結合体化した樹脂を使用して、溶液と接触させることによって溶液から除去され得る。エンテロキナーゼの場合では、このような樹脂の1つは、エンテロキナーゼについて高い親和性を有するダイズトリプシンインヒビターを含む、EK-AWAY™樹脂(Invitrogen)である。トロンビンでGST融合タンパク質を処置する方法および所望の組換えタンパク質を精製する方法が以前に記載されている(例えば、SmithおよびCorcoran, Short Protocols in Molecular Biology、第2版、16章、ユニット16.7、Ausubelら編、John Wiley & Sons, New York, New York, 1992、16-28~16-31頁)。しかし、一般的に、任意の所定のANTタンパク質から遊離酵素を分離するための任意の適した方法が使用され得る。

【0182】

(実施例2:)

(GST-huANT3融合タンパク質の発現)

(A. GST-huANT3発現構築物の作製)

以下のプライマーを使用するが、実施例1のように、PCRによって、pMK3A-huANT3からヒトANT3を増幅した。PCRプライマーの以下の提示において、下線部のヌクレオチドは、ANT cDNAの5'末端および3'末端に相補的な配列を示し、そして、二重下線部のヌクレオチドは、制限酵素XhoI (認識配列: 5' - CTCGAG) またはEcoRI (認識配列: 5' - GAATTC) についての認識配列を示す。

【0183】

PCR増幅について使用されるプライマーは:

【0184】

【化10】

正方向(センス):

5'-CCCGGGGAATTCTGATGACGGAACAGGCCATCTCC, あり

配列番号14

逆方向(アンチセンス):

5'-CCCGGGCTCGAGTTAGAGTCACCTTCTTGAGCTC

配列番号15。

発現ベクターpGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して、酵素ポリペプチドおよびANTポリペプチドを含むhuANT3融合タンパク質を産生した。このベクターは、Schistosoma japonicum由来のグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子に作動可能に連結されたtacプロモーターlacI^q(リプレッサー)遺伝子を含む(Smithら、1988、Gene 67:31-40)。このコード配列は、多数のクローニング部位のすぐ5'側のトロンピン切断部位をコードするヌクレオチド配列を含むように改変されている。GST融合タンパク質は、抗GSTを用いるウエスタンブロットによってかまたは比色定量アッセイを使用することによって検出され得る; 後者のアッセイは、GSTの基質とし

て、グルタチオンおよび1-クロロ-2-4-ジニトロベンゼン(CDNB)を利用し、そして、340nmで検出可能な黄色産物を生じる(Habigら、1974、J. Biol. Chem. 249:7130-7139)。この発現ベクター由来の発現構築物から産生されたGST融合タンパク質は、例えば、グルタチオン親和性クロマトグラフィーによって精製され得、そして、所望のポリペプチドが、トロンピンによる融合産物から放出され得る。従って、この発現ベクターは、融合タンパク質の迅速な精製、および比較的小数の異種N末端アミノ酸を有するタンパク質の放出を提供するが、得られた組換え的に産生されたタンパク質は、アミノ末端に2つのさらなるアミノ酸(Gly-Ser)を含む。このtacプロモーターは、例えば、1~5mMイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG; Fluka, Milwaukee, WI)の培養された細胞への添加によって誘導され得、そして、高レベルの発現を提供する。

【0185】

プラスミドpGEX-4T-2を、製造業者の指示に従って、制限エンドヌクレアーゼEcoRIおよびXhoIを用いて消化することによって調製し、そして、水平アガロースゲル電気泳動およびUltraClean Gel Spin kit(Mo Bio Laboratories)を使用するバンド抽出に供した。制限されたANT cDNAを、前述の実施例に記載されるように、制限された発現ベクターを用いて連結した。単一コロニーを50µg/mlアンピシリン(Roche Molecular Biochemicals)を含む3~5mlのLBブロー中での増殖のために選択し、そして、WIZARD™ Plus Series 9600 Miniprep Reagents System(Promega)を使用して、細菌培養物からプラスミドDNAを単離した。これらの確実性を確かめるために、pGEX誘導體プラスミド中に存在する組換えhuANTヌクレオチド配列を、以前に記載されたオリゴヌクレオチドプライマーおよび5'および3'PGE X配列決定プライマー(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、前述の実施例に記載されるように決定した。

【0186】

得られたGST-huANT3発現構築物をpMK3C-GST-huANT3と命名した(また本明細書中でpMK3Cともいう)。プラスミドpMK3Cを1998年11月3日にAmerican Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA)に寄託し、そして、登録番号ATCC98973を与えられた。pMK3C-GST-huANT3発現構築物から産生されたトロンピン処理組換えhuANT3タンパク質は、いくつかの異種N末端アミノ酸(すなわちGly-Ser-Pro-Gly-Ile-Leu-Met)を含み、ここで、「Met」は、huANT3の翻訳開始コドンによってコードされたアミノ酸を示す。しかし、6つの異種アミノ末端アミノ酸が、得られた組換えhuANT3タンパク質に対する何らかの効果を有する証拠はない。

【0187】

GST-huANT3融合タンパク質の発現を確認するために、以下の実験を行った。8個の独立して単離したpMK3C-GST-huANT3形質転換体および1つのコントロール(ベクター形質転換)単離体を、LB-アンピシリン中で一晩増殖し、次いで、2mlの新鮮な培養液で1:20に希釈した。37で3時間増殖した後、IPTGを、0.1mMの最終濃度まで添加した。細胞増殖を2時間続け、この後、1.5の細胞をマイクロチューブに移し、ペレット化し、0.1%のTriton X-100を含む冷却したPBS 300µLに再懸濁し、そして8秒間、2回超音波処理した。超音波処理器を4°で5分間回転させ、懸濁液を新しいマイクロチューブに移し、そして50µLのグルタチオン-アガロースビーズ(Sigma)を添加して、50%スラリーを生成した。周囲温度で5分間インキュベートした後、このビーズを回転させ、そして1mlのPBSで3回洗浄した。この洗浄したペレットをSDS spl緩衝液(62.5mM Tris、pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、5% -メルカプトエタノール、および可視の呈色を与えるのに十分なプロモフェノールブルー)に再懸濁し、そして各々30µLの調製物(15µLの培養液に等しい)をSDS-PAGEに供した。ゲルを、Colloidal Coomassie(G-250)Staining Kit(Novex、San Diego

o、DA)を使用して染色した。pMK3C-GST-huANT3形質転換体由来の8種の調製物の各々において、同じ強度を有する予測分子量のGST-huANT3融合タンパク質のバンドは容易に明らかであり；このバンドはコントロール調製物においては存在しなかった。

【0188】

(B. huANT3融合タンパク質の発現のウエスタンブロット分析)

(1) pMK3A-huANT3 (pBAD/His-huANT3発現構築物) または (2) pMK3C-GST-huANT3 (pGEX/GST-huANT3発現構築物) のいずれかで形質転換したE. coliを、室温で20分間のリゾチーム(100 µg/µl; Sigma)の添加、続く1回の凍結/解凍サイクルにより溶解した。前者の形質転換体の陰性コントロールは、アラビノース誘導を受けなかった形質転換細胞の並行培養物であった。後者の形質転換体のコントロールは、pGEX-4T-2ベクターのみで形質転換したE. coliの並行培養物であった。

【0189】

各溶解物の全タンパク質濃度を、BCA Protein Assayキット(Pierce Chemical Co.)を使用して決定し、そして、等量の各溶解調製物由来の全タンパク質を、等量の2×Laemmli電気泳動緩衝液と混合し、そしてSDS-PAGEに供した。このタンパク質を、ニトロセルロースに電形動的に移動させ、次いでこのニトロセルロースを、各ベクターに含まれる適切なエピトープに対する抗体(すなわち、pMK3A-huANT3について、Invitrogen製のANTI-XPRESS™、およびpMK3C-GST-huANT3について、Amersham Pharmacia Biotech(以前は、Nycomed Amersham plc and Pharmacia & Upjohn Inc.)製のポリクローナルヤギ抗GST)と接触させた。

【0190】

別個の実験において、pMK3C-GST-huANT3形質転換体由来の細菌溶解物を、メーカーの説明書に従って、アガロース-グルタチオンビーズ(S

igma)と共にインキュベートした(前の章、およびSmithら、Expression and Purification of Glutathione S-Transferase Fusion Proteins, チャプター16の第16.7部: Short Protocols in Molecular Biology, 第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons, New York, New York, 1992, 16-28~16-31頁を参照のこと)。このビーズをLeammiサンプル緩衝液に懸濁し、そして上記のようにして、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析に供した。GST-huANT3の収率は低かったが、おそらく、融合タンパク質が細菌膜に挿入されるため、この実験に十分な量の材料が回収された。

【0191】

この結果(図5)は、予測分子量(His-Tag+エンテロキナーゼ部位+抗原性部位+huANT3=38キログルトン)の特定のバンドは、pBAD/his-huANT3ベクターで形質転換したアラビノース誘導性E.coliにおいて観察されたが、非誘導性コントロール培養物においては存在しなかったことを示す。同様に、GST-huANT3に対応するバンドは、pMK3C-GST-huANT3で形質転換したE.coliにおいて観察され、一方、変化のないGSTバンドのみが、発現ベクターで形質転換したコントロールE.coliにおいて観察された。アガロース-GSHビーズを使用するGST-huANT融合タンパク質の精製により、pMK3C-GST-huANT3形質転換細菌の粗溶解物において観察されるものと同じサイズのバンドが生じた。

【0192】

(実施例3)

(昆虫細胞におけるANT3の発現)

(A.バキュロウイルス発現構築物の生成)

huANT3をコードするヌクレオチド配列を含むDNAを、以下のプライマーを使用して、全ヒト脳cDNAライブラリ(Clontech)からPCRによって増幅した。以下のPCRプライマーの表示において、下線付きのヌクレオチドは、ANT cDNAの5'末端および3'末端に対して相補的な配列を示

し、そして二重線付きのヌクレオチドは、制限酵素BamHI（認識配列：5' - GGATCC）またはEcoRI（認識配列：5' - GAATTC）に対する認識配列を示す。

【0193】

使用されたPCRプライマーは、以下である：

前方（センス）：

【0194】

【化11】

5'-TTATAGGATCCATGACGGAACAGGCCATCTCCTTCGCCAAA

（配列番号16）および

逆方向（アンチセンス）：

【0195】

【化12】

5'-TTAAAGAATTCCTTAGATCACCTTCTTGAGCTCGTCGTACAG

（配列番号17）。

【0196】

PCR産物を、制限エンドヌクレアーゼのBamHI（New England Biolabs）およびEcoRI（New England Biolabs）で、製造者の使用書に従って消化した。続いて、水平アガロースゲル電気泳動およびUltraClean™Galspinキット（MoBio Laboratories, Inc.）を使用するバンド抽出によって、精製を行った。

【0197】

バキュロウイルス転移ベクターのpBlueBacHis2（Bバージョン、

Invitrogen)は、5'から3'の方向で、以下の(1)~(4)をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された構成的な多核プロモーターを含む:(1)翻訳開始配列、(2)N末端ポリヒスチジン配列(「Hisタグ」)、(3)組換えタンパク質の検出および精製のためのXPRESS™エピトープタグ、および(4)エンテロキナーゼ切断部位、続いてcDNAが挿入される多クローニング部位。

【0198】

転移ベクターpBlueBacHis2を、製造者の使用書に従って、制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびEcoRIで消化することによって調製し、そして制限DNAを水平アガロースゲル電気泳動、およびUltraClean™GelSpinキット(MoBio Laboratories, Inc.)を使用するバンド抽出に供した。制限PCR産物を、上記の実施例におけるように、制限発現ベクターDNAにライゲーションした。

【0199】

E. coli TOP10F'コンピテント細胞(Invitrogen)を、製造者の説明書に従って、ライゲーション反応物で形質転換した。50µg/mlのアンピシリンを含有するLBブロス3~5ml中での増殖のための単一のコロニーを選択した。プラスミドDNAを、WIZATD™Plus Series 9600 Miniprep Reagents System(Promega)を使用して、細菌培養物から単離した。

【0200】

組換えANT遺伝子配列を決定し、そしてそれらの信頼性を、Prism Ready Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Perkin-Elmer, Catalog #402080)および以下のプライマーを使用するDNA配列決定によって確認した(配列番号1、2および3は、それぞれ、ヒトANT1、2および3に対応する): Polyhedrin Forward Sequencing Priming Site、5'-AAATGATAACCATCTCGC(配列番号18); Baculovirus Reverse Sequencing Priming Si

te、5' - ACTTCAAGGAGAATTTCC (配列番号19) ; ANT3コード配列の内部のプライマー (センス鎖)、5' - ACTTCGCCTTCAACGGATA (配列番号20) ; および5' - TACGGCCAAGGGCA TTCT (配列番号21) ; ANT3コード配列の内部のプライマー (アンチセンス鎖)、5' - TGAAGCGGAAGTTCCTAT (配列番号22) ; および5' - ATGCCGGTTCCCGTACGA (配列番号23)。配列データは、SEQUENCE NAVIGATOR™分析ソフトウェアパッケージ (Perkin-Elmer) を使用して分析した。正確な配列を有する単離したプラスミドを、pMK4A-huANT3と命名した。

【0201】

pMK4A-huANT3は、信頼性のあるhuANT3コード配列を含むが、ANT3リーディングフレームは、発現ベクターのHis-Tag/EPRESS™エピトープのリーディングフレームと同調ではない。従って、pMK4A-huANT3は、組換えANTタンパク質を産生すると期待されないが、これを含む細胞はコントロールとして使用され得る。

【0202】

pMK4A-huANT3のインフレームの誘導体を生成するために、使用した変異原性オリゴヌクレオチドプライマーが、5' - GGCCTGTTCCGTCATCTTATCGTCATCGTCG (配列番号24 ; 下線付きの配列は、huANT3リーディングフレームの5'末端の逆相補体である) および5' - CGACGATGACGATAAGATGACGGAACAGGCC (配列番号25 ; 下線付きの配列は、huANT3リーディングフレームの5'末端に対応する) であること以外は、実施例1のようにして、プラスミドを、QUIK-CHANGE™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を使用して変異誘発した。いくつかの形質転換体を単離し、そしてそれからプラスミドDNAを精製した。プラスミドDNAのヌクレオチド配列を決定し、そして「正確な」配列を有するものを同定し、pMK4B-huANT3と命名した。

【0203】

ヒトANT3をコードするバキュロウイルス発現プラスミドを、「pMK4A (バキュロウイルスシャトル、アウトオブフレームのhu ANT3)」または「pMK4A」; および「pMK4B (バキュロウイルスシャトル、インフレームのhu ANT3)」または「pMK4B」と称する。プラスミドpM4Bは、American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) に、1998年11月3日に寄託され、受託番号ATCC 98972を与えられた。

【0204】

huANT3タンパク質(および関連の調節配列)をコードする配列をバキュロウイルスゲノムに挿入するために、昆虫細胞(MAXBAC™ Spodoptera frugiperda Sf9細胞、Invitrogen, Carlsbad, CA; またはTrichoplusia ni細胞、PharMingen, San Diego, CA)を、メーカーの使用書に従い、BAC-N-BLUE™ Transfection Kit (Invitrogen) を使用して、バキュロウイルス転移構築物pMK4B-huANT3、およびlacZ遺伝子(BAC-N-BLUE™, Invitrogen)のプロモーターを含まない3'フラグメントを含むように操作された線状バキュロウイルスDNA(Autographa californica 多核ウイルス、AcMNPV)と同時トランスフェクトした。組換えバキュロウイルスプラークは、機能的β-ガラクトシダーゼを発現し、そしてX-gal(5-プロモ-4-クロロ-3-インドイル-D-ガラクトシダーゼ)の存在下で青色のプラークとして同定された。これらの組換えウイルスは、以下の実験により示されるように、昆虫細胞においてヒトANT3ポリペプチドを発現する発現構築物である。

【0205】

(B. バキュロウイルス発現系のウエスタンブロット分析)

高力価のウイルスストックを生成し、そして、メーカーの使用書に従って、組換えタンパク質を感染性SF9細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)またはT.ni細胞(PharMingen, San Diego, CA)において発現させた(Piwnic-Worms、Expression

of Proteins in Insect Cells Using Baculovirus Vectors, チャプタ16の第II章、Short Protocols in Molecular Biology, 第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons、New York, New York, 1992, 16-32~16-48頁、Kitts, チャプタ7、Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, 第39巻、C. R. Richardson編、Humana Press, Totawa, NJ, 1995, 129~142頁もまた参照のこと)。

【0206】

形質転換したSf9細胞を遠心分離によってペレット化し、そして100 μ lのMSB緩衝液(210mM マンニトール(Sigma)、70mM スクロース(Fluka)、50mM Tris-HCl、pH7.4、10mM EDTA)を添加することによって溶解し、そして3回の凍結-解凍サイクルを行った。全細胞画分、サイトゾル画分、亜ミトコンドリア粒子(SMP)画分、ミトコンドリア画分および形質膜画分を以下のように調製した。細胞溶解物を、4で10分間、600gで遠心分離し、形質膜ペレットを調製した。上清を除去し、そして取りのけた。この形質膜ペレットを100 μ lのMSBで洗浄し、4で、10分間600gで遠心分離し、そして分析のために使用した。上清を除去し、第1の上清と合わせ、そして混合した。この上清の半分を使用して、4で15分間、14,000gで遠心分離することによって、ミトコンドリア画分およびサイトゾル画分を調製した；このペレットは、ミトコンドリア画分を提示し、そして上清はサイトゾルを提示する。この上清のもう半分を4で15分間、14,000gで遠心分離して、ミトコンドリア含有ペレットを生成し、これをMSBに再懸濁し、0.25mg/mlのジギトニン(Roche Molecular Biochemicals、以前は、Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)と共に、2分間インキュベートし、そして、カップホーン(cup-horn)ソニケーターにおいて、50%のデューティーサイクルで3分間超音波処理して、亜ミトコンドリア粒子(S

MP)を生成した。

【0207】

各画分のタンパク質含有量を、BCA Protein Assayキット(Pierce Chemical Co.)を使用して決定し、そして1レーンにつき8 μ gの全タンパク質をSDSポリアクリルアミドゲルに充填し、電気泳動し、そしてHYBOND™ ECL Nitrocellulose Membrane(Amersham Life Science)に移した。融合タンパク質を、メーカーの使用書に従って、ANTI-XPRESS™ Antibody(Invitrogen, Catalog #R910-25)およびセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス二次抗体(Amersham Life Science)を使用して、ウエスタンブロットで検出した。

【0208】

ウエスタン分析の結果を図6に示す。組換えGST-huANT3融合タンパク質(分子量36.6kD)が、全細胞、ミトコンドリア、垂ミトコンドリア粒子および形質膜において検出された。シグナルは、ミトコンドリア粒子および垂ミトコンドリア粒子において最も強く、一方、サイトゾル画分においては、バンドは検出されなかった。これらのデータは、ヒト組換えhuANT3融合タンパク質は、形質膜に組み込まれるよりもより効果的にミトコンドリア膜に取り込まれることを示唆する。さらに、全ての組換えタンパク質がタンパク質の組み込まれるわけではない。なぜなら、サイトゾル画分においてシグナルは検出されなかったからである。最終のレーンのオートラジオグラムは、磁性アガロースビーズを使用して細胞溶解物から単離したHisタグ化huANT3が、メーカーの使用書(Qiagen; Hilden, Germany)に従って、Niに結合したことを示す。

【0209】

従って、E. coliにおけるように、huANT3は、バキュロウイルス/Sf9系において発現される。さらに、組換え生成した6xHisおよびエプタープタグ化huANT3融合タンパク質は、35を越える異種N末端アミノ酸の存在にもかかわらず、Sf9細胞中のミトコンドリアに適切に局在化し、そして

金属（例えば、ニッケル）に対するHis-Tag部分の親和性を使用することによって細胞画分から単離され得る。

【0210】

（実施例4：）

（酵母におけるANT3の発現）

（A.発現構築物および宿主細胞）

ヒトANT3 cDNAを、実施例1におけるように、しかし、以下のプライマーを用いてPCRによって増幅した。以下の代表的なPCRプライマーにおいて、一本下線のヌクレオチドは、ANT cDNAの5'末端および3'末端に相補的な配列を示し、そして二重下線のヌクレオチドは、制限酵素XhoI（認識配列：5'-CTCGAG）またはAsp718（認識配列：5'-GGTACC）に対する認識配列を示す。

【0211】

PCR増幅のために使用されたプライマーは以下である：

順方向（センス）：

【0212】

【化13】

5'-TTAATGGGTACCATGACGGAACAGGCCATCTCCTTCGCCAAA, 5'から
配列番号 28

逆方向（アンチセンス）：

【0213】

【化14】

5'-TTATACTCGAGTTAGATCACCTTCTTGAGCTCGTCGTACAGG
配列番号 29

PCR産物、および発現ベクターDNAを、製造者によって供給される反応緩

衝液を用いて、製造者の勧告に従って、制限エンドヌクレオチドレアーゼXho IおよびAsp718（両方ともRoche Molecular Biochemicalsからの酵素）で消化した。発現ベクターpYES2（Invitrogen）を使用した。このベクターは、誘発性GAL1プロモーターからすぐ下流に位置する多重クローニング部位、ならびにura3酵母細胞における高い複製保持および選択のために、2u複製起点およびS.cerevisiae URA3遺伝子をそれぞれ含む。

【0214】

制限されたDNAを、先述の実施例におけるように、水平アガロースゲル電気泳動法およびUltraClean GelSpin kit（Molecular Laboratories）を用いてバンド抽出によって精製し、お互いに連結し、そしてE.coli細胞を形質転換するために使用した。プラスミドDNAをいくつかの形質転換株から単離し、そして挿入DNAのヌクレオチド配列を決定し、そしてhuANT3のものであることを確認した。1つの確認されたプラスミドを選択し、さらなる研究のために使用し、そしてpMK5A（huANT3）と命名した。

【0215】

第2の酵母huANT3発現ベクター、pMK5Bを以下のように構築した。プラスミドpMK5AおよびpYESTrp2（Invitrogen）を、制限酵素BglIおよびPvuII（両方ともNew England Biolabsから）で消化し、そしてゲル精製を行い、連結し、そして上記のようにE.coliを形質転換するために使用した。発現ベクターpYES2Trpは、pYES2に類似しているが、TRP1選択可能マーカを含む。プラスミドDNAをいくつかの形質転換株から単離し、そして制限マッピングを行い、予期される発現構築物の構造を確認した。1つの確認されたプラスミドを選択し、さらなる研究のために使用し、そしてpMK5B（huANT3）と命名した。

【0216】

第3の酵母huANT3発現ベクター、pMK5Cを、発現ベクターpYGE2（これは、TRP1選択可能マーカ、および多重クローニング部位からの

強力なPGKプロモーター上流を含む(BrunelliおよびPall、1993 Yeast 9:1299-1308))を用いて構築した。プラスミドpYPGE2 DNAを、XhoIおよびAsp718で消化し、ゲル精製を行い、そしてXhoI-およびAsp718-制限された実施例1のhuANT3 PCR産物を用いて連結した。連結混合物を使用してE. coliを形質転換し、そしてプラスミドDNAをいくつかの形質転換株から単離し、そして制限マッピングを行い、予期される発現ベクターの構造を確認した。1つの確認したプラスミドを選択し、さらなる研究のために使用し、そしてpMK5C(huANT3)と命名した。

【0217】

酵母発現系を形成するために、S. cerevisiae株INVSc1(MAT、his3-1、leu2、trp1-289、ura3-52)を、S. c. EASYCOMPTM Transformation1 Kit (Invitrogen)を用いて、精製したpMK5A、pMK5BおよびpMK5C DNAで形質転換した。第2のS. cerevisiae株、J13(MAT、ade2-1、leu2-3、leu2-112、his3-11、his3-15、trp1-1、ura3-1、can1-100、AACI::LEU2、AAC2::HIS3、AAC3::URA3)もまた発現構築物で形質転換した。ACC遺伝子は、S. cerevisiaeにおけるミトコンドリアADP/ATPトランスポーターの3つのアイソフォームをコードし、株J13において中断される(Giraudら、J. Mol. Biol. 281:409-418(1998))。従って、J13形質転換株(これは、内因性ANT(AAC)タンパク質を発現し得ない)は、発現構築物(この発現構築物によって、J1の形質転換株は形質転換された)によってコードされるヒトANTタンパク質を発現するのみであることが予期される。

【0218】

(B. 酵母発現系のノーザンプロット分析)

株J13におけるhuANT3 mRNA産生のレベルを調べるために、pMK5BおよびpMK5Cで形質転換された細胞のノーザンプロット分析を、

当該分野において公知の方法に従って実施した。簡潔に言うと、対数期の中間まで形質転換された細胞およびコントロール（形質転換されていない）細胞を収集し、そして溶解させた。RNAを溶解産物から抽出し、電気泳動し、そしてニトロセルロースフィルターへ移動させた（Molecular Biology、第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons、New York、New York（1992）、13:44-46のShort Protocolsの第13章13.12部、Trecó、Preparation of Yeast RNA、および前出の4:23-25の第4章4.9部、Seldon、Analysis of RNA by Northern Hybridizationを参照のこと。）XhoI-およびAsp718-制限された実施例1のhuANT3 PCR産物を放射性標識し、そしてプローブとして使用し、そしてヒト脾臓組織由来のRNA調製物をポジティブコントロールとして使用した。

【0219】

結果（図10）は、適切なサイズのANT3特異的RNAが、ヒト脾臓およびいずれかの発現ベクターで形質転換された酵母細胞において産生されるが、形質転換されない酵母細胞において産生されないことを示す。pYPGE2由来発現構築物pMK5Cは、PGKプロモーターからANT3発現を指向するが、pYES2T由来構築物pMK5B（これにおいて、ANT発現はGAL1プロモーターによって駆動される）より多いANT3 RNAを明らかに生じる。しかし、いずれの場合も、有意なレベルのhuANT特異的RNAは、任意の内因性アデノシンヌクレオチドトランスロケータータンパク質を欠失している酵母バックグラウンドにおいて産生された。

【0220】

（実施例5）

（哺乳動物細胞におけるANT3の発現）

先述の実施例は、ANTおよびANT融合タンパク質が、種々の系において組換え的に産生され得る種々の手段を記載する。このようなANTタンパク質は、種々のアッセイにおいて使用され得るが（下を参照）、哺乳動物細胞から大量の

ネイティブANTタンパク質を単離するのに望ましくあり得る。具体的には、この実施例に記載されるように、組換えウイルス粒子（ここでは、ANTタンパク質がウイルスエンベロープに表示される）を産生する望ましくあり得る。このようなANT表示ウイルス粒子は、非常に安定であり、そして種々のアッセイ（例えば、ANTタンパク質に結合する化合物がスクリーニングおよび同定されるアッセイを含む）において有用であることが予想される。

【0221】

哺乳動物発現系の別の有用な成果は、ヒトミトコンドリアの生成および単離であり、このミトコンドリアにおいて、特定のANTアイソフォームが、このようなアイソフォームの特定の生物学的役割を決定するために過剰発現する。例えば、ANT3は、明らかに、ヒト組織において偏在的に発現し、一方、ANT1は、主に、心臓および骨格筋において発現する（Stepienら、1992、J. Biol. Chem. 267: 14592 - 14597）。培養された心臓または筋肉細胞におけるhuANT3の指向される過剰発現は、主にANT1アイソフォームを含むミトコンドリアにおいて生じることが予想される。このような「ANTアイソフォームに富む」ミトコンドリアは、単離され得、そして種々のミトコンドリアの機能について試験され得る。

【0222】

哺乳動物細胞においてANTタンパク質を発現するための構築物は、段階的なプロセスにおいて調製される。まず、ANTタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結したプロモーター（および関連調節配列）を含む発現カセットを、細菌性プラスミドベースの系において構築し；これらの発現カセットを含む構築物を評価し、そして哺乳動物細胞（これは、この構築物によって一過性にトランスフェクトされる）においてANTを産生するそれらの能力について最適化する。第2に、ANT発現カセットを、ウイルス系に移し、このウイルス系は、ウイルス（例えば、SV40、BPV、EBV、アデノウイルス；以下を参照）の溶菌増殖の間、組換えタンパク質を産生するか、または哺乳動物細胞ゲノムへと安定に組込まれそして哺乳動物細胞ゲノムを形質導入し得るウイルス（例えば、レトロウイルス発現構築物）を形成する。

【0223】

(A. 一過性発現)

第1工程に関して、市販の「シャトル」(すなわち、E. coliと哺乳動物の両方の細胞で複製が可能である)ベクター(これは、哺乳動物細胞において機能し、そしてANTをコードする配列に作動可能に連結し得るプロモーターを含む)としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: SV40後期プロモーター発現ベクター(例えば、pSVL、Pharmacia)、糖質コルチコイド-誘導プロモーター発現ベクター(例えば、pMSG、Pharmacia)、ラウス肉腫エンハンサー-プロモーター発現ベクター(例えば、pRc/RSV、Invitrogen)およびCMV初期プロモーター発現ベクター(ネオマイシン、ハイグロマイシンまたはZEOCIN™のような因子に対して選択可能なマーカーを有するそれらの誘導体を含む)(例えば、pRc/CMV2、pCDM8、pcDNA1.1、pcDNA1.1/Amp、pcDNA3.1、pcDNA3.1/ZeoおよびpcDNA3.1/Hygro、Invitrogen)。概して、ANTのための好ましいシャトルベクターは、(形質転換された細胞の単離および保持を容易にするために)選択可能なマーカー、および(ANT遺伝子の過剰発現が有毒効果を有し得る場合に)誘発性、従って、調節性のプロモーターを有するベクターである。

【0224】

哺乳動物細胞をトランスフェクトするための方法は、当該分野において公知である(Molecular Biology、第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons、New York、New York、1992、頁9-3~頁9-16のShort Protocolsの第9章I節、Kingstonら、「Transfection of DNA into Eukaryotic Cells,」を参照のこと)。コントロールプラスミド(例えば、pC110(Pharmacia)は、試験されるANT発現構築物で同時トランスフェクトされ得、その結果、ANTのレベルは、コントロールプラスミドから発現された遺伝子産物に対して正規化され得る。

【0225】

哺乳動物発現系のウエスタン分析は、細菌、昆虫または酵母の細胞に対立するものとして、哺乳動物細胞由来のタンパク質調製物の調製のために、異なる方法が使用される点以外は、先述の実施例に記載されるように基本的に実施される。酵母からタンパク質を単離するこのような方法は、当該分野において公知である（例えば、Molecular Biology、第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons、New York、New York、1992、頁9-17～頁9-23のShort ProtocolsのKingstonおよびSheen、第9章9.6A節ならびにBrasier、第9章9.6B）を参照のこと）。好ましい発現カセットは、基本的に、プロモーター、および目的のANT遺伝子に作動可能に連結した関連調節配列からなるが、ANTタンパク質を発現するように誘発される場合、所定のANT発現カセットを含むベクターで一過性に形質転換した細胞の高レベルのANTタンパク質を発現する能力によって同定され；これらの発現カセットは、ウイルス発現ベクターに組込まれる。

【0226】

（B．ウイルス発現）

好ましい発現カセットを含む核酸、好ましくは、DNAは、これらが調製され、特徴付けられそして最適化された一過性発現構築物から単離される（先述の節を参照）。このような発現カセットを単離する好ましい方法は、PCRによる増幅によるが、他の方法（例えば、適切な制限酵素での消化）が使用され得る。好ましい発現カセットは、以下の形態で、ウイルス発現ベクター、好ましくはレトロウイルス発現ベクターに導入される。

【0227】

好ましい発現カセットを含むDNA分子は、連結によってレトロウイルストランスファーベクターに導入される（先述の実施例を参照）。2つの型のレトロウイルストランスファーベクターが、当該分野において公知である：複製不能と複製可能。複製不能のベクターは、感染粒子を産生するのに必要なウイルス遺伝子を欠失するが、ウイルス転移のために必要なcis作用性ウイルス配列を保持する。このようなcis作用性配列は、パッキング配列、逆方向転写および取込

みのためのシグナル、ならびにウイルスのプロモーター配列、エンハンサー配列、ポリアデニル化配列および他の調節配列を含む。複製可能なベクターは、これら全ての要素、およびビリオン構造タンパク質をコードする遺伝子（典型的には、命名された遺伝子gag、polおよびenvによってコードされる遺伝子）を保持し、従って、種々の細胞株において、感染粒子を形成し得る。対照的に、これらの機能は、イントランスで、パッキング細胞株（すなわち、gag、polおよびenv遺伝子をコードするが、パッキング配列を欠失しているmRNAを産生する細胞株）において複製不能なベクターに供給される。通常、Molecular Biology、第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons、New York、New York、1992、頁9-30～頁9-35のShort ProtocolsのCepko、第9章9.10節：を参照のこと。

【0228】

ANT発現カセットを含むレトロウイルス構築物は、カセット配列およびプサイパッケージング配列を含むRNA分子を産生する。これらのRNA分子は、適切な細胞株にウイルス構造タンパク質によってキャプシド形成されるウイルスゲノムに対応する（「適切な」とは、例えば、パッケージング細胞株が、複製不能なレトロウイルスベクターに基づく構築物のために使用されなければならないことを意味する）。次いで、感染ウイルス粒子が産生され、そして細胞膜から出芽することによって、培養液上清へと放出される。感染粒子は、ANT発現カセットを含むウイルスRNAゲノムを含むが、公知の方法に従って調製および濃縮される。所望されないヘルパーウイルス（すなわち、ANT発現カセットを含まないウイルス粒子）をモニターすることが望ましくあり得る。通常、Molecular Biology、第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons、New York、New York、1992、頁9-36～頁9-45のShort Protocols、第9章の9.11部、9.12部および9.13部、Cepkoを参照のこと。

【0229】

ANT発現カセットを含むウイルス粒子は、インビトロ（例えば、培養された

細胞)で、またはインビボ(例えば、げっ歯類の細胞、または鳥類の細胞(これらは全動物の一部である)で感染させるために使用される。組織外植片または培養胚はまた、当該分野において公知の方法に従って感染させ得る。通常、Molecular Biology、第2版、Asubelら編、John Wiley & Sons、New York、New York、1992、頁9-45~頁9-48のShort Protocols、第9章の9.14部、Cepkoを参照のこと。使用されるこの型の細胞に関わりなく、ANTタンパク質の産生は、組換えウイルスゲノムによって指向される。

【0230】

好ましい実施例において、組換え的に産生されたANTタンパク質は、培養細胞の細胞膜へ挿入される。レトロウイルス発現構築物は、細胞膜の出芽によってウイルス粒子を産生するので、培養液上清へ送達された得られるウイルス粒子は、それらの被膜へ組み込まれたANTタンパク質を、好ましくは粒子の表面上に有する。このようなANT表示ウイルス粒子は、ANTタンパク質に対して安定な構成を提供すること、そして、従って、直接的にか、またはANTがさらに精製され得る供給源材料としてのいずれかで、ANTタンパク質を使用するアッセイにおいて有用であることが予期される。ミトコンドリアの膜に挿入されるANTタンパク質の量を最小にすることが望ましい場合、⁰細胞(これは、ミトコンドリアがほとんどないかまたは全くないような形態で処理されている)が宿主細胞として使用される。

【0231】

(C.pCDNA-ANT3発現構築物の調製および発現)

製造業者の指示に従って、以下のプライマー、AMPLITAQ™DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer)、ならびにGENEAMP™PCR Reagent Kit(Perkin-Elmer)に供給された試薬および緩衝液を用いて、サーマルサイクラーでポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、ANT3 cDNAを増幅した。PCRプライマーの以下の表示においては、下線を付したヌクレオチドは、ANT3 cDNAの5'末端および3'末端に相補的な配列を示し、二重下線を付したヌクレオチドは、制限酵素XhoI(

認識配列：5' - CTCGAG) および Asp718 (認識配列：5' GGTA
CC) の認識配列を示す。そしてANT3開始コドン (ATG) および終止コ
ドン (TAA) の逆相補配列を太字にしている。

【0232】

ANT3発現構築物 (pMK3A - huANT3 , a . k . a . pBAD / H
is - ANT3) からヒトANT3 (huANT3 ; 配列番号3) を増幅するた
めに用いたプライマーは以下であった：

【0233】

【化15】

フォワード(センス)：

5'-TTAATGGTACCATGACGGAACAGGCCATCTCCTTCGCCAAA, および
(配列番号31)

リバース(ア=4センス)：

5'-TTATACTCGAGTTAGATCACCTTCTTGAGCTCGTCGTACAGG
(配列番号32)

製造業者の供給した反応緩衝液を用い、製造業者の推奨に従って、制限エンド
ヌクレアーゼXhoIおよびAsp718 (両方の酵素ともRoche Mol
ecular Biochemicalsから入手) を用いて、PCR産物を消
化した。水平方向アガロースゲル電気泳動およびUltraClean™Gel
Spinキット (Mo Bio Laboratories , Inc . , Sol
ana Beach , CA) を用いたバンド抽出によって、制限DNAを精製し
た。

【0234】

発現ベクターpcDNA3 (Invitrogen , Carlsbad , CA
) を用いた。このベクターは、5' ~ 3' 方向に作動可能に連結された以下のエ
レメントを含む：サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー / プロモーター
(P_{CMV}) ; いくつかの制限酵素の認識配列を含むマルチクローニングサイト (M
CS) ; およびウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化シグナルおよび転

写終止配列 (mRNAの安定性を増強するため)。この発現ベクターはまた、原核生物 (例えば、E. coli) における形質転換体のポジティブ選択用のアンピシリン耐性遺伝子、ならびに哺乳動物細胞における形質転換体のポジティブ選択用のネオマイシン耐性遺伝子、そして細菌および哺乳動物細胞用の複製起点 (それぞれ、ColE1由来およびSV40由来) を含む。SV40の複製起点は、発現構築物のエピソーム複製、およびSV40のラージT抗原を発現する細胞 (すなわち、COS-1またはCOS-7細胞、それぞれ、ATCC登録番号CRL-1650およびCRL-1651) における簡易なベクターレスキューを可能にする。

【0235】

製造業者の指示に従って、制限エンドヌクレアーゼXhoIおよびAsp718を用いた消化、そして水平方向アガロースゲル電気泳動に供し、そしてUltraClean™ Gel Spinキット (Molecular Biology Laboratories) を用いたバンド抽出によって、プラスミドpcDNA3を調製した。製造業者の反応緩衝液を用い、製造業者の指示に従って、T4DNAリガーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA) を用いて、制限酵素消化したANT cDNAを、同様に消化したpcDNA3発現ベクターDNAにライゲーションした。製造業者の指示に従って、ライゲーション混合液を用いて、コンピテントなE. coli細胞 (DH5 株; Life Technologies, Inc. {Gibco BRL}, Gaithersburg, MD) を形質転換した。単一のコロニーを選択し、50 µg/mlのアンピシリン (Roche Molecular Biochemicals) を含有する3~5mlのLBブロス中で増殖した (Sambrook, J., Fritsch, E. F., およびManiatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。WIZARD™ Plus Series 9600 Miniprep Reagents System (Promega, Madison, WI) を用いて細菌培養物からプラスミドDNAを単離し

た。p c D N A 3 - 由来 A N T 3 発現構築物のいくつかの単離体を制限マッピングして、その構築物を確認した。さらなる実験用に、予想された制限マッピングを有する p c D N A 3 - A N T 3 発現構築物の単離体の1つを選択して、「p M K 6 - A N T 3」と名づけた。

【0236】

(実施例6：A N T - グリーン蛍光(緑色蛍光)タンパク質(A N T - G F P)融合タンパク質のクローニングおよび発現)

本実施例において、2つの異なるA N T - G F P融合タンパク質発現構築物の調製および構築を記載する。グリーン(緑色)蛍光タンパク質(G F P)は、天然に存在する蛍光タンパク質であり、シフトした発光スペクトル、および/またはネイティブのタンパク質よりも強度に蛍光を発する能力を有するG F P誘導体を生成するため大きく遺伝子操作されたタンパク質である(G F Pの概説については、Kendallら、Trends in Biotechnology 16:216~224, 1998、およびそれに引用された参考文献を参照のこと；G F Pでの論文については、Chalfie, M., およびKain, S編、Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998、およびそこに引用されている参考文献を参照のこと)。本明細書において用いる場合、用語「グリーン蛍光タンパク質」は、野生型グリーン蛍光タンパク質(野生型G F P)、ならびに青色シフトした野生型G F Pの誘導体、シアン色シフトした野生型G F Pの誘導体、赤色シフトした野生型G F Pの誘導体、および黄色シフトした野生型G F Pの誘導体(それぞれ、B F P、C F P、R F PおよびY F Pと名づけられる；P C T公開出願WO98/06737を参照のこと)、ならびにさらなる機能的ポリペプチド配列を含む他のG F P誘導体を包含する。

【0237】

(A. アミノ末端融合(E Y F P - A N T)タンパク質の調製)

実施例2において詳細に記載されるように、p M K 3 C - G S T - h u A N T 3(本明細書ではp M K 3 Cとも呼ばれる)は、コード配列を含むp G E X - 4

T-2由来の発現構築物であり、GST-huANT3融合タンパク質(GST, グルタチオンSトランスフェラーゼ)の発現を指向する。プラスミドpMK3Cを、制限酵素BamHIおよびXhoIで消化し、ANT3コード配列を含むがGSTをコードする配列を欠く制限フラグメント、またはpMK3C中でGSTをANT3に結合するトロンピン切断部位を遊離させる。

【0238】

発現ベクターpEYFP-C1(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)を、BglIIおよびSalIを用いて制限酵素消化した。BglII(pEYFP-C1ベクター中の)およびBamHI(ANT3フラグメント中の)は、同一の制限配列を有さないが、これらの制限酵素は、配列5'-GATCを有する適合性の粘着性の末端を生成する。同様に、SalI(pEYFP-C1ベクター中の)およびXhoI(ANT3フラグメント中の)は、同一の制限配列を有さないが、これらの制限酵素は、配列5'-TCGAを有する適合性の粘着性の末端を生成する。前述の制限フラグメントから形成される所望の連結産物において、pEYFP-C1中のBglIIは、ANT3コードフラグメント中のBamHI部位に連結され、そしてANT3コードフラグメント中のXhoI部位は、pEYFP-C1中のSalI部位に連結され、そして得られたプラスミドは、YFP-ANT3融合タンパク質をコードする。用語「EYFP-ANT3融合タンパク質」は、(1)513nmで最大励起をそして527nmで発光ピークを有する、強化された黄色蛍光タンパク質(EYFP)に対応するアミノ末端ポリペプチド、および(2)huANT3に対応するカルボキシ末端ポリペプチド部分、を有する単一の連続するポリペプチド鎖を示す。

【0239】

当該分野で公知の標準的条件下でT4DNAリガーゼを用いて、制限酵素消化したDNAを、互いに連結した。製造業者の指示に従って、ライゲーション混合液を用いて、コンピテントなrecA1 hsdR endA1E.coli細胞(TOP10F'株; Invitrogen, Carlsbad, CA)を形質転換した。単一のコロニーを選択し、3~5mlのLBブロス中で増殖し、そ

してWIZARD™ Plus Series 9600 Miniprep Reagents System (Promega, Madison, WI)を用いてプラスミドDNAを細菌培養物から単離し、そして制限マッピングした。推定される制限マッピングを有するEYFP-ANT3発現構築物の単離体の1つをさらなる実験用に選択し、そして「pMK7-EYFP(N)-ANT3」と名づけた。

【0240】

(B.カルボキシ末端融合(ANT-EYFP)タンパク質の調製)

プラスミドpcDNA3-huANT3(pMK6-ANT3)は、XhoI(huANT3インサートの3'末端で)およびXbaI(MCSにおいてXhoI部位から3')で消化した制限酵素である。EYFPをコードする配列を含むインフレームのXhoI-XbaI制限フラグメントを以下の通り調製した。製造業者の指示に従って、以下のプライマー、基質としてプラスミドpEYFP-C1、AMPLITAQ™ DNA Polymerase(Perkin-Elmer, Foster City, CA)、ならびにGENEAMP™ PCR Reagent Kit(Perkin-Elmer)に供給された試薬および緩衝液を用いて、サーマルサイクラーでのPCRによりDNAを増幅した。以下に提示するPCRプライマーにおいて、一本線で下線を付したヌクレオチドは、EYFPコードDNAの5'末端および3'末端に相補的な配列を示し、二本線で下線を付したヌクレオチドは、制限酵素XhoI(制限配列:5'-CTCGAG)およびXbaI(制限配列:5'-TCTAGA)の制限配列を示しており、そしてEYFP開始コドン(ATG)およびYFP停止コドン(TAG)の逆相補配列を太字で示している。

【0241】

用いたプライマーは以下のヌクレオチド配列を有する:

【0242】

【化16】

フォワード(センス):

5'-GGGCCCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG

(配列番号33)

リバース(アンチセンス):

5'-GGGCCCTCTAGACTACTTGTACAGCTCGTCCAT

(配列番号34)

制限酵素消化したPCR DNAおよびプラスミドDNAを、水平方向アガロースゲル電気泳動、およびUltraClean™ Gel Spinキット(Mo Bio Laboratories)を用いるバンド抽出によって、精製した。精製したDNAをT4 DNAリガーゼを用いて共に連結し、そしてこれを用いて、製造業者の指示に従って、コンピテントなE. coli細胞(DH5株; Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)を形質転換した。単一のコロニーを選択し、そして50 µg/mlのアンピシリンを含有する3~5mlのLBブロス中で増殖した。プラスミドDNAを前述の実施例のように細菌培養物から単離し、そして制限マッピングした。予想される制限マッピングを有するANT3-YFP発現構築物の単離体の一つを、さらなる実験用を選択し、そして「pMK8-ANT3-EYFP(C)」と名づけた。標準的な方法を用いて、pMK8-ANT3-EYFP(C)中のANT3-YFPコード領域のヌクレオチド配列を、確認した。pMK8-ANT3-EYFP(C)の構築に依って、この発現構築物は、(1)アミノ末端human ANT3ポリペプチド、および(2)513nmで最大励起を、そして527nmでピーク発光を有するカルボキシ末端強化黄色蛍光タンパク質(EYFP)を有するタンパク質の産生を指向する。

【0243】

(C-ANT3-EYFP融合タンパク質の発現および細胞内局在化)

すぐ直前の節に記載された、2つのANT-GFP融合タンパク質の発現および細胞内局在化をいくつかの方法で試験した。第一に、蛍光顕微鏡を用いて、pMK7-EYFP(N)-ANT3またはpMK8-ANT3-EYFP(C)

のいずれかを用いて形質転換した293細胞を可視化した。pMK7-EYFP(N)-ANT3の場合、観察された免疫蛍光は、細胞質全体にわたって拡散され広がった。対照的に、pMK8-ANT3-EYFP(C)で形質転換された細胞において見られた免疫蛍光は、ミトコンドリアに対して限定されるものである。ANT3-GFP発現構築物で形質転換した他の細胞型(すなわち、COS-1およびSH-SY5Y)で、類似の結果を見出した。

【0244】

ANT3-EYFP融合タンパク質のミトコンドリア局在化をさらに試験するために、細胞内画分のウエスタン分析を以下の通り実行した。形質転換した293細胞を遠心分離によってペレット化し、そして100 μ lのMSB緩衝液(210mMマンニトール(Sigma), 70mMスクロース(Fluka)、50mM Tris-HCl、pH7.4、10mM EDTA)を添加し、そして3回の凍結乾燥サイクルを実施することにより溶解した。総細胞画分、細胞質画分、ミトコンドリア内粒子画分、ミトコンドリア画分および原形質膜画分を以下の通り調製した。細胞溶解物を、4 $^{\circ}$ Cで10分間、600gで遠心分離して原形質膜ペレットを調製した。上清を、取り除けておいた。原形質膜ペレットを、100 μ lのMSBを用いて洗浄し、4 $^{\circ}$ Cで10分間、600gで遠心分離し、そして分析用に用いた。上清を取り出し、最初の上清とあわせて、混合して、そしてこれを用いて、4 $^{\circ}$ Cでの15分間の12,000~14,000gの遠心分離によって、ミトコンドリア画分および細胞質画分を調製した;このペレットは、ミトコンドリア画分を示し、そして上清は細胞質を示す。

【0245】

BCA Protein Assayキット(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を用いて各画分についてのタンパク質含量を決定し、そしてSDSポリアクリルアミドゲル上に1レーンあたりに等量(10 μ g)の総タンパク質をロードし、電気泳動し、そしてHYBOND™ECLニトロセルロースメンブレン(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)に転写した。本質的に製造業者の指示に従って、すべてのGFP誘導体を認識し、そして西洋ワサビペルオキシ

ダーゼへの結合を介して検出可能に標識されている抗体 (the Living Colors (登録商標) ペプチド抗体、Clontech, Palo Alto, CA) を用いて、ANT3 - EYFP融合タンパク質を、ウエスタンブロット中で検出した。ウエスタンブロット分析の結果により、pMK8 - ANT3 - EYFP (C) (ここで、YFPコード配列は、ANT3 - GFP融合タンパク質のカルボキシ末端側である) から発現したタンパク質が、ミトコンドリアに独占的に局在していることが確認される。

【0246】

(実施例7 : 細菌中のHISタグ化サイクロフィリンA (HIS6X - CYP A) 融合タンパク質のクローニングおよび発現)

ANTと相互作用する (Woodfieldら、Biochem J. 336 : 287 ~ 290 , 1998) サイクロフィリンD (CypD) とは異なり、構造的に関連するタンパク質であるサイクロフィリンA (CypA) は、少なくとも正常の生理学的な条件下では、ANTと相互作用しないようである。従って、CypAは、CypD : ANT相互作用に影響する因子のアッセイのための比コントロールとして調製された。CypA融合タンパク質を含む大量のCypAタンパク質を産生するために、組み換えDNA技術を用いた。

【0247】

(A . CypA cDNAのPCR増幅)

ヒト胎盤より調製した総細胞性RNA由来のcDNAライブラリーを、商業的供給元より得た (Clontech, Palo Alto CA) 。RNAを、40mM Tris - HCl (pH7.0) 、6mM 塩化マグネシウムおよび2mM 塩化カルシウムを含む緩衝液中に1ulのDNase I (10u / ul) を使用する、RNAを含まないDNase I (Roche Molecular Biochemicals, formerly Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) で、37 °Cにて30分間の処理によって精製した。この処理に続いて、フェノール/クロロホルム抽出を2回、クロロホルム抽出を1回および酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿を行った。RNAペレットを遠心分離によって回収し

、70%エタノールで洗浄し、風乾し、そしてRNase Hを含まない滅菌水中に再懸濁した。RNase H欠損逆転写酵素(SUPERSCRIPT™, Life Technologies, Rockville, MD)を使用してこのRNAを逆転写して、cDNAを作製した。

【0248】

サーマルサイクラーにて、CypA cDNAを、以下のプライマー、AMPLITAQ™ DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer)、ならびにGENEAMP™ PCR試薬キット(Perkin Elmer)中に供給される試薬および緩衝液を製造業者の指示書に従って使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅した。以下に示されるPCRプライマーにおいて、下線を付したヌクレオチドは、CypA cDNAの5'末端および3'末端に相補的な配列を示し、二重下線を付したヌクレオチドは、制限酵素XhoI(認識配列:5'-CTCGAG)およびAsp718(認識配列:5'-GGTACC)についての認識配列を示し、そしてhuCypA開始コドン(ATG)および終止コドン(TAA)の逆相補を太字にした。

【0249】

ヒトCypA(huCypA;配列番号(SEQ ID NO:)26)について、以下のヌクレオチド配列を有するプライマーを使用した:

順方向(センス):

【0250】

【化17】

5'-TTTAAACTCGAGTATGGTCAACCCACCGTGTC

(配列番号35)、および

逆方向(アンチセンス)

【0251】

【化18】

5'-TATATAGGTACCTTATTCGAGTTGTCCACAGTCAG

(配列番号36)。

【0252】

(B.6×His-CypA発現構築物の作製)

発現ベクターpBAD/His(「B」誘導体; Invitrogen)を使用した。このベクターは、5'から3'の方向に作動可能に連結された以下のエレメントを含む: 誘導性であるが、強度に調節可能であるaraBADプロモーター; 最適化されたE.coli翻訳開始シグナル; アミノ末端ポリヒスチジン(6×His)コード配列(「Hisタグ」としても呼ばれる); XPRESS™エピトープコード配列; 所望される場合、タンパク質精製後にN末端の前にあるアミノ酸を除去するために使用され得るエンテロキナーゼ切断部位; 多重クロニング部位; および、インフレームでの終止コドン。

【0253】

プラスミドpBAD/His DNAを、制限エンドヌクレアーゼXhoIおよびAsp718で製造業者の指示書に従って消化することによって調製し、そして垂直アガロースゲル電気泳動、およびUltraClean GelSpinキット(Mo Bio Laboratories)を使用するバンド抽出に供した。制限酵素消化したCypA cDNAを、製造業者の反応緩衝液を使用するT4 DNAリガーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA)を製造業者の指示書に従って使用して、制限(消化)した発現ベクターDNAと連結した。コンピテントE.coli細胞(TOP10F'株; Invitrogen)を、製造業者の指示書に従って、原核生物ベクター構築物を含む連結混合物で形質転換した。単一のコロニーを選択しかつ3~5mlのLBブロス中で増殖し、そしてプラスミドDNAを、WIZARD™ Plusシリーズ9600 Miniprep Reagents System(Promega)を使用して細菌培養物から単離した。予想される制限地図(発現ベクターおよびヒトCypAのヌクレオチド配列に基づく(図7を参照のこと))(

配列番号26))を有する6×His-huCypA発現構築物の単離物を、さらなる実験のために選択し、そして「pMK9-6×His-huCypA」と名付けた。

【0254】

(実施例8：細菌におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ-シクロフィリンA (GST-CypA) 融合タンパク質のクローニングおよび発現)

(A.CypA cDNAのPCR増幅)

サーマルサイクラーにて、CypA cDNAを、以下のプライマー、AMPLITAQ™ DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer)、ならびにGENEAMP™ PCR試薬キット(Perkin Elmer)中に供給される試薬および緩衝液を製造業者の指示書に従って使用して、pMK9-6His-huCypAよりPCRによって増幅した。以下に示されるPCRプライマーにおいて、下線を付したヌクレオチドは、CypA cDNAの5'末端および3'末端に相補的な配列を示し、二重下線を付したヌクレオチドは、制限酵素XhoI(認識配列：5'-CTCGAG)およびBamHI(認識配列：5'-GGATCC)についての認識配列を示し、そしてhuCypA開始コドン(ATG)および終止コドン(TAA)の逆相補を太字にした。

【0255】

huCypAについて、以下のプライマーを使用した：

順方向(センス)：

【0256】

【化19】

5'-TTAAGGATCCATGGTCAACCCACCGTGTTC

(配列番号37)、および

逆方向(アンチセンス)

【0257】

【化20】

5'-ATATCTCGAGTTATTCGAGTTGTCACAGTCAG'

(配列番号38)。

【0258】

(B. GST - CypA発現構築物の作製)

CypA PCR産物を、制限エンドヌクレアーゼXhoIおよびBamHI (両酵素ともRoche Molecular Biochemicals)で製造業者の供給する反応緩衝液を使用して製造業者の指示書に従って消化した。制限(消化)したDNAを、垂直アガロースゲル電気泳動、およびUltraClean™ GelSpinキット(Mo Bio Laboratories, Inc.)を使用するバンド抽出によって精製した。

【0259】

発現ベクターpGEX-4T-2(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、酵素的ポリペプチドおよびCypDポリペプチドを含むhuCypD融合タンパク質を作製した。このベクターは、Schistosoma japonicum由来のグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子(Smithら、1988、Gene 67:31-40)に作動可能に連結されたlacI^q(レプレッサー)遺伝子、tacプロモーター、多重クローニング部位からすぐ5'側のトロンピン切断部位コードヌクレオチド配列を含むように改変されたコード配列を含む。GST融合タンパク質を、抗GSTでのウエスタンブロットまたは比色アッセイを使用することによって検出し得る。後者のアッセイは、グルタチオンおよびGSTについての基質として1-クロロ-2-4-ジニトロベンゼン(CDNB)を利用し、そして340nmで検出可能な黄色の産物を得る(Habigら、1974、J. Biol. Chem., 249:7130-7139)。この発現ベクター由来の発現構築物から産生されたGST融合タンパク質を、例えば、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィーによって精製し得、そして所望のポリペプチドをトロンピンによって融合産物から放出し得る。従って、この発現ベクターは、融合タンパク質の迅

速な精製を提供し、そして比較的少ない余分なN末端アミノ酸を有するタンパク質を放出するが、生じた組換え的に産生されたタンパク質は、2つのさらなるアミノ酸(Gly-Ser)をアミノ末端に含む。tacプロモーターは、例えば、1~5mMイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG; Fluka, Milwaukee, WI)の培養される細胞への添加によって誘導され得、そして高レベルの発現を提供する。

【0260】

プラスミドpGEX-4T-2を、制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびXhoIで製造業者の指示書に従って消化することによって調製し、そして垂直アガロースゲル電気泳動、およびUltraClean™ Gel Spinキット(Mo Bio Laboratories)を使用するバンド抽出に供した。制限酵素消化したANT cDNAを、前述の実施例に記載したように制限(消化)した発現ベクターDNAと連結した。コンピテントE.coli細胞(TOP10F'株: Invitrogen)を製造業者の指示書に従って、原核生物ベクター構築物を含む連結混合物で形質転換した。単一のコロニーを、50ug/mlのアンプシリンを含有する3~5mlのLBブロス中での増殖について選択し、そしてプラスミドDNAを、WIZARD™ Plusシリーズ9600 Miniprep Reagents System(Promega)を使用して細菌培養物から単離し、そして制限地図を作製した。予想される制限地図(発現ベクターおよびヒトCypAのヌクレオチド配列に基づく)を有するGST-huCypA発現構築物の単離物を、さらなる実験のために選択し、そして「pMK10-GST-huCypA」と名付けた。

【0261】

(実施例9: 細菌におけるHisタグ化シクロフィリンD(His6x-CypD)融合タンパク質のクローニングおよび発現)

(A.CypD cDNAのPCR増幅)

ヒト心臓より調製した総細胞性RNAより調製したcDNAライブラリーを、商業的供給元(Clontech, Palo Alto CA)より得た。サーマルサイクラーにて、CypD cDNAを、以下のプライマー、AMPLIT

AQ™ DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer)、ならびにGENEAMP™ PCR試薬キット (Perkin Elmer) 中に供給される試薬および緩衝液を製造業者の指示書に従って使用して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によってcDNAライブラリーより増幅した。以下に示されるPCRプライマーにおいて、下線を付したヌクレオチドは、CypD cDNAの5'末端および3'末端に相補的な配列を示し、二重下線を付したヌクレオチドは、制限酵素XhoI (認識配列: 5' - CTCGAG) およびAsp718 (認識配列: 5' - GGTAAC) についての認識配列を示し、そしてhuCypD開始コドン (ATG) および終止コドン (TAA) の逆相補を太字にした。

【0262】

ヒトCypD (huCypD; 配列番号39) について、以下のヌクレオチド配列を有するプライマーを使用した:

順方向 (センス):

【0263】

【化21】

5'-ATTAATCTCGAGTATGCTGGCGCTGCGCTGC

(配列番号41)、および

逆方向 (アンチセンス)

【0264】

【化22】

5'-TATTAAGGTACCTTAGCTCAACTGGCCACAGT

(配列番号42)。

【0265】

(B.6xHis-CypD発現構築物の作製)

発現ベクターpBAD/His (「B」誘導体; Invitrogen) を使

用した。このベクターは、5'から3'の方向に作動可能に連結された以下のエレメントを含む：誘導性であるが、強度に調節可能である *araBAD* プロモーター；最適化された *E. coli* 翻訳開始シグナル；アミノ末端ポリヒスチジン（6×His）コード配列（「Hisタグ」としても呼ばれる）；XPRESS™ エピトープコード配列；所望される場合、タンパク質精製後にN末端の前にあるアミノ酸を除去するために使用され得るエンテロキナーゼ切断部位；多重クロニング部位；および、インフレームでの終止コドン。

【0266】

プラスミド *pBAD/His* DNAを、制限エンドヌクレアーゼ *XhoI* および *Asp718* で製造業者の指示書に従って消化することによって調製し、そして垂直アガロースゲル電気泳動、および *UltraClean Gel Spin* キット (*Mobio Laboratories*) を使用するバンド抽出に供した。制限酵素消化した *CypD* cDNAを、製造業者の反応緩衝液を使用する *T4* DNAリガーゼ (*New England Biolabs, Beverly, MA*) を製造業者の指示書に従って、制限（消化）した発現ベクターDNAと連結した。コンピテント *E. coli* 細胞 (*TOP10F'* 株: *Invitrogen*) を製造業者の指示書に従って使用して、原核生物ベクター構築物を含む連結混合物で形質転換した。単一のコロニーを選択しかつ3~5mlのLBブロス中で増殖し、そしてプラスミドDNAを、*WIZARD™ Plus* シリーズ9600 *Miniprep Reagents System* (*Promega*) を使用して細菌培養物から単離した。予想される制限地図（発現ベクターおよびヒト *CypD* のヌクレオチド配列に基づく（配列番号39））を有する6×His-hu *CypD* 発現構築物ベクターの単離物を、さらなる実験のために選択し、そして「*pMK11-6×His-huCypD*」と名付けた。

【0267】

（実施例10：細菌におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ-シクロフィリンD (*GST-CypD*) 融合タンパク質のクローニングおよび発現)

（*A. CypD* cDNAのPCR増幅）

サーマルサイクラーにて、*CypD* cDNAを、以下のプライマー、AMP

LI TAQ™ DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer)、ならびにG
ENEAMP™ PCR試薬キット(Perkin Elmer)中に供給され
る試薬および緩衝液を製造業者の指示書に従って使用して、総細胞性mRNA(Clontech, Palo Alto CA)よりPCRによって調製したc
DNAライブラリーより増幅した。以下に示されるPCRプライマーにおいて、
下線を付したヌクレオチドは、CypD cDNAの5'末端および3'末端に
相補的な配列を示し、二重下線を付したヌクレオチドは、制限酵素XhoI(認
識配列:5'-CTCGAG)およびBamHI(認識配列:5'-GGATCC
C)についての認識配列を示し、そしてhuCypD開始コドン(ATG)およ
び終止コドン(TAA)の逆相補を太字にした。

【0268】

huCypDについて、以下のヌクレオチド配列を有するプライマーを使用し
た:

順方向(センス):

【0269】

【化23】

5'-TTATGGATCCATGCTGGCGCTGCGCTGC

(配列番号43)、および

逆方向(アンチセンス)

【0270】

【化24】

5'-TAATCTCGAGTTAGCTCAACTGGCCACAGT

(配列番号44)。

【0271】

(B.GST-CypD発現構築物の作製)

CypD PCR産物を、制限エンドヌクレアーゼXhoIおよびBamHI (両酵素ともRoche Molecular Biochemicalsより) で製造業者の供給する反応緩衝液を使用して製造業者の指示書に従って消化した。制限(消化)したDNAを、垂直アガロースゲル電気泳動、およびUltraClean™ GelSpinキット(Mo Bio Laboratories, Inc)を使用するバンド抽出によって精製した。

【0272】

発現ベクターpGEX-4T-2(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、酵素的ポリペプチドおよびCypDポリペプチドを含むhuCypD融合タンパク質を作製した。このベクターは、Schistosoma japonicum由来のグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子(Smithら、1988、Gene 67:31-40)に作動可能に連結されたlacI^q(レプレッサー)遺伝子、tacプロモーター、多重クローニング部位からすぐ5'側のトロンビン切断部位コードヌクレオチド配列を含むように改変されたコード配列を含む。GST融合タンパク質を、抗GSTでのウエスタンブロットまたは比色アッセイを使用することによって検出し得る。後者のアッセイは、グルタチオンおよびGSTについての基質として1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)を利用し、そして340nmで検出可能な黄色の産物を得る(Habigら、1974、J. Biol. Chem., 249:7130-7139)。この発現ベクター由来の発現構築物から産生されたGST融合タンパク質を、例えば、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィーによって精製し得、そして所望のポリペプチドをトロンビンによって融合産物から放出し得る。従って、この発現ベクターは、融合タンパク質の迅速な精製を提供し、そして比較的少ない余分なN末端アミノ酸を有するタンパク質を放出するが、生じた組換え的に産生されたタンパク質は、2つのさらなるアミノ酸(Gly-Ser)をアミノ末端に含む。tacプロモーターは、例えば、1~5mMイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG; Fluka, Milwaukee, WI)の培養される細胞への添加によって誘導され得、そして高レベルの発現を提供する。

【0273】

プラスミドpGEX-4T-2を、制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびXhoIで製造業者の指示書に従って消化することによって調製し、そして垂直アガロースゲル電気泳動、およびUltraClean™ Gel Spinキット(Mo Bio Laboratories)を使用するバンド抽出に供した。制限酵素消化したANT cDNAを、前述の実施例に記載したように制限(消化)した発現ベクターDNAと連結した。コンピテントE. coli細胞(TOP10F'株: Invitrogen)を製造業者の指示書に従って、原核生物ベクター構築物を含む連結混合物で形質転換した。単一のコロニーを、50 µg/mlのアンプシリンを含有する3~5mlのLBブロス中での増殖について選択し、そしてプラスミドDNAを、WIZARD™ Plusシリーズ9600 Miniprep Reagents System(Promega)を使用して細菌培養物から単離し、そして制限地図を作製した。予想される制限地図(発現ベクターおよびヒトCypDのヌクレオチド配列に基づく)を有するGST-huCypD発現構築物の単離物を、さらなる実験のために選択し、そして「pMK12-GST-huCypD」と名付けた。

【0274】

(実施例11: シクロフィリンD-グリーン蛍光タンパク質(CypD-GFP)融合タンパク質のクローニングおよび発現)

(A. CypD cDNAのPCR増幅)

CypD cDNAを、以下のプライマー、AMPLITAQ™ DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer)、およびGENEAMP™ PCR Reagent Kit(Perkin-Elmer)に提供される試薬および緩衝液を製造業者の指導書に従って使用して、サーマルサイクラーでのPCRによって、ヒト心臓より調製した総細胞性mRNAより調製したcDNAライブラリー(Clontech, Palo Alto, CA)から増幅した。以下に示すPCRプライマーにおいて、下線を付したヌクレオチドは、cypDのリーディングフレームに相補的な配列を示し、二重下線を付したヌクレオチドは、制限酵素XhoI(認識配列: 5' - CTCGAG)およびBamHI(認識配列: 5

' - G G A T C C) についての認識配列を示し、そして h u C y p D 開始コドン (A T G) は太字で示す。

【0275】

以下のヌクレオチド配列を有するプライマーを使用した：

順方向（センス）：

【0276】

【化25】

5'-GGGCCCCCTCGAGCCCGCGATGCTGGCGCTGCGCTGC

(配列番号45)、および

【0277】

【化26】

5'-CCCGGTGGATCCGC-GCT-CAA-CTG-GCC-ACA-GTC

(配列番号46)

直前に記したプライマーにおける B a m H I 部位は、増幅産物が c y p D についての正常な終止コドンを欠き、そして c y p D リーディングフレーム（コドンの間でハイホンを付されることによって上述の表示において示した）が p E C F P - N 1（先述）中の増強されたシアン蛍光タンパク質（E C F P）DNA と融合されるように位置される。

【0278】

(B . C y p D - E C F P 発現構築物の作製)

発現ベクター p E C F P - N 1 (C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s , I n c .) を、 B a m H I および X h o I で制限酵素消化した。先述の制限フラグメントから形成される所望の連結産物において、 p E C F P - N 1 中の B a m H I 部位を、 A N T 3 コードフラグメント中の B a m H I 部位と連結し、そして C y p D コードフラグメント中の X h o I 部位を、 p E C F P - N 1 中の X

h o I 部位と連結して、そして生じたプラスミドは、C y p D - C F P 融合タンパク質をコードする。用語「C y p D - E C F P 融合タンパク質」は、以下を有する単一の連続するポリメラーゼ鎖を示す：(1) ヒト C y p D に対応する、アミノ末端ポリペプチド部分、および(2) 増強されたシアン蛍光タンパク質(E C F P) に対応する、カルボキシ末端ポリペプチド部分(4 3 3 nm での最大励起(4 5 3 nm での副次的なピーク) および 4 7 5 nm での放射ピーク(5 0 1 nm での副次的なピーク)) 。

【0279】

制限酵素消化したDNAを、当該分野において公知の標準的条件下でT4 DNAリガーゼを使用して互いに連結した。コンピテントE. coli細胞(DH5株; Life Technologies, Inc.)を、製造業者の手引書に従って連結混合物で形質転換した。単一のコロニーを選択しかつ3~5mlのLBブロスにて増殖し、そしてプラスミドDNAを、WIZARD™ Plus Series 9600 Miniprep Reagents System(Promega)を使用して細菌培養物から単離し、そして制限地図を作製した。予想された制限地図(発現ベクターおよびヒトC y p Dのヌクレオチド配列に基づいた)を有するh u C y p D - E C F P 発現構築物の1つの単離物を、さらなる実験のために選択し、そして「pMK13 - h u C y p D - E C F P」と名付けた。

【0280】

(C . C y p D - E C F P 融合タンパク質の発現および細胞内局在)

直前の項に記載されたC y p D - E C F P 融合タンパク質の発現および細胞内局在を、蛍光顕微鏡によって試験した。COS-1細胞または293細胞を、コンフルエントにまで増殖し、そして細胞の1mlを、1mlの低血清培地のOpti-MEM™ I(Life Technologies, Inc.)、0.2、1.0、または2.0 μgのDNA(pECFP-N1、pMK13-C y p D - C F P、またはベクターなしのコントロール)を含む溶液、および3~4 μlのLipofectAMINE™(Life Technologies, Inc.)と混合した。5時間のインキュベート後、20%の胎児ウシ血清を含

む1mlの培地を添加し、そしてインキュベートの総時間が約48時間になるように、細胞を、さらなる期間にわたって24時間ごとに培地を交換してインキュベートした。

【0281】

次いで、形質転換したCOS-1細胞および293細胞を、GFPフィルター(励起側(excitor)、 450 ± 25 nm; 二色性(dichroic)、480 nm; エミッター、485 nm、長経路; Nikon, Inc., Melville, NY)を使用する蛍光顕微鏡によって試験した。0.2または1.0 μ gのpMK13-CtpD-ECFP DNAで形質転換した細胞は、CypD-ECFP融合タンパク質のミトコンドリア送達を示す斑点の蛍光を示した。より高い量(2.0 μ g)のpMK13-CtpD-ECFP DNAで形質転換した細胞は、いくらか低いレベルの細胞質の蛍光を有したが、ほとんどの細胞が斑点の蛍光を示した。COS-1細胞は、一般に293細胞より高程度の蛍光を発し、このことはおそらく、高程度の形質転換および/または発現を示す。発現ベクターpECFP-N1で形質転換した細胞は、低レベルの細胞質の蛍光のみを示し、そしてコントロール(mock形質転換)細胞は、検出可能な蛍光を示さなかった。蛍光顕微鏡の結果は、CypD-ECFP融合タンパク質がもっぱらミトコンドリアに局在することを示す。

【0282】

(実施例12: Hisタグ化ヒトCypDタンパク質の精製)

前出の実施例に記載されるシクロフィリン発現構築物を使用して、以下の実施例に記載されるアッセイにおけるリガンドとして使用されるシクロフィリンタンパク質および融合タンパク質を産生し得た。

【0283】

例えば、実施例9に記載される(6xHis)-(XPRESS™エピトープ)-(ヒトシクロフィリンD)についての発現構築物を使用して、Hisタグ化CypD融合タンパク質を産生した。pMK11-6xHis-huCypDを保有するE.coli(DH5株)細胞を、アンピシリン(00 μ g/ml)を含むTB培地またはLB培地にて37℃で攪拌しながら一晩培養した。一晩の

培養物を、新鮮培地で $OD_{600} = 0.1$ まで希釈し、次いで、約2時間攪拌しながら37℃でインキュベートした(すなわち、 OD_{600} が約0.5になるまで)。発現を誘導するために、L-アラビノースを貯蔵20%溶液から最終濃度0.01%にまで添加した。次いで、Hisタグ化CypD融合タンパク質の最大産生を可能にするために、培養物を、約4時間より長くなる前までインキュベートした。

【0284】

細菌細胞を、遠心分離によって回収した(乾燥ペレットを凍結し得、そして所望の場合、この時点で、-80℃で貯蔵し得る)。ペレットを、イミダゾール(3mM)および効果的なレベル(典型的には $10\mu\text{g}/\text{ml}$)で存在するプロテアーゼインヒビター(ペプスタチン、ロイペプチン、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)および/またはアプロチニン(全てSigmaから))を含む適切な容量のPBSに再懸濁した。再懸濁した細胞を、20秒間超音波処理し、そして溶解物を $14,000\times g$ で4℃にて20分間遠心分離することによって清澄化した。

【0285】

次いで、清澄化した溶解物質を使用して、当業者に公知の種々の方法でHisタグ化huCypDを調製した。典型的には、溶解物を、Nickelビーズ(アガロースまたは磁気性であるが、アガロースNickelビーズはタンパク質のよりよい特異的収量を提供するようである)に添加した。約 $50\mu\text{l}$ のNickelアガロースビーズ(Qiagen)を、 $500\mu\text{l}$ の溶解物に添加して、そして2~48時間、4℃で攪拌しながらインキュベートした。ビーズを簡単に洗浄して、そしてHisタグ化huCypDをイミダゾール(50~500mM、好ましくは250mM、約4~約6のpH)またはEDTA(10~500mM、好ましくは100mM、約4~約8のpH)で処理することによってそこから放出した;記載した実験においては100mMのEDTAを使用した。

【0286】

(6xHis)-(XPRESS™エピトープ)-(ヒトシクロフィリンD)融合タンパク質は、可溶性であり、そして以下の実施例に記載されるアッセイに

直接使用され得る。しかし、所望される場合、pMK11-6xHis-huCy pDから発現した組換えhuCy pDタンパク質をエンテロキナーゼで処理して、His-Tag/XPRESS™エピトープポリペプチドをhuCy pDタンパク質から遊離し得る。このことを、(6xHis)-(XPRESS™エピトープ)-(ヒトシクロフィリンD)融合タンパク質がNickelビーズに結合した後に実施し得る。この場合、His-Tag/XPRESS™エピトープポリペプチドは、Nickelビーズ上に残り、そしてhuCy pDタンパク質を、単にビーズを抽出しそして抽出物質を回収することにより調製し得る。

【0287】

シクロフィリンA、またはCypA融合タンパク質を、(6xHis)-(XPRESS™エピトープ)-(ヒトシクロフィリンA)についての発現構築物であるpMK9-6xHis-huCypA(実施例7)を保有する細胞を使用する同様の様式において調製する。ANT-GFP融合タンパク質、CypA-GFP融合タンパク質およびCypD-GFP融合タンパク質(それぞれ、実施例、および)を、精製の簡便化のためのHisタグまたはGSTポリペプチドをさらに含むように操作し得るか、または適切な発現構築物を保有する細菌細胞より精製し得る(このようなプロトコールの1つについて、GonzalezおよびWard, Protocol I.E, 「Purification of GFP」: Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols, Chalfie, M. およびKain, S. 編、John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998, 289-294頁)を参照のこと。

【0288】

(実施例13: 他のミトコンドリア因子由来の融合タンパク質についての発現構築物の調製)

本明細書の技術を使用して、当業者は、他のミトコンドリア因子の融合タンパク質誘導体を調製し得る。このミトコンドリア因子は、ミトコンドリア透過性移動(MPT)細孔の一部であると考えられるかまたは推測されるタンパク質、お

よびMPT細孔の1以上の成分と相互作用すると考えられるかまたは推測される他のタンパク質を含む。このような融合タンパク質は、Hisタグ化タンパク質、エピトープタグ化タンパク質、GST融合タンパク質およびGFP融合タンパク質を含み得、これらは、例示の目的であって限定の目的ではない。

【0289】

表1は、以下を列挙する：(1)ミトコンドリア透過性移動(MPT)細孔の一部であると考えられるかまたは推測されるミトコンドリア因子、および(2)MPT細孔の1以上の成分と相互作用すると考えられるかまたは推測される他のタンパク質。表1はさらに、これらのミトコンドリア因子をコードする遺伝子についての利用可能なヌクレオチド配列情報を記載し、これらから、当業者は、オリゴヌクレオチドプライマーを設計してDNAフラグメントを増幅するようにPCR反応において使用し得、このDNAフラグメントは、(a)表1に記載される因子の1つについてのタンパク質コード配列、および(b)所望の発現ベクターにクローニングするために適した、増幅したDNAの末端での制限酵素部位、を有する。

【0290】

(表1：ミトコンドリア細孔成分および配列)

【0291】

【表1】

ミトコンドリアの細孔成分		ヌクレオチド配列情報の供給源
省語	グループ / 供給源	
ANT	アデニンヌクレオチド輸送体	
ANT-1	<i>Homo sapiens</i>	SEQ ID NO:1
ANT-2	<i>H. sapiens</i>	SEQ ID NO:2: GenBank ^{アデニン} 番号 AA874983
ANT-3	<i>H. sapiens</i>	SEQ ID NO:3
ANT-4	<i>H. sapiens</i>	WO 99 / 07845 (SEQ ID NOS:1, 3)
ANT	<i>Solanum tuberosum</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 X62123
ANT	<i>Plasmodium falciparum</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 U04335
PBzR	末梢性ベンジアゼピンスレター	
PBzR	<i>H. sapiens</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 Z82214, L21951, M36035
PBzR 関連配列	<i>H. sapiens</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 L21950, AA490268
PRAX	PBzR 関連サブドメイン	
PRAX-1	<i>H. sapiens</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 A1668824, NM_004758, AF039571
Pap20	マウス 筋肉	GenBank ^{アデニン} 番号 AF020338
VDAC	電位依存性アポトキヤチル	
VDAC-1	<i>H. sapiens</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 NM_003374, L06132
VDAC-2	<i>H. sapiens</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 NM_003375, L06328
VDAC-3	<i>H. sapiens</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 NM_005662, S75494;
VDAC-4	<i>H. sapiens</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 S75651
HACH (ヒ アポトキヤチル)	<i>H. sapiens</i>	米国特許 5,780,235 (SEQ ID NO:2)
VDAC-1	<i>M. musculus</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 U89987
VDAC-2	<i>M. musculus</i>	GenBank ^{アデニン} 番号 U89988

(表1続き)

ミトコンドリアの細孔成分		ヌクレオチド配列情報の供給源
省語	フルネーム / 供給源	
VDAC-3	<i>M. musculus</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 U89989
VDAC	<i>Drosophila melanogaster</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 U70314
VDAC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 M34907
VDAC-1a	<i>Zea mays</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 AF178950
VDAC-1b	<i>Z. mays</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 AF178951
VDAC-2	<i>Z. mays</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 AF178952
Cyp	シクロフィリン	
CypA	<i>H. sapiens</i>	SEQ ID NO:26
CypC	<i>H. sapiens</i>	米国特許 5,447,852 (SEQ ID NO:4)
CypD	<i>H. sapiens</i>	SEQ ID NO:39; GenBank ^{AF178952} 番号 NM_005038
Cyp-60	<i>H. sapiens</i>	米国特許 5,968,802 (SEQ ID NO:3)
CypA	<i>Schistosoma mansoni</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 U50388
CypB	<i>Schistosoma japonicum</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 U50389
CypB	<i>Orpinomyces sp. PC-2</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 U17900
シクロフィリン	<i>M. musculus</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 A1892042, A1875905
CAML	カルシウム調節シクロフィリンリガンド	
CAML	<i>H. sapiens</i>	米国特許 5,523,227 (SEQ ID NO:1)
CAML	<i>M. musculus</i>	GenBank ^{AF178952} 番号 AA955975

(実施例14)

(抗体)

本発明の方法のアッセイに有用な抗体は、公知の方法と組み合わせて本開示の教示を使用して、当業者によって調製され得る。ヒトANT3に対する抗体の調製を、本実施例に記載し、同様に、いくつかの有用な市販の補足的な抗体も記載する。

【0292】

(A. ヒトANT3に対して特異的な抗体の調製)

huANT3に特異的な一重特異的(抗ペプチド)抗体を、以下のように調製した。カルボキシ末端付近に位置し、Jameson-Wolf指数(Wolfら、Comput. Appl. Biosci. 4:187-191(1988))に従って高い抗原性を有することが推定されるhuANT3の部分に対応する合成ペプチドを、Alpha Diagnostic International(San Antonio, TX)による公知の手段を用いて合成し、そしてHPLC分析およびMS分析によって、少なくとも約70%純粋、好ましくは少なくとも約90%純粋であると決定した。合成ポリペプチドの配列(配列番号30)は:

Cys - Trp - Arg - Lys - Ile - Phe - Arg - Asp -
Glu - Gly - Gly - Lys - Ala - Phe - Phe
である。

【0293】

合成ポリペプチドを、キャリア分子であるキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に、MSB(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル; Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois)を用いて結合体化し、そしてこの結合体化物質を使用して、公知の手段(CollawnおよびPaterson, 第11章のユニット11.14および11.15: Short Protocols in Molecular Biology, 第2版、Asubelら、編、John Wiley & Sons, New York, New York(1992)11:37-41)に従って数匹のウサギを免疫した。このウサギを、接種後の0週(免疫前、2mL)、7週、9週、11週、13週(各採血について15mL)または15週(50mL)に採血した。アジ化ナトリウム(0.1%)を、保存剤としてこれらの採血に添加した。

【0294】

(B. 有用な市販の一次抗体)

GST融合タンパク質を検出するため、またはGST融合タンパク質を固体支持体に連結させるために有用な、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GS

T)に対する抗体は、記載され、そして市販される(BD Pharmingen, San Diego, CA; Clontech, Palo Alto, CA; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; およびOxis International, Inc., Portland, OR)。

【0295】

Hisタグ融合タンパク質を検出するため、またはHisタグ融合タンパク質を固体支持体に連結させるために有用な、アミノ末端またはカルボキシ末端の6×Hisタグに対する抗体は、記載され、そして市販される(Invitrogen, Carlsbad, CA; Clontech; およびBerkley Antibody Co., Richmond, CA)。各検出に関して、抗(Hisタグ)は、検出可能な物質および/または生成物が利用可能である種々の酵素のうちの1つ(西洋ワサビペルオキシダーゼ(Clontech)を含む)に連結された結合体として利用可能である。

【0296】

GFP融合タンパク質を検出するため、またはGFP融合タンパク質を固体支持体に連結させるために有用な、グリーン蛍光タンパク質(GFP)に対する抗体は、記載され、そして市販される(Clontech; Berkley Antibody Co.; Torrey Pines Biolabs, San Diego, CA; Aurora Biosciences Corp., San Diego, CA)。検出の容易さのために、抗GFPは、検出可能な物質および/または生成物が利用可能である種々の酵素のうちの1つ(西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼ(両方ともClontechから)を含む)に連結された結合体として利用可能である。

【0297】

XPRESS™エピトープを含む融合タンパク質を検出するため、またはXPRESS™エピトープを含む融合タンパク質を固体支持体に連結させるために有用なXPRESS™エピトープに対する抗体は、記載され、そして市販される(

In vitro)。

【0298】

(実施例15)

(huANT3 - huCypD相互作用のアッセイ)

前出の実施例に記載される試薬を、ミトコンドリア透過性変化細孔(MPT)の成分間の相互作用を測定するために設計された種々のアッセイに使用し得る。本実施例は、ミトコンドリアアデニンヌクレオチドトランスロケーターのアイソフォーム(huANT3)とシクロフィリンD(huCypD)との間の相互作用を測定するために設計されたイムノアッセイを記載する。

【0299】

(A. ニッケルビーズ: HIS - タグhuANT3複合体の調製)

未感染のT.ni細胞またはHis - タグ - huANT3を発現するバキュロウイルスで感染されたT.ni細胞(実施例3を参照のこと)由来のペレットにするミトコンドリアを、以下のように調製した。T.ni細胞を、1チューブあたり約250mgの細胞の部分としてサブコントラクター(PharMingen, San Diego, CA)によって調製した。各部分を、プロテアーゼインヒビター(ロイペプチン、終濃度10µg/ml; ペプスタチン、終濃度10µg/ml; アプロチニン、終濃度2µg/ml; フェニルメチルスルホニルフルオライド{PMSF}、終濃度100µM; 全てSigma Chemical Co., St. Louis, MOより)を有する1mlのMSB中に再懸濁した。再懸濁した細胞懸濁物を、2回凍結融解し、次いで、回転するテフロン(登録商標)コートされたプローブおよび近接して適合したガラス容器を用いてホモジナイズした(10回のパス)。細胞ホモジェネートを4で5分間遠心分離し(3,700rpm、約1,500×g); この最初の回転からの上清を取った。このペレットを、プロテアーゼインヒビターを有する約500µlのMSBを用いて洗浄し、4で5分間(3,800rpm、約1,600×g)遠心分離し、そしてこの回転からの上清を、最初の回転からの上清と合わせた。この合わせた上清を4で15分間(14,000rpm、約20,800×g)遠心分離し、そしてペレットを、300µlの、(a)20mM MOPSおよび(

b) MSBの1:1の溶液中に再懸濁し、ここで、(a)および(b)の両方は、前記のプロテアーゼインヒビターを含む。生じる懸濁液を3回凍結融解した。

【0300】

100 μ lのT.niミトコンドリア(9.83 μ g/ml)を氷上でゆっくりと融解し、次いで、4 で15分間遠心分離して、ミトコンドリアをペレットにした。このペレットを、1mM 2-メルカプトエタノールであるように新しく作製された100 μ lの可溶化緩衝液(20mM KH_2PO_4 、0.3M NaCl、20 μ M イミダゾール、10mM HEPES、pH7.2、3% Triton X-100)中で可溶化し、そしてこの緩衝液には、周囲温度で2分間かまたは4 で3分間、以下のプロテアーゼインヒビターが効果的なレベルで(代表的に10 μ g/ml)新しく添加されていた:ペプスタチン、ロイペプチン、フェニルメチルスルホニルフルオリドおよびアプロチニン(全てSigmaより)。次いで、この溶液を、希釈緩衝液(20mM KH_2PO_4 、20mM イミダゾール、50mM NaCl、0.5% Triton X-100、pH7.2)を用いて300 μ lの最終溶液に希釈した。

【0301】

(B.huANT3:huCypD相互作用のアッセイ)

60 μ lのT.niミトコンドリアのアリコート、洗浄緩衝液(20mM KH_2PO_4 、20mM イミダゾール、50mM NaCl、1.3% Triton X-100、pH7.2)で1回、前洗浄されたニッケルプレート化アガロースビーズ(Qiagen)の75 μ lのアリコートのスラリーに添加した。このビーズを、適切な期間(代表的に、約5~15分間であるが、インキュベーションは、結局可視の変化を伴わずに、2~30分間進行され得る)、周囲温度で、連続した混合を提供するために回転試験管スタンドにおいてインキュベートする。いくつかのサンプルにおいて、GST-CypD融合タンパク質(実施例10)を、huANT3に対するリガンドとして添加した(1チューブあたり12 μ g);これらのいくつかのサンプルにおいて、CypDの作用を特異的に阻害するシクロスポリンA(終濃度、10 μ M;エタノール中の2 μ Mストック溶液より)をまた、添加した。

【0302】

このインキュベーション中に形成された複合体を、以下のように図解し得る（ここで、「-」は、化学結合を示し、そして「:」は、2分子間の相互作用を示す）

(ビーズ) - ニッケル : 6 × His - ANT3 : CypD - GST。

【0303】

インキュベーションを、過剰(1ml)の冷(すなわち、氷上で保存)洗浄緩衝液を添加することによって停止した。このビーズを、30秒間、低速度の遠心分離によってペレットにし、1mlの冷洗浄緩衝液で1回洗浄し、そして多数の方法によって即座に抽出した。総結合リガンド(GST-CypD)を決定するために、80µlの1×NuPAGE SDSサンプル緩衝液(Novex, San Diego, CA)をビーズに添加し、これを次いで、約5~10分間、沸騰水浴中においた。ANTに対するリガンド(GST-CypD)結合の量を決定するために、60µlの溶出緩衝液(50~500mM、好ましくは、250mMのイミダゾール、pHは、約4~約6;または10~500mM、好ましくは100mMのEDTA、pHは、約4~約8;記載される実験においては、100mM EDTAを使用した)を、第2セットの別の方法で同一に処理したビーズに添加した。EDTAは、His-タグANT3のHis-タグ(6×His)部分が結合するニッケルイオンをキレートするので、後者の実体は、EDTAの添加によってニッケルビーズから置換される。His-タグANT3タンパク質がニッケルビーズから溶出される場合、ANT3ポリペプチドに特異的に結合するGST-CypDタンパク質がまた、溶出される。理論に束縛されることを望まないが、これは、(1)GST-CypD融合タンパク質CypD部分がANTポリペプチド配列に結合したままであり、そしてHis-タグANT3タンパク質と一緒に運ばれること、または(2)全ANT3:CypD複合体の不安定化および分離を引き起こすニッケルビーズからのHis-タグANTタンパク質の置換、あるいはこれらの機構および/または他の機構のいくつかの組み合わせに起因して生じると考えられる。

【0304】

抽出物を、ウエスタンブロット分析によって評価した。簡単に言うと、ローディング色素を、必要である場合この抽出物に添加し、このサンプルを、約5～10分間、沸騰水中に配置し、次いで、成形済みのポリアクリルアミドゲル(Novex)上で電気泳動し、そしてニトロセルロースフィルターに電氣的にブロットした。CypD-GST融合タンパク質のGST部分に特異的な抗体を、フィルターをプローブする際の一次抗体として使用し、そして結果として、内因性シクロフィリンDタンパク質は、このアッセイにおいて示されない。このフィルターを、まず1:10,000希釈されたマウス抗GST(BD Pharmingen)を用いて60分間インキュベートし、次いで、1:5,000希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼと結合体化されたヒツジ抗マウスIg抗体(Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL)を用いて約30分間～約60分間インキュベートした(両インキュベーションは、周囲温度で実施した)。西洋ワサビペルオキシダーゼに関してアクリダン(acridan)ベースの物質を用いたインキュベーションによってフィルターを開発し、この生成物は、高レベルの徐放出力の光を放出する(ECL Plus Western blotting detection system, Amersham Pharmacia Biotech)。このフィルターを、適切な曝露時間、フィルムに曝露し(代表的に1～2分間)、次いで、分離し、ヒトANT3に特異的な抗体を用いて再プローブした(実施例14)。

【0305】

代表的な実験の結果を、図9に示す。最も右において、0.5 μgの精製CypD-GST融合タンパク質を、抗GSTとのその反応を介して明らかにする。EDTA溶出によって明らかにされたタンパク質を、レーン1'～5'に可視化する。レーン1'において、非HisタグHuANT3がサンプル中に存在し、そしてニッケルコートされたアガロースビーズへのCypD-GST結合はわずかな量のみ非特異的様式で存在した。レーン2'および3'において、HisタグHuANT3は、サンプル中に存在し、そして保持されたCypD-GSTの量は、おおよそ10倍までの範囲で可視的に増加する。

【0306】

通常の成分に加えて、レーン3'中のサンプル(ならびにレーン3中のサンプル)を、シクロスポリンA(Sigma)(これは、エタノールベースの保存溶液として調製される)が添加されるサンプルに対するコントロールとして0.5%エタノールで作製した。図7のレーン2'および3'を比較することによって見出され得るように、0.5%エタノールの存在は、このアッセイの結果に対して可視的な効果を有さなかった。レーン4'において、CypD-GST融合タンパク質を、ニッケルビーズ:His-タグANT3混合物と接触させる前に10 μ MシクロスポリンAを用いてプレインキュベートし;予想したように、シクロスポリンAの存在は、ANT媒介CypD-GST保持を排除した。

【0307】

レーン5'において、ニッケルビーズ:His-タグANT3:CypD-GST複合体を、10 μ MシクロスポリンAの添加前に、実施した。これらの条件下において、添加の順序は、結果に識別可能な影響を有さなかった。ローディングおよび回復が実験を介して初めから終わりのチューブまで一貫していたという事実を、レーン2'、3'、4'および5'中のANT3の一貫した回復によって示す。

【0308】

レーン1~5は、結合タンパク質のEDTA媒介溶出後に結合タンパク質が剥離される(1 \times NUPAGE SDSサンプル緩衝液の添加および沸騰水浴中に10分間配置することによる)レーン1'~5'のサンプルに対応する、EDTA溶出サンプルを示す。図9に見出され得るように、EDTAを用いた溶出後にニッケルコートしたビーズに結合したままである検出可能なCypD-GSTまたはHis-タグANT3はない。

【0309】

これらの結果は、このアッセイが、ヒトCypDおよびANTの公知のパラメーターを反映することを実証する。すなわち、CypD-GST融合タンパク質は、固体支持体上のHis-タグANT3に特異的に結合し、そしてこの結合は、シクロスポリンAによって阻害される。

【0310】

(実施例16)

(ANT3 - CypD相互作用の他のインビトロアッセイ)

本明細書中に記載される試薬および系を、MPT細孔成分と他の各ミトコンドリア因子および/または他のミトコンドリア因子との相互作用の種々のインビトロアッセイにおいて使用し得る。例としてANTおよびCypDを使用して、本実施例は、このような他の用途ならびに本明細書中に開示される組成物および方法の実施形態を記載する。

【0311】

例えば、1つの関連する実施形態において、結合アッセイに添加されるCypDリガンドは、エピトープ - タグCypD融合タンパク質であり、ここで、このエピトープは、例えば、6xHis「タグ」またはXPRESS™エピトープである(実施例9)。この様式において、各サンプルに存在するCypDリガンドの量を、エピトープに特異的に結合する抗体または他の検出可能な試薬を用いて測定する。

【0312】

別の関連する実施形態において、この結合アッセイに添加されるCypDリガンドは、CypD - GFP融合タンパク質である(実施例11)。この様式において、各サンプルに存在するCypDリガンドの量を、蛍光計を用いて測定する。

【0313】

さらに関連する実施形態において、このアッセイに使用されるANT融合タンパク質は、グルタチオンコートされたビーズ(Sigma)に結合されるANT - GST融合タンパク質であり(実施例2)、そしてCypDリガンドは、例えば、エピトープ - タグCypD融合タンパク質(ここで、このエピトープは、6xHis「タグ」もしくはXPRESS™エピトープである)(実施例9)であるか、またはCypD - GFP融合タンパク質である(実施例11)。種々のビーズおよび他の支持体を使用され得るが;このようなアッセイに使用されるCypDリガンドがグルタチオンビーズまたは他の選択支持体に結合しないことを

確実にするための注意がなされなければならない。この様式において、各サンプルに存在するCypDリガンドの量を、エピトープに特異的に結合する抗体または他の検出可能な試薬を用いて、あるいは蛍光計（選択したCypDリガンドに適切であるどちらでも）を用いて測定する。

【0314】

さらなる関連した実施形態において、アッセイにおいて使用されるANT融合タンパク質は、Hisタグまたは他の官能基（例えば、GTSポリペプチド）をさらに含む、ANT-EYFP融合タンパク質（実施例5）であり、これは、支持体（すなわち、Hisタグ化ANT-EYFP融合タンパク質を使用する場合は、Nickelビーズ）へのANT-EYFP融合タンパク質の付着の目的のためのリンカーとして機能し、そしてCypDリガンドは、CypD-ECFP融合タンパク質である（実施例11）。この様式では、ANT-EYFPおよびCypD-ECFP融合タンパク質が密に近位である場合に生じるFRETを測定するために蛍光光度計が使用される（次の実施例を参照のこと）。

【0315】

本発明のアッセイのこれらおよび他の実施形態を、当業者により適応される自動化アッセイシステムへ組み込み得る。このような自動化システムは、CypD：ANT相互作用（またはMPT有孔成分の相互の相互作用および/または他のミトコンドリアの因子との相互作用）に影響する候補化合物、またはそのような化合物を含む化学的ライブラリーの高処理能力スクリーニング（HTS）のために有用である。このような化合物は、1以上のANT、シクロフィリンもしくはシクロスポリンタンパク質の過剰発現もしくは機能不全、または1以上のANT、シクロフィリンもしくはシクロスポリンタンパク質の、正に調節するかもしくは刺激する因子の過剰発現もしくは機能不全から生じる疾患もしくは障害を予防、処置もしくは治療するために有用な薬物候補物および薬物としてさらに特徴付け、そして開発し得る。

【0316】

多くの自動化アッセイシステムの好ましい要素は、96ウェルプレートへの標的分子の組み込みである。このフォーマットは、種々の自動化標識検出システム

における使用のために容易に適用可能である。HTSアッセイについては、ロボット化標識検出システムが好ましい。蛍光CypDリガンドが、このようなHTSアッセイにおいて使用される場合、自動化蛍光計数器が使用され、そして例えば、それはFLUOROCONT™ Counter (Packard Instrument Company, Meriden, CT)であり得る。

【0317】

(実施例17)

(MPT有孔成分とミトコンドリア因子との間の相互作用のFRETベースのアッセイ：全体的な考慮)

前述の実施例は、密に物理的に近位の2つの分子の間の共鳴蛍光エネルギー移動(FRET)に基づくアッセイにおいて使用され得る例示的な試薬の生成およびシステムを記載する。インビトロまたはインビボで行なわれ得るこのようなアッセイ、およびこれらアッセイのための設計的考慮は、本実施例に一般的に記載され、具体的には、引き続き実施例において、ヒトANT3:CypD相互作用について記載される。

【0318】

(A.FRETベースのアッセイの一般的な記載)

一般に、エネルギー移動(ET)は、2つの分子(エネルギー供与性「ドナー」分子およびエネルギー受容性「アクセプター」分子)間の共鳴相互作用から生じる。エネルギー移動は、以下の場合に生じ得る：(1)ドナーの放出スペクトルがアクセプターの吸収スペクトルと重複する場合、および(2)ドナーおよびアクセプターが互いから特定の距離内にある場合(例えば、約10nm未満)。エネルギー移動の効率は、ドナーおよびアクセプターの接近によりほとんど決定され、そして距離の6乗に従って減少する。従って、ETの測定は、アクセプター化合物およびドナー化合物の接近を強く反映し、そしてETにおける変化は、化合物の接近における変化(例えば、ドナーおよびアクセプターの会合または解離)を感受的に反映する。

【0319】

本発明において、ドナー化合物およびアクセプター化合物は、典型的には両方

とも、MPT有孔成分および/またはミトコンドリア因子由来の融合タンパク質である。本発明のアッセイでは、ドナー化合物およびアクセプター化合物（融合タンパク質）は、生じる特定の型のエネルギー移動について、特定の条件下で、互いに十分な接近を達成するような様式で互いに相互作用する。本発明の特定の局面では、このような相互作用は、1以上の化学的因子により影響され（例えば、増強されるか、調節されるか、阻害されるか、またはブロックされる）、モニターされ得るエネルギー移動の増加（増強された相互作用）または減少（減少された相互作用）を生じる。従って、ドナー融合タンパク質とアクセプター融合タンパク質との間のエネルギー移動の程度または速度の測定は、融合タンパク質が由来する2つの内在性（ミトコンドリア性および/または細胞性）タンパク質の間の相互作用についてのアッセイの一部として機能する。

【0320】

本発明では必要としないが、ドナー分子およびアクセプター分子は両方とも、測定の簡易性のために、励起光により励起される場合に光を発光する、光放出分子（例えば蛍光性分子、りん光分子および化学発酵分子）であり得る。本発明に使用され得る好ましいドナー - アクセプターの組み合わせは、蛍光性ドナーとりん光性アクセプターとの組み合わせ、またはりん光性ドナーとりん光性もしくは蛍光性アクセプターとの組み合わせである。「蛍光（性）」とは、通常異なる波長で、1つの波長（「励起」）における放射の吸収次いで即座の再放射（「放出」）により引き起こされ、これは、入射放射が止んだときにほとんど一度に生じる。分子レベルでは、蛍光は、蛍光団として知られる特定の化合物が光エネルギーにより、基底状態から励起のより高い状態へ持ち上げられる場合；それらの基底状態へ分子が戻る場合に、典型的には異なる波長でこれらが光を放出する場合に生じる。「りん光」は、対照的に、1つの波長での放射の吸収、それに続く異なる波長で生じそして入射放射が止んだ後のそれと分かる時間の間続く遅い放射により引き起こされる発光をいう。「化学発光」は、化学反応から生じる発光をいい、そして「生物発光」は、生体もしくは生細胞、細胞小器官またはそれらに由来する抽出物からの光の放出をいう。

【0321】

例示の目的で、そして限定の目的ではなく、1つの例示的なクラスのエネルギー移動が、共鳴蛍光エネルギー移動(FRET)として公知である。FRETは、励起されたドナー蛍光団が、直接アクセプター蛍光団へ移動される場合に、1つの分子内、または2つの異なる型の分子間で生じる(概説について、Wuら、Analytical Biochem. 218:1~13, 1994を参照のこと)。一般に、励起された蛍光団(ドナー)から吸収体(アクセプター)へのエネルギー移動は、以下により測定される:(1)ドナーおよびアクセプターからの蛍光のスペクトル(スペクトルの変化を含む)を測定すること;(2)パルス-レーザー誘起後にドナーの蛍光強度が減少する速度(すなわち、蛍光寿命)を測定すること;または(3)ドナー化合物からの蛍光の強度の減少(FRETの間接的測定)、もしくはアクセプター化合物からの蛍光強度の増加(FRETの直接的測定)を測定すること。エネルギー移動の直接的な測定は、励起されたアクセプター化合物からのシグナルをモニターすることを含み、これは、これらの化合物が互いに近位になるにつれて増加し、一方、エネルギー移動の間接的な測定は、化合物が近位になるほど減少する(すなわち、クエンチされる)、励起されたドナー化合物からのシグナルをモニターすることを含む。

【0322】

(B.GRETベースのアッセイのための、ドナーポリペプチドモチーフ:アクセプターポリペプチドモチーフの対)

本発明のFRETベースのアッセイのために受容可能なエネルギードナー化合物(ドナー)およびエネルギー受容化合物(アクセプター)の組み合わせを決定するために、多くの基準が一般的に使用される。1つの基準は、ドナー化合物の放出スペクトルが、アクセプター化合物の吸収スペクトルに少なくとも部分的に重複し、その結果ドナーからアクセプターへのエネルギー移動が生じることである。代表的に、ドナー化合物は、放出ピーク波長(本明細書中、「D(em)」)を有し、これは、アクセプター化合物の励起ピーク波長(本明細書中、「A(ex)」)の数nm内である。換言すると、D(em)とA(ex)との間の差は、典型的には、約70nm~約20nm未満であり、D(em)-A(ex)についての典型的な値は、60nm、50nm、40nm、30nm、

25 nm、20 nm、15 nm、10 nm、5 nmまたは1 nmである。

【0323】

別の基準は、励起されたアクセプター化合物からの放出シグナルが、励起されたドナー化合物からの放出シグナルとは異なり得なければならないことである。励起されたドナーからの放出シグナルは、例えば、以下の場合にそのように異なり得る：(1) 励起されたアクセプターからの放出シグナルの波長が、励起されたアクセプターからの放出シグナルの波長と十分に異なっている場合、または(2) アクセプターが、励起されたアクセプターからの放出シグナルをクエンチする場合。

【0324】

種々のクラスの化合物が、アクセプターおよびドナーとして機能し得、そしてアクセプターおよびドナーは、同じクラスの化合物に属し得るがその必要はない。任意の適切なシグナル放出(好ましくは光放出(蛍光性、りん光性または化学発光性))ポリペプチドモチーフまたは化学部分は、本発明における検出可能な標識として使用され得る。化学的部分は、当該分野で公知の方法に従ってポリペプチドに結合体化され得る。

【0325】

以下を含む融合タンパク質の組換え産物は、本発明のアッセイにおいて有用である蛍光性リガンドとして機能するタンパク質の相同性バッチを生成するための簡単な方法である：(1) 目的のミトコンドリア因子に対応するかまたはそれに由来するポリペプチド配列、および(2) 蛍光性ポリペプチド。表2は、蛍光性ポリペプチドモチーフの適切に重複した(ドナー放出およびアクセプター励起スペクトルについて)対を列挙する。グリーン蛍光タンパク質が上に記載される(実施例6)。「FLASH」(フルオレセイン砒素ヘリックスバインダー)配列を含む融合タンパク質が、記載されている(Griffinら, Science 281:269~272, 1998)。

【0326】

(表2: FRETベースのアッセイのための、エネルギー移動分子ドナー-アクセプター対)

【0327】

【表2】

ドナー			アセプター		
タンパク質 または モチーフ	エキサイト 波長	エミット 波長	エキサイト 波長	エミット 波長	タンパク質 または モチーフ
I 群 ドナー	375 - 390 nm	425 - 475 nm	任意のI群ドナーとの使用に適切:		
EBFP- F64L/S65T/ Y66H/Y145F	380 nm	440 nm	433 nm 453 nm*	475 nm 501 nm*	ECFP- F64L/S65T/ Y66W/N146I/ M153T/ V163A/ (±N212L)
BFP-Y66H/ Y145F	381 nm	445 nm			
BFP-Y66H	382 nm	448 nm	470 nm* (395 nm)	510 nm	野生型 GFP
BFP-F64M/ Y66H/V68I	385 nm	450 nm			
II 群	390 - 405 nm	475 - 525 nm	任意のII群ドナーとの使用に適切:		
野生型 GFP	395 nm (470 nm*)	510 nm	502 nm	512 nm	YFP- S65G/Y66W/ S72A/T203Y
			508 nm	528 nm	"FLASH" タンパク質
			513 nm	527 nm	EYFP- S65G/V68L/ S72A/T203Y
III 群	425 - 440 nm	475 - 525 nm	任意のIII群ドナーとの使用に適切:		
ECFP- F64L/S65T/ Y66W/N146I/ M153T/V163 A/(±N212L)	433 nm (453 nm*)	501 nm* (475 nm)	502 nm	512 nm	YFP- S65G/Y66W/ S72A/T203Y
			508 nm	528 nm	"FLASH" タンパク質
			513 nm	527 nm	EYFP- S65G/V68L/ S72A/T203Y
IV 群	465 - 495 nm	475 - 525 nm	任意のドナーとの使用に適切:		
野生型 GFP	470 nm* (395 nm)	510 nm	502 nm	512 nm	YFP- S65G/Y66W/

(表2の続き)

ドナー			アクセプター		
タンパク質 または モーター	励起 波長	放出 波長	励起 波長	放出 波長	タンパク質 または モーター
					S72A/T203Y
RFP-S65C	479 nm	507 nm	508 nm	528 nm	"FLASH" タンパク質
EGFP-RFP- F64L/S65T	488 nm	507 nm	513 nm	527 nm	EYFP- S65G/V68L/ S72A/T203Y
RFP-S65T	489 nm	511 nm			
RFP-F64M/ S65G/Q69L	490 nm	509 nm			

* 微量の励起光または紫外光

(C. エネルギー移動を検出するための装置)

種々の装置を、エネルギー移動ドナー化合物であるエネルギー移動分子を誘起するため、およびエネルギー移動アクセプター化合物であるエネルギー移動分子からの放出を測定するために、本発明の方法において使用し得る。どの装置が特定のドナー - アクセプター対について適用可能であるのかは、例えば、以下のような因子に依存する：(1) ドナー化合物を励起する波長(好ましくは、 $D(\text{ex})$ であるかまたはそれに近い)のエネルギーをサンプルに適用する必要性；(2) アクセプター化合物の放出スペクトル(好ましくは、 $A(\text{em})$ であるかそれに近い)内のエネルギーを測定する必要性；(3) 所定のプログラム内でアッセイされるサンプルの型；ならびに(4) 所定のプログラム内でアッセイされるサンプルの数。

【0328】

因子(1)および(2)に関して、ドナー化合物を励起するためにサンプルに適用されるエネルギーのスペクトル、および励起されたアクセプター化合物により放射されそしてサンプルにおいて測定されるエネルギーのスペクトルは、一般

に、どの型の装置が使用されるかを決定する。例えば、 $D(\text{em})$ は、 $A(\text{em})$ と同一であるはずがないが、これら2つの値の間の差異の受容可能な最小量は、数ある因子の中でも、使用される装置により影響される。すなわち、 $D(\text{em})$ が $A(\text{em})$ に近づくにつれ、近接した間隔の波長を分解できる装置が必要であり、そして $D(\text{em})$ と $A(\text{em})$ との間の差異が約3~約5nm未満であるドナー-アクセプター対を使用するアッセイは、高分解装置を必要とする。逆に、 $D(\text{em})$ と $A(\text{em})$ との間の差異が約50~約75nmを超えるドナー-アクセプター対を使用するアッセイは、中~低分解の装置を必要とする。

【0329】

特に因子(2)に関して、励起されたアクセプター化合物により放射されそしてサンプルにおいて測定されるエネルギーの型は、一般に、どの型の装置が使用されるかを決定する。定義により、蛍光測定器は、蛍光エネルギーを測定するデバイスであり、そのためこの装置の一部であるべきである。蛍光測定器は、一回に2~3個のサンプルチューブのみしか適応しない比較的単純な手動操作される装置から、例えば、96ウェルマイクロプレート(例えば、 $f\text{max}^{\text{TM}}$ 蛍光プレートリーダー、Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA; またはCytofluor蛍光プレートリーダー、モデル番号2350、Millipore Corp., Bedford, MA)のような形態でより多数のサンプルに適応するいくらかより複雑な手動操作される装置またはロボット装置、あるいは96ウェルマイクロプレートのような種々の形態で多数のサンプルに適応する複雑なロボット装置(例えば、FLIPRTM装置; 前出を参照のこと)までの何でもであり得る。

【0330】

因子(3)(所定のプログラムにおいてアッセイされるサンプルの型)は、種々の形態が、種々の型のサンプルに適切である。例えば、96ウェルマイクロプレートが、目的の細胞もしくは単離されたオルガネラがそのマイクロプレートの材料に付着するかまたはそのマイクロプレートのウェルに適用されたいくつかの材料に付着する場合に適切であるが、プラスチック蛍光は、約400nmより低

い励起波長でより大きなバックグラウンド成分を生じる。非接着細胞もしくはオルガネラまたはそれらから調製された可溶性抽出物を含む測定のために、ガラスまたはポリマー性のチューブまたはチュービングにおける蛍光シグナルを読み取ることができる装置が、好ましい。どの型の形式が使用されるかに関わらず、ドナー化合物およびアクセプター化合物ならびにコントロール試薬および評価される化合物を適時に適切な点でサンプルに導入することを可能にすべきである。

【0331】

因子(4)(所定のプログラムにおいてアッセイされるサンプルの数)は、その装置がどのように自動化されるかに影響する。例えば、多数のサンプルの高スループット(HTS)アッセイが所望される場合、ロボット装置もしくは半ロボット装置が、好ましい。しかし、特に、多くのサンプル数に適応する形態(例えば、96ウェルマイクロプレート)が使用される場合、かなり多数のサンプルを手動で処理し得る。

【0332】

そのアッセイに依存して、Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR™)装置(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)が、しばしば、本発明のETベースのアッセイのための選り抜きの装置である。FLIPR™システム(<http://www.moleculardevices.com/pages/flipr.html>を参照のこと)は、以下の所望の特徴を有する。このシステムは、水冷アルゴンイオンレーザー照明と、画像に曝露され結果としてそのシグナル対ノイズ特徴が従来の画像化オプティクスよりも一般的に大きい期間にわたってシグナルを蓄積する積算検出器としての冷却式CCDカメラとの組み合わせを使用する。このシステムはまた、細胞単層上のシグナル識別を可能にする特許細胞層分離オプティクスを利用し、それにより望ましくない細胞外バックグラウンド蛍光を減少する。このシステムは、リアルタイムでデータを提供し、そしてまた、動力学的データ(すなわち、多くの時点での読取り)を提供し得る。このシステムは、96ウェルマイクロプレートの96ウェルすべてを同時に刺激しそして読み取る能力を有する。このシステムは、分析の間のサンプルの温度および湿度の正確な

制御を提供する。このシステムは、一体型の最新の96ウェルピペッターを備え、このピペッターは、実験の間の持ち越しを排除するために使い捨てチップを使用し、マイクロプレートから正確な体積の流体を吸引、分配および混合するために使用され得る。そしてFLIPR³⁸⁴装置の場合、このシステムは、ロボット様式または半ロボット様式でサンプルアッセイを実行するように適合され得、それにより、最短時間での多数のサンプルの分析（例えば、1日に約100個の96ウェルマイクロプレートまで）を提供する。

【0333】

（実施例18）

（ANT3：CypD相互作用のFRETベースアッセイ）

実施例1～12に記載される試薬およびシステムを、CypD：ANT相互作用（特に、huANT3：huCypD）のFRETベースアッセイにて使用し得る。このようなアッセイ（インビトロでもインビボでも実行し得る）を実施するための手順が、この実施例に記載される。

【0334】

（A．CypD：ANT相互作用のインビボFRETベースのアッセイ）

細胞を、互いとのエネルギー移動ドナー：アクセプター対として作用し得る2つ以上の蛍光（または他の方法で検出可能に標識された）ミトコンドリア融合タンパク質の産生を指令する発現構築物で、（一過性または永続的に）形質転換する。あるいは、細胞を、少なくとも1つのエネルギー移動ドナー：アクセプター対を構成する2つ以上の蛍光（または他の方法で検出可能に標識された）ミトコンドリア融合タンパク質の産生を指令する単一の発現構築物で、形質転換する。この融合タンパク質の形質転換および適切な局在化を、例えば、GFP融合タンパク質について蛍光顕微鏡および/または蛍光検出によって、確認する。

【0335】

huANT3およびhuCypDの場合、これらのミトコンドリア因子のGFT融合タンパク質誘導体を、その相互作用のFRETベースのアッセイにおいて使用する。詳細には、そのドナー分子はhuCypD-ECFP（ex、433nm、マイナーピーク453nm；em、475nm、マイナーピーク50

1 nm : 実施例 11) であり、そしてアクセプター分子は huANT3 - EYFP (C) (ex、513 nm ; em、527 nm) であり、ここで EYFP ポリペプチドは、融合タンパク質のカルボキシ末端側にある (実施例 6)。これらの融合タンパク質の結合 (正の相互作用) を、種々の様式で検出および測定し得る。第 1 に、huCypD - ECFP から huANT3 - EYFP (C) へのエネルギーの転移を、励起したアクセプター分子からの蛍光の増加として (すなわち、huANT3 - EYFP (C) についてのピーク放射波長 (527 nm) 付近の蛍光の増加として) 直接検出し得る。第 2 に、huCypD - ECFP から huANT3 - EYFP (C) へのエネルギーの転移を、励起したドナー分子からの蛍光の減少 (クエンチング) として (すなわち、huCypD - ECFP についてのピーク放射波長 (475 nm、マイナーピーク 501 nm) 付近の蛍光の減少により)、間接的に検出し得る。逆に、これらの融合タンパク質の分子相互作用の阻害および / または反発 (負の相互作用) の促進を、直接 (すなわち、huANT3 - EYFP (C) についてのピーク放射波長 (527 nm) 付近での、huCypD - ECFP から huANT3 - EYFP (C) へのエネルギー移動の減少から生じる、蛍光の減少として) 検出および測定し得るか、あるいは間接的に (すなわち、励起したドナー分子からの蛍光の増加として) (すなわち、huCypD - ECFP についてのピーク放射波長 (475 nm、マイナーピーク 501 nm) 付近の蛍光の減少により) 検出および測定し得る。

【0336】

形質転換した細胞を、候補化合物および候補組成物と接触させる。用語「候補の化合物および候補組成物」は、有機低分子、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド (リボザイムおよび他のアンチセンスオリゴヌクレオチド、遺伝子治療構築物およびアンチセンス構築物を含む核酸)、ならびに天然の生物学的供給源由来の抽出物 (特定の植物組織もしくは動物組織由来の抽出物を含む) を含む、化合物を包含することが意図される。検出可能なシグナル (例えば、サンプルの相互作用から生じる蛍光) を、例えば、経時的に (候補化合物および / または候補組成物の添加前および後を含む) かまたは適切なインキュベーション期間の後の単一時点で、測定する。その結果を、ANT3 と CypD との相互作用

に対する候補化合物および/または候補組成物の効果(正、中性、または負)を評価するために、試験する。

【0337】

細胞を、インビボでのCypD:ANT相互作用に影響する能力について試験する化合物の侵入を容易にするために必要なように可溶化する。当該分野で公知の方法および/または本開示の方法を使用して、当業者は、変化したミトコンドリア状態を誘導するために特定の薬剤および/または状態を利用するアッセイのために、適切な用量、状態およびサンプル(例えば、細胞全体または透過性細胞、および適切な細胞型もしくは細胞株)を決定することができる。限定のためでなく例示として、細胞を、透過性化薬剤(例えば、ジギトニン、ストレプトリジンO、Staphylococcus aureus -毒素(-溶血素)、サポニン(すべて、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO; Sigmaカタログ「Biochemicals and Reagents for Life Science Research」Anon. 1999およびその中で引用される参考文献を、これら透過性化薬剤について参照のこと)の添加によってか、あるいは物理的操作(例えば、エレクトロポレーション)によって、透過性化し得る。

【0338】

関連実施形態において、ミトコンドリアを、エネルギー移動ドナー:アクセプター対として作用し得る2つ以上の蛍光(または他の方法で検出可能に標識された)ミトコンドリア融合タンパク質の産生を指令する発現構築物で形質転換された細胞から、調製する。候補化合物および候補組成物を、融合タンパク質のEREドナー:アクセプター対を含む単離されたミトコンドリアに直接添加し、そしてサンプル中の蛍光を、例えば、経時的に(候補化合物および/または候補組成物の添加前および後を含む)かまたは適切なインキュベーション期間の後の単一時点で、測定する。

【0339】

(B. CypD:ANT相互作用のインビトロFRETベースアッセイ)

CypD:ANT相互作用のインビトロFRETベースアッセイを、本実施例

および実施例15に記載される方法に従って実行する。マルチウェルプレートを、ANT-EYFP融合タンパク質またはCypD-ECFP融合タンパク質のいずれかでコーティングし得、次いで、それぞれ、CypD-ECFP融合タンパク質またはANT-EYFP融合タンパク質のいずれかと、候補化合物の存在下もしくは非存在下で接触させ、そして各ウェル中の蛍光シグナル(互いに近接するANT分子とCypD分子の数に直接対応する)を、自動蛍光測定器もしくは半自動蛍光測定器により読取り得る。

【0340】

インビトロアッセイは、ANT融合タンパク質およびCypD融合タンパク質が同じ亜細胞区画に同時局在化する必要がないので、本明細書中に記載されるANT-EYFP融合タンパク質のいずれか(すなわち、EYFPポリペプチドが融合タンパク質のカルボキシ末端に位置する、ANT-EYFP、またはEYFPポリペプチドがアミノ末端に位置する、EYFP-ANTのいずれか)を、このようなアッセイにおいて使用し得る。

【0341】

(実施例19: 亜ミトコンドリア粒子を用いたCYPD-ANT結合相互作用のアッセイ)

この実施例では、ヒト組換えANT3発現細胞由来のミトコンドリアから調製された亜ミトコンドリア粒子(SMP)とのCypDの結合についてのアッセイのための組成物および方法について記載する。上記実施例3に記載されるヒスタグ化ヒト組換えANT3を発現するトランスフェクトしたT.ni昆虫細胞をSMPの供給源とした。

【0342】

SMPの調製は、Halestrapら(1998 Biochim. Biophys. Acta. 1366: 79-94)の改変に従い、すべての工程を4で実施した。出発物質は、 1×10^9 個のT.ni細胞に対応する1リットルの細胞培養物であった。細胞を遠心分離してペレットにし、そして-20で凍結保存した。ミトコンドリアの単離のために、この細胞ペレットを、15mlのミトコンドリア単離緩衝液(MIB、他に示されない限り、すべての試薬はSi

gma、St. Louis、MOから購入した：0.22M マンニトール、70mM スクロース、10mM Hepes、0.2mM EDTA、0.2mM 2-メルカプトエタノール(2-ME)、pH7.2、および標準プロテアーゼインヒビター混液(Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN)中で融解および懸濁した。この懸濁液を、ドライアイス/エタノール槽中で容器をシェル-凍結(shell-freezing)することによって、2回の凍結融解サイクルに供し、次いでこの懸濁液を室温で解凍し、次いで20mlのMIBで希釈した。次に、Potter-Elvehjemホモジナイザー(rheostat setting 28)における10回のストロークでこの懸濁液をホモジナイズした。生じたホモジネートをさらにMIBで希釈して、約200mlの容量にし、そして600×g、4で10分間遠心分離した。上清液を回収し、そしてペレットを20mlのMIBに懸濁して上記のようにホモジナイズし、MIBで希釈して最終容量100mlにし、再度600×gで10分間遠心分離した。上清をプールし、そして遠心分離後の上清液が清澄になるまで、ペレットをさらに3回、上記のようにホモジナイズした。プールした上清液を、再度600×gで10分間遠心分離し、混入している核を除去した。ここで核は、遠心分離後に白色の外見を有するペレット形態で堆積した。核除去後の上清を、次いで12,000×gで15分間遠心分離し、桃色のミトコンドリアペレットを回収した。このペレットを、プロテアーゼインヒビターを補充した8mlのMIBに再懸濁した。タンパク質の濃度を、Pierce BCA(Pierce Chemical Co.、Rockford、IL)を用いて、製造者の説明書に従って測定した。

【0343】

単離されたT.niミトコンドリアからのSMPの調製を、改変されたNicollらの方法(1996 J Biol Chem 271(4):2185-92)により実施した。簡単にいうと、氷/水槽中に固定した25mlガラスビーカー中で、ミトコンドリアをMito B緩衝液(0.25M スクロース、10mM Tris-HCl(pH7.4)、0.1mM EGTA-Tris)に、(タンパク質濃度に基づいて)30mg/mlで懸濁し、Sonof

ier™モデル450プローブチップソニケーター (Branson Ultrasonics, Inc. Danbury, CT) を用いてアルゴン気流下で超音波破碎した (サイクルを60%およびパワーセッティング (Brinkmann Instruments Westbury NY) を20に設定し、3回の超音波破碎を、それぞれ連続3分間ずつ行った)。次いで、破碎されなかったミトコンドリアを、8,000×gで10分間遠心分離により除去し、その後上清を、100,000×gで60分間高速遠心分離し、SMPをペレットにした。上清をデカンテーションし、SMPペレットをMito B緩衝液でリンスし、次いで同じ緩衝液に再懸濁した。

【0344】

SMP中に存在するANTとのシクロフィリンの結合を、可溶性組換えGST-シクロフィリンD (上記の実施例10を参照のこと) を用いて決定した。GST-CypD調製物のロータマーゼ (ペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼ) 活性を、Kofronらの「ソルベントジャンプ」法 (1991 Biochemistry 30:6127-6134) に従い決定した。簡単にいうと、Ala-Ala-_{cis/trans}-Pro-Phe-pNaをロータマーゼ基質として用い、_{cis/trans}-キモトリプシンによるすべてのトランス-Pro含有ペプチドの切断と組み合わせて、p-ニトロアニリドを産生し、これを390nmでの吸光度により検出した。図12 (左パネル) に示されるように、添加したGST-CypDの非存在下で実施した基質ペプチドの非酵素的なシスからトランスへの異性化を決定する目的の試験反応と比較して、GST-CypDは、直ちにロータマーゼ活性の存在を示した。シクロスポリンA (CsA) は、投薬用量に依存する様式で (図12右パネル) CypDのロータマーゼ活性を阻害した (図12)。これより、組換えGST-CypD融合タンパク質の活性をさらに確認した。同じ方法論を用いて、ポリHisタグ化組換えCypD融合タンパク質 (上記のようにニッケルカラムでアフィニティー精製されたHis-CypD、高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC™、Pharmacia, Piscataway, NJ) により精製されたHis-CypD、およびエンテロキナーゼ切断後の、ポリHis融合タグから遊離したCypD (Ek-CypD

)を含む；これらのデータを図13に示す)についてもまた、ロータマーゼ活性を実証した(図9を参照のこと)。

【0345】

T. ni細胞から調製されたSMPとのシクロフィリンの結合をアッセイするために、最終容量1mlの結合緩衝液(50mM NaCl; 20mM イミダゾール; 10mM HEPES (pH7.2); 10mM K_2HPO_4 ; 1mM EDTA)に1mg SMPおよび2.6 μ M GST-シクロフィリンD(実施例10)を含む結合反応をポリカーボネート遠心チューブに準備した。特定の反応のために、10 μ M シクロスポリンA(CsA)もまた存在させた。この反応成分の安定性を評価するために、GST-CypDおよびSMPを、(i) SMPの調製後に直ちに結合させる(図11、0時間)か、または(ii) 4で3~6時間静置した後に結合アッセイを開始させる(図11、3時間および6時間)かの、いずれかを行った。結合反応混合液を、室温で20分間インキュベートし、15000rpmに予備冷却された遠心分離ローターに設置し、次いで100,000 \times gで60分間遠心分離してSMPをペレットにした。ペレットをSDS-PAGEサンプルバッファー中で、37°Cで一晩溶解し、溶解したペレットのアリコートおよび上清のアリコートに対して、上記のようにタンパク質決定を行った。等価濃度のリガンド(GST-CypD)に対応するペレットサンプルおよび上清サンプルをSDSポリアクリルアミド上で電気泳動し、そして標準的手順に従ってプロットをニトロセルロースに転写した。ペレットに存在するSMPに結合したCypDおよび上清に存在する結合していない(遊離の)CypDを、上記のようなウエスタンブロット分析により決定した。ただし、Bergsmaら(1991、J. Biol. Chem. 266:23204)の方法に従うCypDペプチドによる免疫化により生成した、CypD特異的抗体を含有するウサギ抗血清を一次抗体の供給源として用いた。図11は、このウエスタンブロット分析の結果を示す。ここで、SMPを添加しなかったコントロールサンプルのペレット(p)フラクションからCypDは検出されなかったが、このコントロールサンプルの上清(s)フラクションからCypDは容易に検出された。GST-CypD調製後直ちにSMPを加えた場合(0時間)、または3~6時間

後に加えた場合(3時間、6時間)、GST-CypDは、CsAにより阻害される様式で、SMPペレットフラクションから容易に検出可能であった。

【0346】

(実施例20:プロテオリポソームを用いたCypD-ANT結合相互作用の assay)

この実施例では、バクテリオロドプシン(BR)および/またはHisタグ化組換えヒトANT3を発現するT.ni細胞由来の組換えヒトANT3ミトコンドリアを用いて再構成された脂質から調製したプロテオリポソーム(PLS)へのCypDの結合を assay するための、組成物および方法について記載する(上記実施例3および15を参照のこと)。再構成されたリポソーム中のBRの封入は、プロテオリポソームの単離を容易にする密度および可視的な色の供給源を提供し、そしてタンパク質-タンパク質の結合に対する非特異的コントロールもまた提供した。

【0347】

精製されたANTのリポソームへの再構成を、吸着ビーズを用いて素早く界面活性剤を除去する方法(Kramerら、1986、Biochim. Biophys. Acta、863、286-289)、および非イオン性界面活性剤を用いた比較的大きい単層リポソーム形成のための方法(Uenoら、1984 Biochemistry、23、3070-3076)に基づいて実施した。ここで、これらの方法は、プロテオリポソーム形成プロセスを加速するために、そしてビーズへの吸着による脂質の損失を最小化するために改変した。生成したリポソームを、凍結/解凍/超音波処理の手順により調製した。簡単にいうと、卵黄レクチン(240mg)を、3mlの再構成緩衝液(50mM NaCl、10mM HEPES(pH7.4))で懸濁した。この懸濁液を、アルゴン気流をパルスして酸素を除去し、容器をドライアイス/エタノール槽に接触させることにより部分的に凍結させ、そして(超音波処理時間が1分間であることを除いて)上記のSMPについての記載のように超音波破碎した。脂質懸濁液の清澄度が達成されるまで、この解凍/超音波処理工程を、少なくとも3~4回繰り返した。

【0348】

Small EconoColumns™ (BioRad、Hercules、CA)を、1.7mgのSM-2 BioBeads™ (BioRad)で満たし、メタノールで洗浄し、その後に水で洗浄し、そして再構成緩衝液で平衡化した。アフィニティー精製されたヒスタグ化組換えヒトANT3を含む溶出緩衝液(50mM NaCl、1mM EDTA、10mM HEPES、1.3% Triton-X100™、0.5ml)を、200µlの生成したリポソームと混合し、次いで、ATP(50mM)またはメチルウンベリフェロンホスフェート(MUP、5mM、Molecular Probes、Inc.、Eugene、OR)のいずれかを加えた。200µlのリポソーム懸濁液に、0.5mlの溶出緩衝液(50mM NaCl、1mM EDTA、10mM HEPES、1.3% Triton-X100™)を加えることにより、コントロール(タンパク質フリー)リポソームを並行して調製した。それぞれの混合液をボルテックスし、BioBeads™ SM-2カラムに供し、そして5~6回カラムを通した。プロテオリポソームの形成は、溶液の外見上の濁度により可視化された。捕捉されなかったMUPまたはATPを、遠心分離によるプロテオリポソームのペレット化工程の間か、またはSephadex™ G-50 (Pharmacia、Piscataway、NJ)カラムでプロテオリポソーム懸濁液を濾過することによるかのいずれかで除去した。

【0349】

バクテリオロドプシン(BR)を、次のようにANTリポソーム中に同時再構成させた。バクテリオロドプシン(5mg、Sigma St. Louis、MO)を、200µlの溶出緩衝液(1.3%のTritonを含有する)中で、ローター上での6時間のプレインキュベーションによりモノマー化した。上記のようにATPまたはMUPの添加の前ではなく、ANTを脂質に加えた後に、モノマータンパク質をこのANT-脂質混合液に加えた。

【0350】

リポソームおよびプロテオリポソームの完全性を、供給者の説明書に従って、封入されたMUP(Molecular Probes)の保持率を決定するこ

とにより評価した。簡単にいうと、アルカリホスファターゼに曝した一定量のリポソームおよびプロテオリポソーム中のメチルウンベリフェリルアニオン (MUPのアルカリホスファターゼ切断産物) の蛍光検出をモニターした。リポソームおよびプロテオリポソームの完全性を、NADPHの蛍光定量的な検出に関して記載されるのと同様に (Streicher - Scottら、1993、Anal. Biochem. 210、69 - 76) ヘキソキナーゼおよびグルコース - 6 - ホスフェートデハイドロゲナーゼを組み合わせた系を用いて、捕捉されたATPの流出として検出可能なリポソームの透過性を決定することによっても評価した。これらの手順を用いて、捕捉された指標のリポソームまたはプロテオリポソームからの喪失は、検出されなかった。

【0351】

GST - CypDのリポソームまたはプロテオリポソームとの結合を検出するためのアッセイを、SMPをリポソーム (LS) またはプロテオリポソーム (PLS) で置換し、次のさらなる改変を加えることを除き、本質的には上記の図19のように実施した：この結合アッセイのための反応緩衝液は、5 mM K_2HPO_4 、10 mM HEPES (pH 7.2) であり、それぞれの結合反応には、上記のように調製された200 μ lのLSまたはPLS懸濁液を含み、そしてLSおよびPLSのペレット化には140,000 \times gでの遠心分離を必要とした。

【0352】

図14は、ウエスタンブロット分析を示す。ここでは、ヒトANT3およびバクテリオロドプシンの両方を用いて再構成させたPLSへのGST - CypDの結合が、容易に目視され得る。図14の上パネルは、前述の実施例のように抗ヒトCypD抗体を用いて実施したウエスタンブロットを示す。ここで、PLSが加えられなかった場合、CypDは、上清に残存した (最も左のレーン) が、PLSが加えられた場合、ANT / BR PLSペレットに明らかなCypDシグナルが表れ、対応する上清フラクションには検出可能なシグナルが存在しなかった。図14にまた示されるように、CsAの存在下でCypDの分布が変化した。ここで、容易に検出可能なシグナルは、上清に残存したままだった。図14の

下パネルは、上記のようにh u A N T 3 構築物中へと操作されたE X P R E S STM エピトープタグに対して特異的なモノクローナル抗体を用いて実施した、同様のウエスタンブロットを示す。C y p D - A N T 3 結合相互作用に対するC s A 阻害の特異性をさらに特徴付けるために、結合アッセイを実施し、B R のみでかまたはB R およびA N T の両方で再構成したP L S へのC y p D の結合と比較した。図15に示されるように、A N T / B R P L S へのG S T - C y p D の結合は、容易に検出可能であり、そしてC s A により阻害された。C s A は、A N T / B R P L S ペレットにおいて検出可能なC y p D の明らかな減少をもたらすが(図15右から4つのレーン)、B R P L S ペレットからそのような減少は見られなかった(図15左から4番目のレーン)。

【0353】

上記のA N T / C y p D 結合アッセイの代替法として、結合相互作用を同定するためにP L S を遠心分離することを特徴とする「回転透析(spin dialysis)」方法もまた開発した。このアッセイは、タンパク質フリーのリポソーム(L S)ならびにP L S との結合相互作用の決定を可能にする。なぜなら、上記のように、超遠心分離によりP L S の回収を容易にした、タンパク質を用いる再構成による、P L S に付与される余分な密度を必要としないからである。C y p D - A N T 結合を決定するためのこの回転透析アッセイ方法は、以下のよう

【0354】

上記のように調製されたそれぞれのリポソーム調製物(例えばL S、B R P L S、A N T / B R、P L S)のアリコート(100 μ l)を、10 μ gのG S T - C y p D と混合し、そして400 μ lの標準緩衝液(50mM NaCl、10mM H e p e s、pH7.4)で希釈した。コントロール(リポソームフリー)サンプルは、500 μ lの緩衝液および10 μ gのG S T - C y p D を含有した。全てのサンプルを室温で20分間、ローター上でインキュベートし、次いで、それぞれ、100kDa分子量カットオフフィルター付きのA m i c o n (B e v e r l y、M A) マイクロンセントレーター(microncentrator)チューブに移した。製造者に提供された説明書に従い、このチューブ

を、4 で(バケットローターを用いて)遠心分離した。遠心時間は、滞留容量が、各チューブで約40 μ lになるように調製し、サンプル間で変化させた。コントロールサンプルを、手短に遠心分離し(4分間)、タンパク質フリーリポソーム、BRリポソーム、およびANT/BRリポソームを含むサンプルを、それぞれ、55分間、65分間、75分間遠心分離した。フロースルーの溶液(遊離CypDリガンドを含有する)および濃縮されたリポソーム(例えば、結合リガンドを有する)を含む滞留物の両方、または緩衝液のみ(コントロール)を、上記の抗CypD抗体を用いたウエスタンブロット分析によって、CypDの内容物について試験した。濃縮フィルターへの吸着によってCypDがサンプルから損失している可能性を排除するために、このフィルターを90 μ lの希釈されたSDSサンプル緩衝液で洗浄し、この洗浄液を、ウエスタンブロットによりCypDについて分析した。この洗浄液からは、CypDが検出されなかった。このことは、このフィルターへのCypDの結合が明らかに存在しないことを示す。

【0355】

前述のことから、本発明の特定の実施形態は、例示の目的で本明細書中に記載されているが、本発明の意図および範囲から外れることなく、種々の改変が成され得ることが理解される。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲による以外は限定されない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitokor
 Murphy, Anne N.
 Clevenger, William
 Wiley, Sandra Eileen
 Andreyev, Alexander Y.
 Frigeri, Luciano G.
 Velicelebi, Gonul
 Davis, Robert E.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETERMINING
 INTERACTIONS OF MITOCHONDRIAL COMPONENTS, AND FOR
 IDENTIFYING AGENTS THAT ALTER SUCH INTERACTIONS

<130> 660088.433PC

<140> PCT

<141> 2000-11-03

<160> 54

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 894

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

```

atgggtgatac acgcttgagg cttcctaaag gacttcctgg ccggggcggt cgccgctgcc      60
gtctccaaga ccgcggtcgc ccccatcgag agggcctaac tgctgctgca ggtccagcat      120
gccagcaaac agatcagtgc tgagaagcag taaaaaggga tcattgattg tgtggtgaga      180
atccctaagg agcagggtct cctctccttc tggaggggta acctggccaa cgtgatccgt      240
tacttcccca cccaagctct caacttcgcc ttcaaggaca agtacaagca gctcttctta      300
gggggtgtgg atcggcataa gcagttctgg cgctactttg ctggtaacct ggcgtccggt      360
ggggccgctg gggccacctc cctttgcttt gtctaccgcg tggactttgc taggaccagg      420
ttggctgctg atgtgggcag gcgcgccag cgtgagttcc atggctctgg cgactgtatc      480
atcaagatct tcaagtctga tggcctgagg gggctctacc agggtttcaa cgtctctgtc      540
caaggcatca ttatctatag agctgcctac ttccggagtct atgatactgc caaggggatg      600
ctgcctgacc ccaagaacgt gcacattttt gtgagctgga tgattgcccc gagtgtgacg      660
gcagtgcag ggctgctgtc ctaccctttt gacactgttc gtcgtagaat gatgatgcag      720
tccggccgga aaggggccga tattatgtac acggggacag ttgactgctg gaggaagatt      780
gcaaagacg aaggagccaa ggccttcttc aaaggtgcct ggtccaatgt gctgagaggg      840
atggcggtg cttttgtatt ggtgtgtgat gatgagatca aaaaatatgt ctaa      894

```

<210> 2

<211> 897

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 2

atgacagatg	ccgcattgtc	cttcgccaag	gacttcctgg	caggtggagt	ggccgcagcc	60
atctccaaga	cggcggtagc	gcccacagag	cgggtcaagc	tgctgctgca	gggtgcagcat	120
gccagcaagc	agatcactgc	agataagcaa	tacaaaggca	ttatagactg	cgtgggtccgt	180
attcccaagg	agcaggaagt	tctgtccttc	tggcgcggtg	acctggccaa	tgtcatcaga	240
tacttcccca	cccaggctct	taacttcgcc	ttcaaagata	aatacaagca	gatcttctcg	300
gggtggtgtg	acaagagaac	ccagttttgg	cgctactttg	cagggaaatct	ggcatcgggt	360
gggtccgcag	gggccacatc	cctgtgtttt	gtgtaccctc	ttgatthttgc	ccgtaccctg	420
ctagcagctg	atgtgggtaa	agctggagct	gaaagggaat	tccgaggcct	cggtgactgc	480
ctgggtaaga	tctacaaatc	tgatgggatt	aagggcctgt	accaaggcct	taacgtgtct	540
gtgcagggta	ttatcateta	ccgagccgcc	tacttcggta	tctatgacac	tgcaaagggg	600
atgcttccgg	atcccaagaa	cactcacatc	gtcatcagct	ggatgatcgc	acagactgtc	660
actgctgttg	ccgggttgac	ttcctatcca	tttgacaccg	ttcgcgcgcg	catgatgatg	720
cagtcagggc	gcaaaggaa	tgacatcatg	tacacaggca	cgcttgactg	ctggcgggag	780
attgctcgtg	atgaaggagg	caaagccttt	ttcaagggtg	catggtccaa	tgttctcaga	840
ggcatgggtg	gtgcttttgt	gcttgtcttg	tatgatgaaa	tcaagaagta	cacataa	897

<210> 3
 <211> 897
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3						
atgacggaac	aggccatctc	cttcgccaac	gacttcttgg	ccggaggcat	cgccgccgcc	60
atctccaaga	cggcggtagc	tccgatcag	cgggtcaagc	tgctgctgca	gggtccagcac	120
gccagcaagc	agatcggcgc	cgacaagcag	tacaagggca	tcgtggactg	cattgtccgc	180
atccccaagg	agcagggcgt	gctgtccttc	tggaggggca	accttgccaa	cgtcattcgc	240
tacttcccca	ctcaagccct	caacttcgcc	ttcaagata	agtacaagca	gatcttctcg	300
ggggcgtg	acaagcacac	gcagttctgg	aggtaacttg	cgggcaacct	ggcctccggc	360
gggtcggccg	gcgcgacctc	cctctgcttc	gtgtaccgcg	tggatthttgc	cagaacctgc	420
ctggcagcgg	acgtgggaaa	gtcaggcaca	gagcgcagct	tccgaggcct	gggagactgc	480
ctggtgaaga	tcaccaagtc	cgacggcctc	cggggcctgt	accagggcct	cagtgtctcc	540
gtgcagggca	tcacatceta	ccgggcggcc	tacttcggcg	tgtacgatac	ggccaagggc	600
atgctcctcg	acccaagaa	cacgcacatc	gtggtgagct	ggatgatcgc	gcagaccgtg	660
acggcctg	ccggcgtggt	gtcctacccc	ttcgcacagg	tgccggcggc	catgatgatg	720
cagtcggggc	gcaaaggagc	tgacatcatg	tacacgggca	ccgtcgactg	ttggaggaag	780
atcttcagag	atgagggggg	caaggccttc	ttcaagggtg	cgtggtccaa	cgtcctcggc	840
ggcatggggg	gcgctctcgt	gctggtcctg	tacgacgagc	tcaagaaggt	gatctaa	897

<210> 4
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 4						
ttatatctcg	agtatgggtg	atcacgcttg	gagcttccta	aag		43

<210> 5
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 5
tatataggta ccttagacat attttttgat ctcatcatac aac 43

<210> 6
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 6
ttatatctcg agtatgacag atgccgctgt gtccttcgcc aag 43

<210> 7
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 7
tatataggta ccttatgtgt acttcttgat ttcatcatac aag 43

<210> 8
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 8
ttatatctcg agtatgacgg aacaggccat ctcccttcgcc aaa 43

<210> 9
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 9
tatataggta ccttagagtc accttcttga gtcgctcgta cagg 44

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer
 <400> 10
 tatgcatag cattttatc c 21
 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR Primer
 <400> 11
 cgccaaaaca gccaaagct 18
 <210> 12
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Mutagenic oligonucleotide primer
 <400> 12
 ggagatggcc tgttccgtca tcttatcgtc atcgtcgtac agatc 45
 <210> 13
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Mutagenic oligonucleotide primer
 <400> 13
 gatctgtacg acgatgacga taagatgacg gaacaggcca tctcc 45
 <210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR Primer
 <400> 14
 cccggggaat tctgatgacg gaacaggcca tctcc 35
 <210> 15
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> PCR Primer
 <400> 15
 cccgggctcg agtttagagtc accttcttga gctc 34
 <210> 16
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR Primer
 <400> 16
 ttataggatc catgacggaa caggccatct ccttcgccaa a 41
 <210> 17
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR Primer
 <400> 17
 ttaaagaatt cttagatcac cttcttgagc tcgtcgtaca g 41
 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequencing primer
 <400> 18
 aaatgataac catctcgc 18
 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequencing primer
 <400> 19
 acttcaagga gaatttcc 18
 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Sequencing primer
 <400> 20
 acttcgcctt cacggata 18
 <210> 21
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequencing primer
 <400> 21
 tacggccaag ggcattct 18
 <210> 22
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequencing primer
 <400> 22
 tgaagcggaa gttcctat 18
 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequencing primer
 <400> 23
 atgccggttc ccgtacga 18
 <210> 24
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Mutagenic oligonucleotide primer
 <400> 24
 ggccctgttcc gtcatttat cgtcatcgtc g 31
 <210> 25
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

tgt gga caa ctc gaa taa
 Cys Gly Gln Leu Glu
 165

498

<210> 27
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 27
 Met Val Asn Pro Thr Val Phe Phe Asp Ile Ala Val Asp Gly Glu Pro
 1 5 10 15
 Leu Gly Arg Val Ser Phe Glu Leu Phe Ala Asp Lys Val Pro Lys Thr
 20 25 30
 Ala Glu Asn Phe Arg Ala Leu Ser Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr
 35 40 45
 Lys Gly Ser Cys Phe His Arg Ile Ile Pro Gly Phe Met Cys Gln Gly
 50 55 60
 Gly Asp Phe Thr Arg His Asn Gly Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Glu Asp Glu Asn Phe Ile Leu Lys His Thr Gly Pro Gly
 85 90 95
 Ile Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe
 100 105 110
 Phe Ile Cys Thr Ala Lys Thr Glu Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val
 115 120 125
 Phe Gly Lys Val Lys Glu Gly Met Asn Ile Val Glu Ala Met Glu Arg
 130 135 140
 Phe Gly Ser Arg Asn Gly Lys Thr Ser Lys Lys Ile Thr Ile Ala Asp
 145 150 155 160
 Cys Gly Gln Leu Glu
 165

<210> 28
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 28
 ttaatgggta ccatgacgga acaggccatc tccttcgcca aa

42

<210> 29
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 29
 ttatactcga gttagatcac cttcttgagc tcgtcgtaca gg

42

<400> 34
 gggccctcta gactacttgt acagctcgtc cat 33

<210> 35
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 35
 tttaaactcg agtatggtca accccaccgt gttc 34

<210> 36
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 36
 tatataggtta ccttattcga gttgtccaca gtcag 35

<210> 37
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 37
 ttaaggatcc atggtcaacc ccaccgtgtt c 31

<210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 38
 atatctcgag ttattcgagt tgtccacagt cag 33

<210> 39
 <211> 624
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> CDS

<222> (1)...(621)

<400> 39

atg ctg gcg ctg cgc tgc ggc tcc cgc tgg ctc ggc ctg ctc tcc gtc	48
Met Leu Ala Leu Arg Cys Gly Ser Arg Trp Leu Gly Leu Leu Ser Val	
1 5 10 15	
ccg cgc tcc gtg ccg ctg cgc ctc ccc gcg gcc cgc gcc tgc agc aag	96
Pro Arg Ser Val Pro Leu Arg Leu Pro Ala Ala Arg Ala Cys Ser Lys	
20 25 30	
ggc tcc ggc gac ccg tcc tct tcc tcc tcc tcc ggg aac ccg ctc gtg	144
Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Asn Pro Leu Val	
35 40 45	
tac ctg gac gtg gac gcc aac ggg aag ccg ctc ggc cgc gtg gtg ctg	192
Tyr Leu Asp Val Asp Ala Asn Gly Lys Pro Leu Gly Arg Val Val Leu	
50 55 60	
gag ctg aag gca gat gtc gtc cca aag aca gct gag aac ttc aga gcc	240
Glu Leu Lys Ala Asp Val Val Pro Lys Thr Ala Glu Asn Phe Arg Ala	
65 70 75 80	
ctg tgc act ggt gag aag ggc ttc ggc tac aaa ggc tcc acc ttc cac	288
Leu Cys Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys Gly Ser Thr Phe His	
85 90 95	
agg gtg atc cct tcc ttc atg tgc cag gcg ggc gac ttc acc aac cac	336
Arg Val Ile Pro Ser Phe Met Cys Gln Ala Gly Asp Phe Thr Asn His	
100 105 110	
aat ggc aca ggc ggg aag tcc atc tac gga agc cgc ttt cct gac gag	384
Asn Gly Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Ser Arg Phe Pro Asp Glu	
115 120 125	
aac ttt aca ctg aag cac gtg ggg cca ggt gtc ctg tcc atg gct aat	432
Asn Phe Thr Leu Lys His Val Gly Pro Gly Val Leu Ser Met Ala Asn	
130 135 140	
gct ggt cct aac acc aac ggc tcc cag ttc ttc atc tgc acc ata aag	480
Ala Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Cys Thr Ile Lys	
145 150 155 160	
aca gac tgg ttg gat ggc aag cat gtt gtg ttc ggt cac gtc aaa gag	528
Thr Asp Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly His Val Lys Glu	
165 170 175	
ggc atg gac gtc gtg aag aaa ata gaa tct ttc ggc tct aag agt ggg	576
Gly Met Asp Val Val Lys Lys Ile Glu Ser Phe Gly Ser Lys Ser Gly	
180 185 190	
agg aca tcc aag aag att gtc atc aca gac tgt ggc cag ttg agc	621
Arg Thr Ser Lys Lys Ile Val Ile Thr Asp Cys Gly Gln Leu Ser	
195 200 205	

taa

624

<210> 40
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 40
 Met Leu Ala Leu Arg Cys Gly Ser Arg Trp Leu Gly Leu Leu Ser Val
 1 5 10 15
 Pro Arg Ser Val Pro Leu Arg Leu Pro Ala Ala Arg Ala Cys Ser Lys
 20 25 30
 Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly Asn Pro Leu Val
 35 40 45
 Tyr Leu Asp Val Asp Ala Asn Gly Lys Pro Leu Gly Arg Val Val Leu
 50 55 60
 Glu Leu Lys Ala Asp Val Val Pro Lys Thr Ala Glu Asn Phe Arg Ala
 65 70 75 80
 Leu Cys Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys Gly Ser Thr Phe His
 85 90 95
 Arg Val Ile Pro Ser Phe Met Cys Gln Ala Gly Asp Phe Thr Asn His
 100 105 110
 Asn Gly Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Ser Arg Phe Pro Asp Glu
 115 120 125
 Asn Phe Thr Leu Lys His Val Gly Pro Gly Val Leu Ser Met Ala Asn
 130 135 140
 Ala Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Cys Thr Ile Lys
 145 150 155 160
 Thr Asp Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly His Val Lys Glu
 165 170 175
 Gly Met Asp Val Val Lys Lys Ile Glu Ser Phe Gly Ser Lys Ser Gly
 180 185 190
 Arg Thr Ser Lys Lys Ile Val Ile Thr Asp Cys Gly Gln Leu Ser
 195 200 205

<210> 41
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 41
 attaatactcg agtatgctgg cgctgcgctg c

31

<210> 42
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 42

tattaaggta ccttagctca actggccaca gt 32

<210> 43
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 43
 ttatggatcc atgctggcgc tgcgctgc 28

<210> 44
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 44
 taatctcgag ttagctcaac tggccacagt 30

<210> 45
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 45
 gggcccctcg agcccgcgat gctggcgcctg cgctgc 36

<210> 46
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 46
 cccggtggat ccgcgctcaa ctggccacag tc 32

<210> 47
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 47
 Met Gly Asp His Ala Trp Ser Phe Leu Lys Asp Phe Leu Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Ala Ala Val Ser Lys Thr Ala Val Ala Pro Ile Glu Arg Val

100 105 110
 Phe Ala Gly Asn Leu Ala Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ser Leu
 115 120 125
 Cys Phe Val Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg Thr Arg Leu Ala Ala Asp
 130 135 140
 Val Gly Lys Ala Gly Ala Glu Arg Glu Phe Arg Gly Leu Gly Asp Cys
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Ile Tyr Lys Ser Asp Gly Ile Lys Gly Leu Tyr Gln Gly
 165 170 175
 Phe Asn Val Ser Val Gln Gly Ile Ile Ile Tyr Arg Ala Ala Tyr Phe
 180 185 190
 Gly Ile Tyr Asp Thr Ala Lys Gly Met Leu Pro Asp Pro Lys Asn Thr
 195 200 205
 His Ile Val Ile Ser Trp Met Ile Ala Gln Thr Val Thr Ala Val Ala
 210 215 220
 Gly Leu Thr Ser Tyr Pro Phe Asp Thr Val Arg Arg Arg Met Met Met
 225 230 235 240
 Gln Ser Gly Arg Lys Gly Thr Asp Ile Met Tyr Thr Gly Thr Leu Asp
 245 250 255
 Cys Trp Arg Lys Ile Ala Arg Asp Glu Gly Gly Lys Ala Phe Phe Lys
 260 265 270
 Gly Ala Trp Ser Asn Val Leu Arg Gly Met Gly Gly Ala Phe Val Leu
 275 280 285
 Val Leu Tyr Asp Glu Ile Lys Lys Tyr Thr
 290 295

<210> 49
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 49
 Met Thr Glu Gln Ala Ile Ser Phe Ala Lys Asp Phe Leu Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ile Ala Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ala Val Ala Pro Ile Glu Arg Val
 20 25 30
 Lys Leu Leu Leu Gln Val Gln His Ala Ser Lys Gln Ile Ala Ala Asp
 35 40 45
 Lys Gln Tyr Lys Gly Ile Val Asp Cys Ile Val Arg Ile Pro Lys Glu
 50 55 60
 Gln Gly Val Leu Ser Phe Trp Arg Gly Asn Leu Ala Asn Val Ile Arg
 65 70 75 80
 Tyr Phe Pro Thr Gln Ala Leu Asn Phe Ala Phe Lys Asp Lys Tyr Lys
 85 90 95
 Gln Ile Phe Leu Gly Gly Val Asp Lys His Thr Gln Phe Trp Arg Tyr
 100 105 110
 Phe Ala Gly Asn Leu Ala Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ser Leu
 115 120 125
 Cys Phe Val Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg Thr Arg Leu Ala Ala Asp
 130 135 140
 Val Gly Lys Ser Gly Thr Glu Arg Glu Phe Arg Gly Leu Gly Asp Cys
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Ile Thr Lys Ser Asp Gly Ile Arg Gly Leu Tyr Gln Gly
 165 170 175
 Phe Ser Val Ser Val Gln Gly Ile Ile Ile Tyr Arg Ala Ala Tyr Phe


```

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 54
Gly Ser Pro Gly Ile Leu Met
1 5

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヒトANT1（「ANT1m」）、ヒトANT2（「ANT2m」）、およびヒトANT3（「ANT3m」）のコード領域のヌクレオチド配列を示す。

【図2】

図2は、ヒトANT1（「ANT1p」）、ヒトANT2（「ANT2p」）、およびヒトANT3（「ANT3p」）のポリペプチド配列を示す。

【図3】

図3は、ウエスタン分析によって決定される、E. coli中のHisタグ化XPRESS™エピトープ含有huANT3タンパク質の誘導を示す。

【図4】

図4は、ウエスタン分析によって決定される、E. coli中のHisタグ化XPRESS™エピトープ含有huANT3タンパク質の局在を示す。

【図5】

図5は、E. coli発現系におけるヒトANT3（huANT3）の発現を示す。

【図6】

図6は、バキュロウイルス感染Sf9細胞におけるhuANT3の発現を示す。

【図7】

図7は、ヒトシクロフィリンA（huCypA）のヌクレオチド配列（配列番号26）およびアミノ酸配列（配列番号27）を示す。

【図8】

図8は、ヒトシクロフィリンD (huCypD) のヌクレオチド配列 (配列番号39) およびアミノ酸配列 (配列番号40) を示す。

【図9】

図9は、ヒトANT3とヒトCypDとの間の相互作用を測定するアッセイの結果を示す。

【図10】

図10は、酵母発現系において検出されるhuANT3転写物のノーザンブロット分析を示す。レーン内容：レーン「M」、分子量マーカ (1.4、2.4、4.4、7.5および9.5キロベースのマーカの位置が示される)；レーン1~3、擬形質転換AAC⁻酵母の3つの独立単離物由来の10μgのRNA；レーン4~6、pMK5C (pYPGE2-huANT3) で形質転換されたAAC⁻酵母の3つの独立単離物由来の10μgのRNA；レーン7~9、pMK5B (pYESTrp2-huANT3) で形質転換されたAAC⁻酵母の3つの独立単離物由来の10μgのRNA；レーン10および11、ヒト脾臓のサンプルから調製される0.2μg (レーン10) および0.8μg (レーン11) のRNA。

【図11】

図11は、検出のために抗CypD抗体を使用して、huANT3含有T.ni細胞垂ミトコンドリア粒子に結合するGST-CypDの安定性のウエスタン免疫ブロット分析を示す。CsA、シクロスポリンA；s、上清；p、ペレット。

【図12】

図12は、GST-CypD融合タンパク質のロータマーゼ活性を示す。

【図13】

図13は、GST-CypおよびHis-CypD融合タンパク質、およびまたはCypD融合タンパク質のエントロキナーゼ (Ek) 切断に続いて回収される組換えCypDのロータマーゼ活性を示す。

【図14】

図14は、huANT3およびバクテリオロドプシンで再構築されるプロテオリポソームに結合するGST-CypDのウエスタン免疫プロット分析を示す。

【図15】

図15は、バクテリオロドプシン(BR PLS)またはhuANT3およびバクテリオロドプシン(ANT/BR)で再構成されるプロテオリポソームに結合するGST-CypDのウエスタン免疫プロット分析を示す。

【図 1 A】

ANT1m	ATGGTGGATCAGCCTGGAGTTCCTAAAGGACTTCTGCCGGGGCGGTGCGCGTCCCTCCTCAAGACGGCGGTGGC	80
ANT2m	ATGAGAGATGCCGCTGTGTCTTCGCCAAGGACTTCTGCGAGGTGGAGTGGCCGAGCCATCCTCAAGACGGCGGTAGC	80
ANT3m	ATGACGGAAACAGGOCATCTCTTCGCCAAGGACTTCTGGCCGAGGGCATGCGCCGCGCCATCCTCAAGACGGCGGTGGC	80
ANT1m	CCCCATCGAGAGGGTCAAACCTGCTGCTGCAGGTCCAGCATGCCAGCAAACAGATCAGTGTGAGAAAGCAGTACAAGGGA	160
ANT2m	CCCCATCGAGCGGGTCAAGCTGCTGCTGCAGGTCCAGCATGCCAGCAAAGCAGATCAGTGCAGATAAGCAATACAAGGCA	160
ANT3m	CCGATCGAGCGGGTCAAGCTGCTGCTGCAGGTCCAGCATGCCAGCAAAGCAGATCGCGCGGAGAAAGCAGTACAAGGGCA	160
ANT1m	TCATTGATTTGTGGTGGAGTCCCTAAGGAGCAGGGCTTCTCTCTCTCTGGAGGGGTAACCTGGCCAACTGATCCGT	240
ANT2m	TTATAGACTGCGTGGTCCGTATCCCAAGGAGCAGGGAGTTCTGTCTTCTGGCGGGTAACCTGGCCAACTGATCAGTA	240
ANT3m	TCTGACTGATTTGTCCGATCCCAAGGAGCAGGGGTGCTGTCTTCTGGAGGGGCAACCTGGCCAACTGATTCGC	240
ANT1m	TACTTCCCACCCCAAGCTCTCAACTTCGCCTTCAAGGATAAGTACAAGCAGTCTTCTTGGGGGTGGATCGGCATAA	320
ANT2m	TACTTCCCACCCAGCTCTTAACTTCGCCTTCAAGGATAAATACAAGCAGATCTTCTGGGTGGTGGACAGAGAAC	320
ANT3m	TACTTCCCACCTCAAGCTCTCAACTTCGCCTTCAAGGATAAGTACAAGCAGATCTTCTGGGGGGTGGACAAAGCAC	320
ANT1m	GCAGTTCTGGCGTACTTTGCTGGTAACTGGCTCCGGTGGCGGGGGCCACCTCCCTTGTCTTTGTATACCCGC	400
ANT2m	GCAGTTCTGGCTTACTTTGCAAGGAACTTGGCATCGGGTGGTCCCGAGGGGCCACTCCCTTGTCTTTGTGTACCCGC	400
ANT3m	GCAGTTCTGGAGTACTTTGCGGGCAACTTGGCTCCGGTGGTGGCGGGGGCACCTCCCTTGTCTTGTGTACCCGC	400
ANT1m	TGGATTTTGTAGGACAGGTGGCTGCTGATGTGGGAGGC--GCGCCAGCGTGAAGTTCATGGTCTGGCGACTGT	477
ANT2m	TTGATTTTGCCTTACCCCTCTAGCAGCTGATGTGGTAAAGGTGGAGTGAAGGGAAATCCGAGGCTTGGTGAAGTGC	480
ANT3m	TGGATTTTGCAGAACCCCTCTGGCAGCGAGTGGTAAAGTCAAGGACAGAGCCGAGTCCGAGGCTTGGTGAAGTGC	480
ANT1m	ATCATCAAGATCTCAAGTCTGATGGCTGAGGGGCTCTACCAGGGTTTCAAGTCTCTGTCCAGGCATCATATCTA	557
ANT2m	CTGGTAAGATCTACAAATCTGATGGATTAAGGGCTGTACCAAGGCTTTAACGTCTCTGTGCAGGGTATATCATCTA	560
ANT3m	CTGGTAAGATCAACAAGTGGAGGGCATCCGGGCTGTACCAAGGGCTTCAAGTCTCTGTGCAGGGCATCATCTA	560
ANT1m	TAGAGTGGCTACTTCGGAGTCTATGATACTGCCAAGGGATGCTGCCGACCCCAAGAACTGCACATTTTGTGAGCT	637
ANT2m	CCGAGCGGCTACTTCGGTATCTATGACTGCAAGGGAAATGCTTCGGATCCCAAGAACATCAGATCGTCAATGAGCT	660
ANT3m	CCGAGCGGCTACTTCGGGTATGATAGGCCAAGGGATGCTCCCGACCCCAAGAACACGCACATCGTGTGAGCT	640
ANT1m	GGATGATGGCCAGATGTGACGGGATGGAGGGGTGCTGCTACCCCTTTGACACTGTTCTGTCAGAAATGATGATG	717
ANT2m	GGATGATCGCACAGACTGTGATGGTGTGGCCGGTTGACTTCTTCCATTTGACACTGTTCCGCCCGCATGATGATG	720
ANT3m	GGATGATCGGCAGACTGTGACGGGCTGGCCGGCTGGTCTACCCCTTGCACAGGTGGCCCGCATGATGATG	720
ANT1m	CAGTCCGGCCGAAAGGGGGATATATGTACACGGGAAAGTTGACTGCTGGAGGAAGATTGCAAAAGACGAAGGAGG	797
ANT2m	CAGTCAAGGGCCAAAGGAATCTGACATCATGTACAGGGCAGGTTGACTGCTGGCGGAAGATTGCTGATGATGAGGAGG	800
ANT3m	CAGTCCGGGCCAAAGGAGCTGACATCATGTACACGGCACCGTGGACTGTTGGAGGAAGATCTTCAAGAGATGAGGGGG	800

Fig. 1A

【図 1 B】

ANT1m	CAAGGCCTTCTTCAAAGGTCGCTGGTCCAATGCTGAGAGGCATGGGGGGTCTTTGTATTGGTTTGTATGATGAGA	877
ANT2m	CAAGGCTTTTCAAGGGTGCATGGTCCAATGCTGAGAGGCATGGGGGGTCTTTGTCTTGTCTTGTATGATGAAA	880
ANT3m	CAAGGCCTTCTTCAAGGGTGGTCCAAGGTCCTGGGGGCATGGGGGGGCTTGGTCTGGTCTGTAGGAGGAGG	880
ANT1m	TCAAAAATATGTCTAA	894
ANT2m	TCAAGAAGTACACATAA	897
ANT3m	TCAAGAAGGTGATCTAA	897

Fig. 1B

【図 2】

hANT1p	MGDHWKFLKDFLAGVAAAVSKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQISAEKQ	50
hANT2p	MTDAWVSAKDFLAGGVAAAVSKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQ	50
hANT3p	MTECAVSAKDFLAGGITAAVSKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQ	50
hANT1p	YKGIIDCVVRIPEQGFVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFL	100
hANT2p	YKGIIDCVVRIPEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFL	100
hANT3p	YKGIIDCVVRIPEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFL	100
hANT1p	GGVDFHKKQFWRYFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVGRRA	149
hANT2p	GGVDFHKKQFWRYFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVGRKAGA	150
hANT3p	GGVDFHKKQFWRYFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVGRKSGT	150
hANT1p	EREFRGLGDCLIKIKKSDGIRGLYQGFNVSVQGI IYRAAYFGVYDTAKG	199
hANT2p	EREFRGLGDCLIKIKKSDGIRGLYQGFNVSVQGI IYRAAYFGVYDTAKG	200
hANT3p	EREFRGLGDCLIKIKKSDGIRGLYQGFNVSVQGI IYRAAYFGVYDTAKG	200
hANT1p	MLPDPKNVHIFVSWMIAQTVTAVAGLISYFPDTRRRMMMQSGRKGADIM	249
hANT2p	MLPDPKNTHIVISWMIAQTVTAVAGLISYFPDTRRRMMMQSGRKGADIM	250
hANT3p	MLPDPKNTHIVVSWMIAQTVTAVAGLISYFPDTRRRMMMQSGRKGADIM	250
hANT1p	YTGTVDCWRKIARDEGKAKAFFKGAWSNVL RGMGGAFVL VLYDEIKKYV	298
hANT2p	YTGTVDCWRKIARDEGKAKAFFKGAWSNVL RGMGGAFVL VLYDEIKKYT	299
hANT3p	YTGTVDCWRKIARDEGKAKAFFKGAWSNVL RGMGGAFVL VLYDEIKKVI	299

Fig. 2

【図 3】

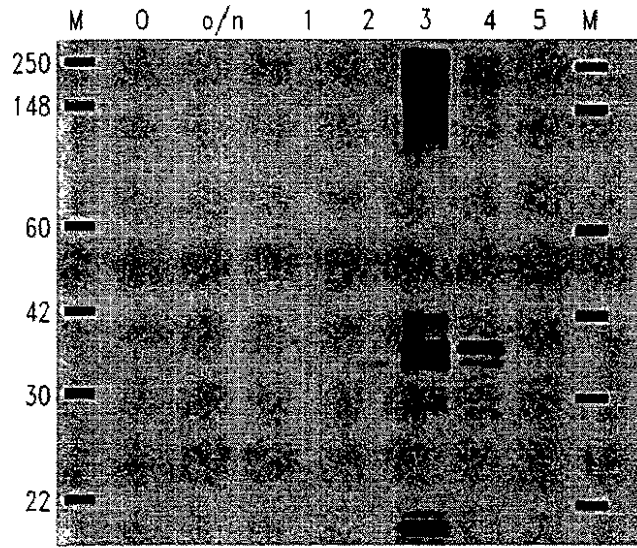


Fig. 3

【 4】

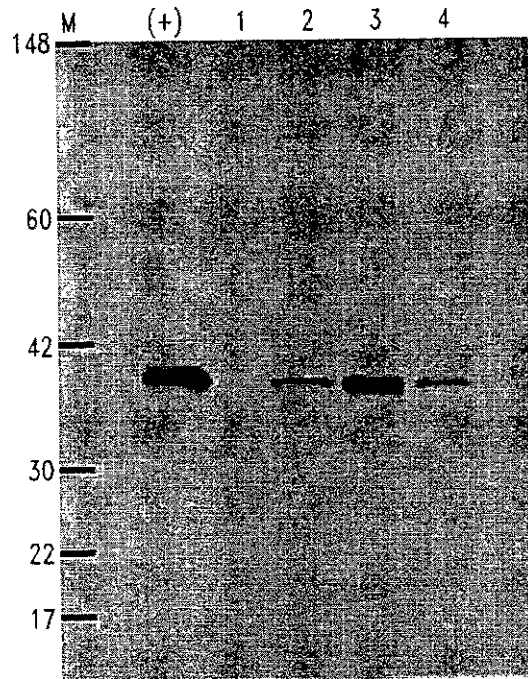


Fig. 4

【図5】

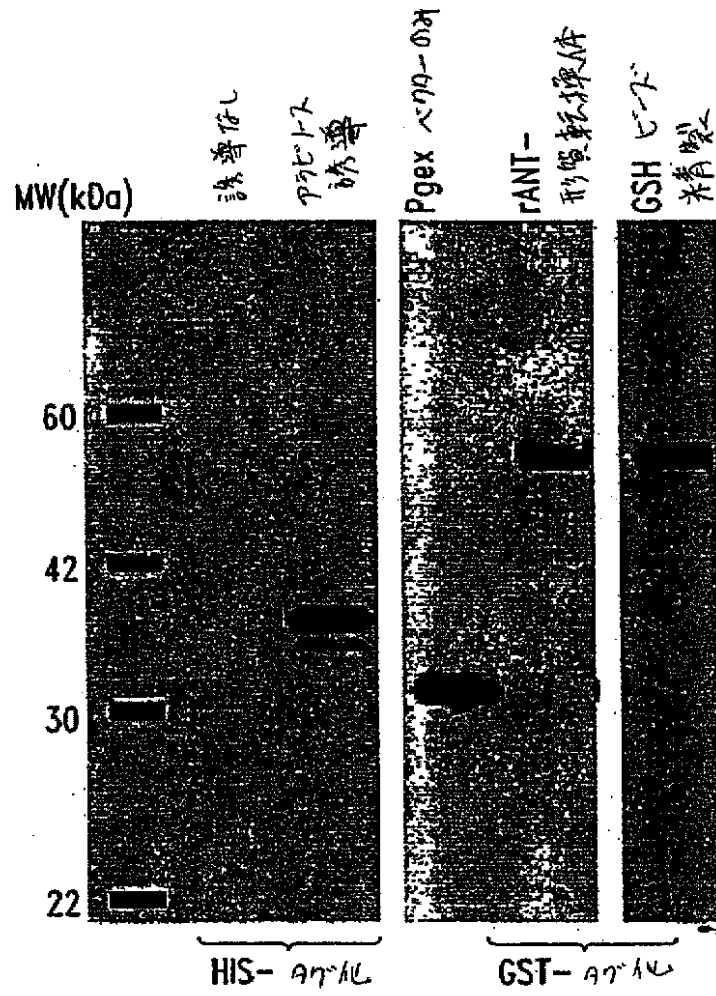


Fig. 5

【図6】

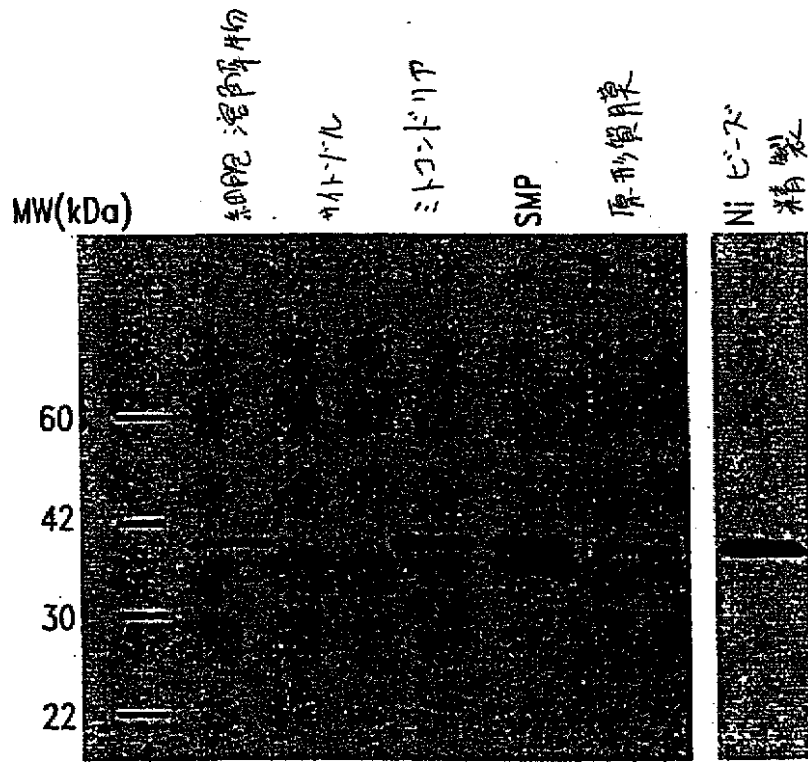


Fig. 6

【図 7】

ATGGTCAACCCACCGTGTCTTCGACATTGCCGTCGACGGCGAGCCCTTGGGCCGCGTCTCCTTTGAGC 70
 TACCAGTTGGGGTGGCACAAGAAGCTGTAACGGCAGCTGCCGCTCGGGAACCCGGCGCAGAGGAAACTCG
 M V N P T V F F D I A V D G E P L G R V S F E

TGTTTGCAGACAAGGTCCCAAAGACAGCAGAAAATTTTCGTGCTCTGAGCACTGGAGAGAAAGGATTTGG 140
 ACAAACGTCTGTTCCAGGGTTTCTGTCGTCTTTTAAAGCAGGAGACTCGTGACCTCTCTTTCTAAACC
 L F A D K V P K T A E N F R A L S T G E K G F G

TTATAAGGGTTCTGCTTTCACAGAATTATTCAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACTTCACACGCCAT 210
 AATATTCCCAAGGACGAAAGTGTCTTAATAAGGTCCCAAATACACAGTCCCACTGAAGTGTGCGGTA
 Y K G S C F H R I I P G F M C Q G G D F T R H

AATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCTATGGGGAGAAAATTTGAAGATGAGAACTTCATCCTAAAGCATACGG 280
 TTACCGTGACCACCGTTCAGGTAGATACCCCTCTTTAAACTTCTACTCTTGAAGTAGGATTTGATGCC
 N G T G G K S I Y G E K F E D E N F I L K H T

GTCCTGGCATCTTGTCCATGGCAAAATGCTGGACCCAACACAATGGTCCCAAGTTTTTCATCTGCACTGC 350
 CAGGACCGTAGAACAGGTACCGTTTACGACCTGGGTTGTGTTTACCAAGGGTCAAAAAGTAGACGTGACG
 G P G I L S M A N A G P N T N G S Q F F I C T A

CAAGACTGAGTGGTGGATGGCAAGCATGTGGTGTGGCAAAGTGAAGAAGGCATGAATATTGTGGAG 420
 GTTCTGACTCACCACCTACCGTTTCGTACACCACAACCGTTTCACTTTCTTCCGACTTATAACACCTC
 K T E W L D G K H V V F G K V K E G M N I V E

GCCATGGAGCGCTTTGGGTCCAGGAATGGCAAGACCAGCAAGAAGATCACCATTGCTGACTGTGGACAAC 490
 CGGTACCTCGCGAAACCCAGGTCTTACCGTTCTGGTCTTCTTAGTGGTAACGACTGACACCTGTTG
 A M E R F G S R N G K T S K K I T I A D C G Q
 TCGAATAA 498
 AGCTTATT
 L E .

Fig. 7

【図 8】

ATGGTCAACCCACCGTGTCTTCGACATTGCCGTCGACGGCGAGCCCTTGGGCCGCGTCTCCTTTGAGC 70
 TACCAGTTGGGGTGGCACAAGAAGCTGTAACGGCAGCTGCCGCTCGGGAACCCGGCGCAGAGGAAACTCG
 M V N P T V F F D I A V D G E P L G R V S F E

 TGTTTGCAGACAAGGTCCCAAAGACAGCAGAAAATTTTCGTGETCTGAGCACTGGAGAGAAAGGATTTGG 140
 ACAACGCTCTGTTCCAGGGTTTCTGTCGTCTTTTAAAGCAGGAGACTCGTGACCTCTCTTTCTAAACC
 L F A D K V P K T A E N F R A L S T G E K G F G

 TTATAAGGGTCTCTGCTTTACAGAATTATCCAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACTTCACACGCCAT 210
 AATATCCCAAGGACGAAAGTGTCTTAATAAGGTCCCAAATACACAGTCCCACTGAAGTGTGCGGTA
 Y K G S C F H R I I P G F M C Q G G D F T R H

 AATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCTATGGGGAGAAAATTTGAAGATGAGAAGTTCATCCTAAAGCATAACGG 280
 TTACCGTGACCACCGTTCCAGGTAGATACCCCTCTTAAACTTCTACTCTTGAAGTAGGATTTCTGATGCC
 N G T G G K S I Y G E K F E D E N F I L K H T

 GTCCTGGCATCTTGTCCATGGCAAATGCTGGACCCAACACAATGGTTCACAGTTTTTCATCTGCACCTGC 350
 CAGGACCGTAGAACAGGTACCGTTTACGACCTGGGTTGTGTTTACCAAGGGTCAAAAAGTAGACGTGACG
 G P G I L S M A N A G P N T N G S Q F F I C T A

 CAAGACTGAGTGGTTGGATGGCAAGCATGTGGTGTGGCAAAGTGAAGAAGGCATGAATATTGTGGAG 420
 GTTCTGACTACCAACTACCGTTTCGTACACCACAACCGTTTCACTTTCTCCGTAATTATAACACCTC
 K T E W L D G K H V V F G K V K E G M N I V E

 GCCATGGAGCGCTTTGGGTCCAGGAATGGCAAGACCAGCAAGAAGATCACCATTGCTGACTGTGGACAAC 490
 CGGTACCTCGCGAAACCCAGGTCCCTTACCGTTCTGGTCTGTTCTTAGTGGTAACGACTGACACCTGTTG
 A M E R F G S R N G K T S K K I T I A D C G Q
 TCGAATAA 498
 AGCTTATT
 L E

Fig. 8

【図 9】

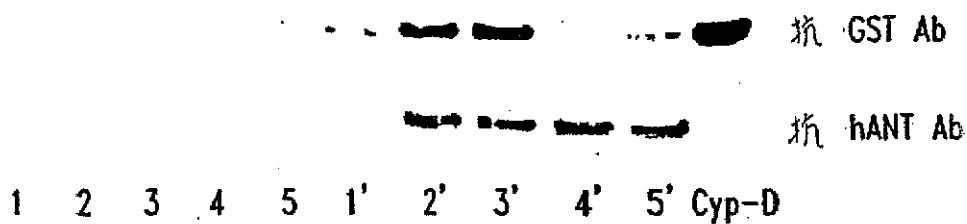


Fig. 9

【図10】

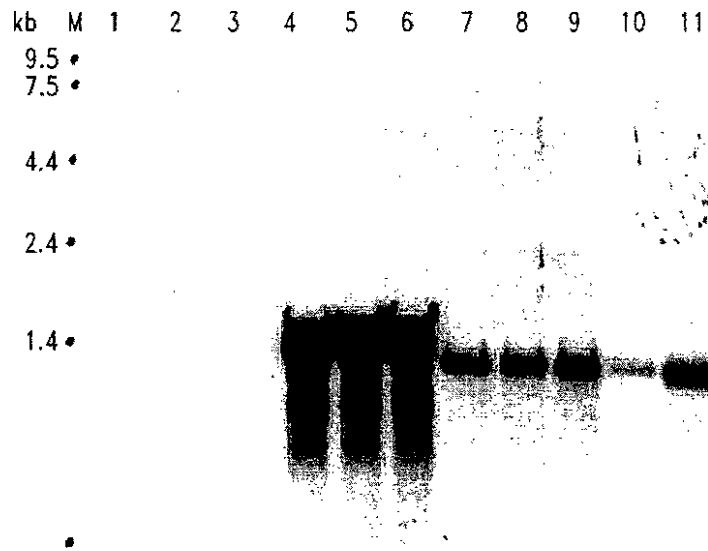


Fig. 10

【図11】

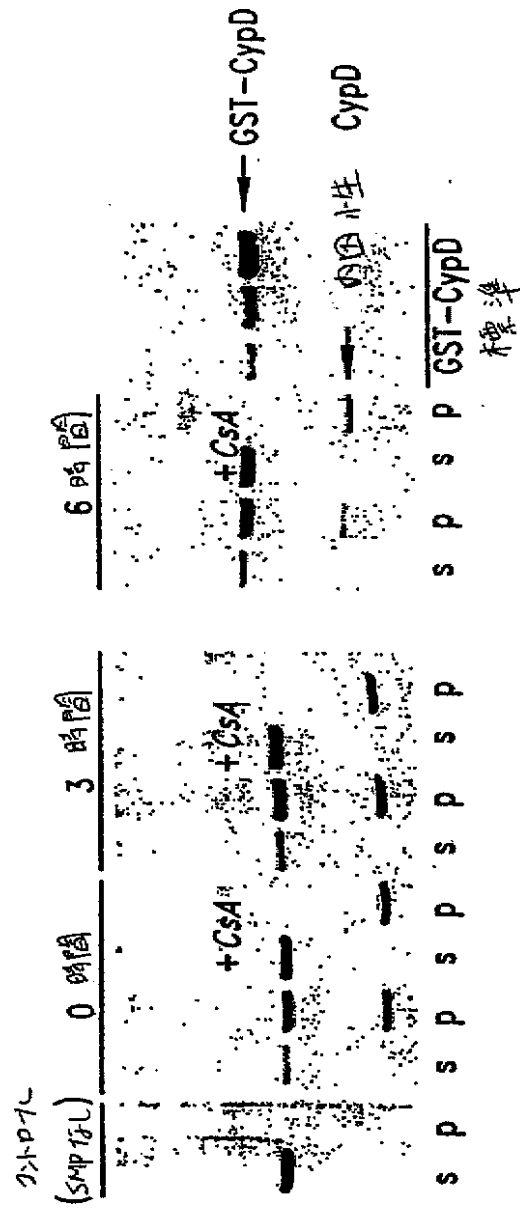


Fig. 11

【图 12】

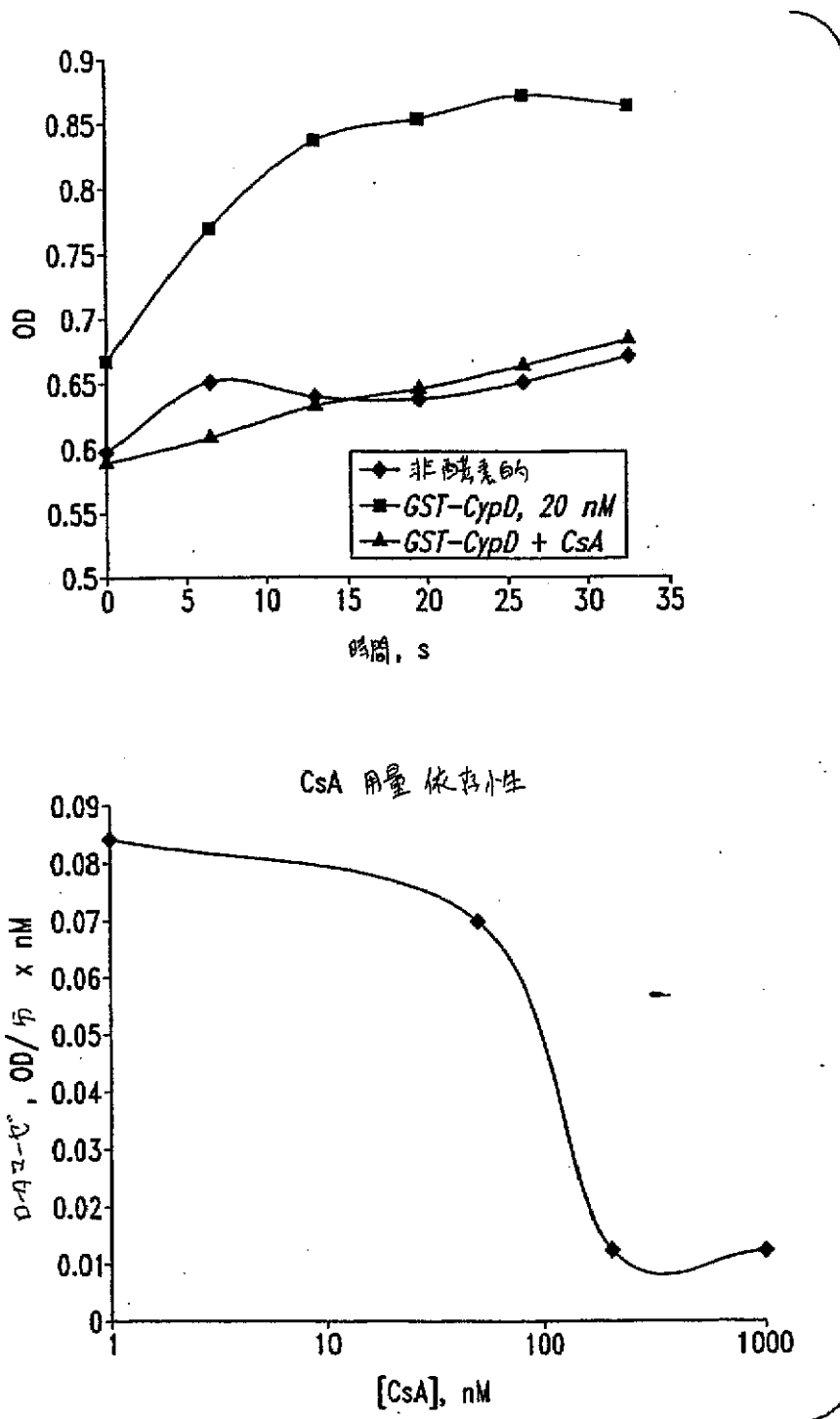


Fig. 12

【図13】

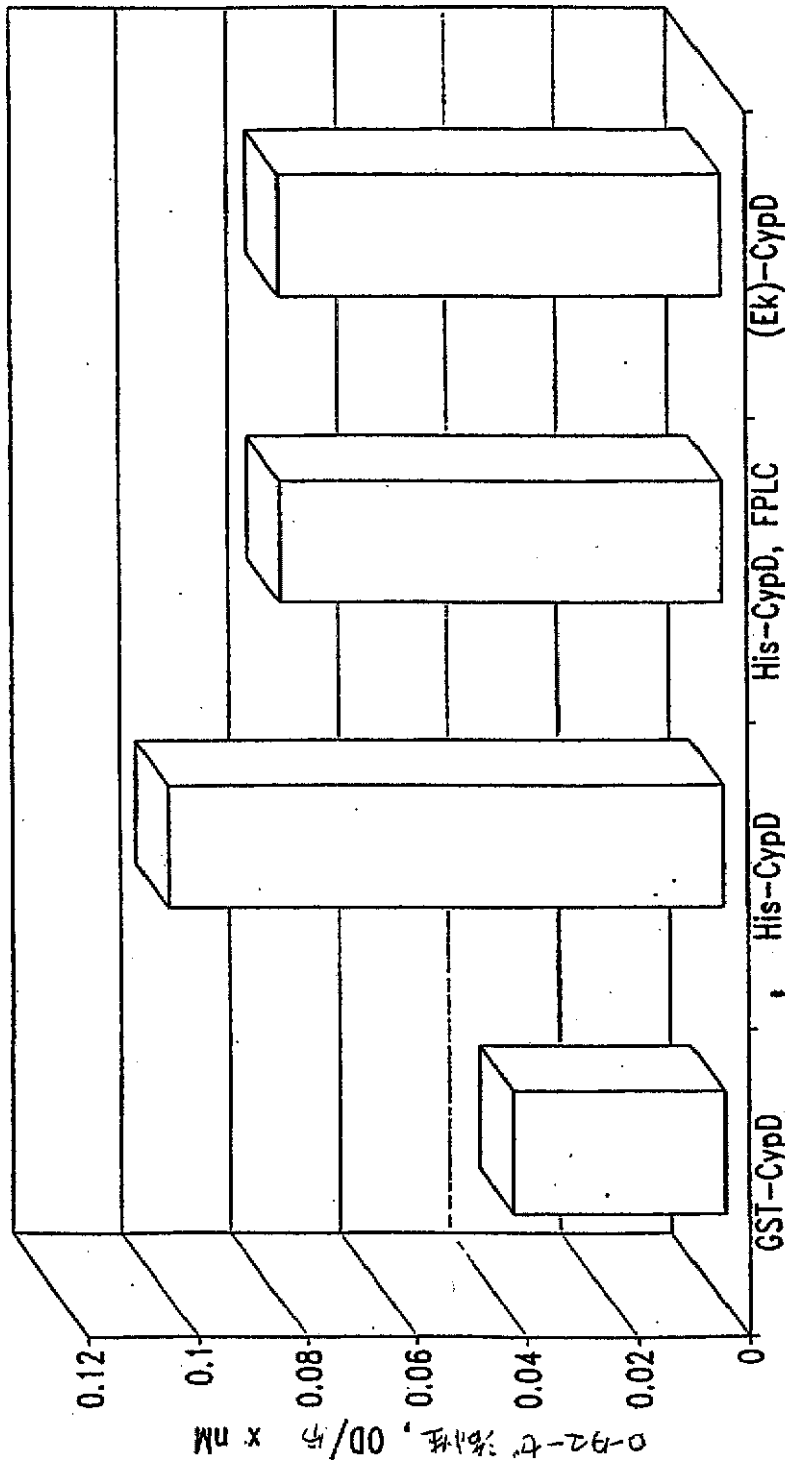


Fig. 13

【図14】

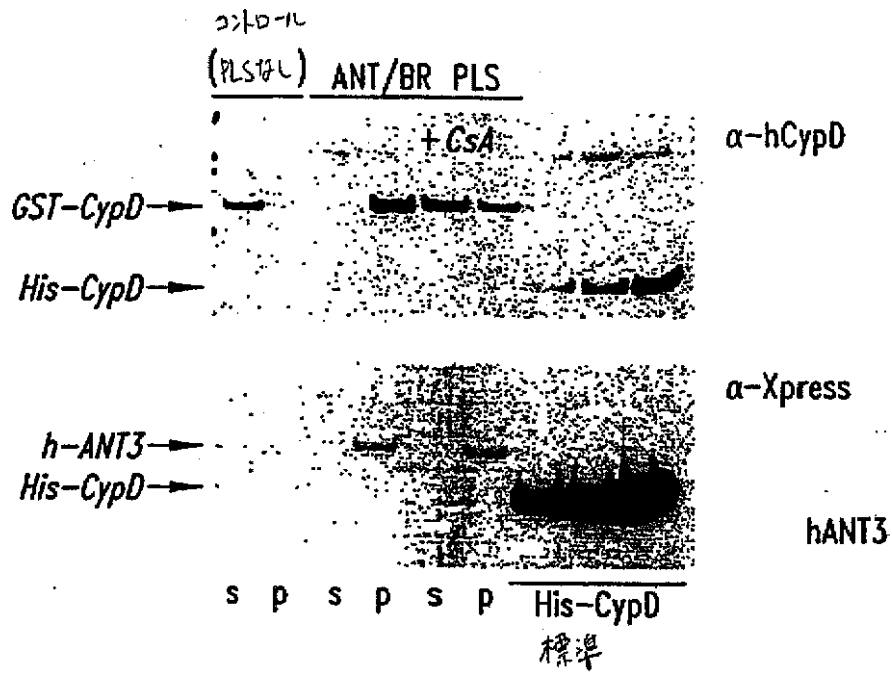


Fig. 14

【図15】

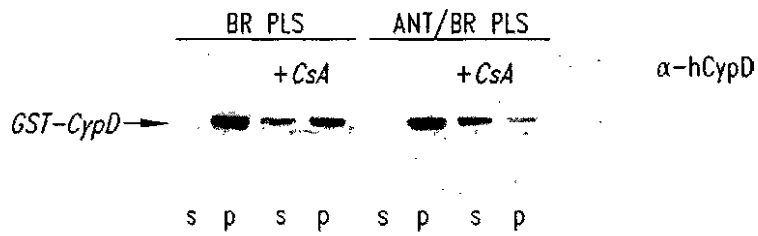


Fig. 15

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/30535
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C12N1/21 G01N33/533	C12N15/61 C07K14/47 G01N33/533
	C12N15/62 C07K14/435	C12N9/90 G01N33/50
		C12N5/10 G01N33/68
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)		
IPC 7	C12N	C07K G01N
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 practical, search terms used)		
WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 26370 A (ANDERSON CHRISTEN M ;CLEVINGER WILLIAM (US); WILEY SANDRA EILEEN) 11 May 2000 (2000-05-11) page 93, line 5 -page 97, line 12 ---	1-3, 8, 10-16, 68-70, 75-78, 81
X	SAITO TAKESHI ET AL: "Expression of a gene for cyclophilin which contains an amino-terminal endoplasmic reticulum-targeting signal." PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 40, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 77-87, XPO01001123 ISSN: 0032-0781 the whole document --- -/-	5, 8, 11-13, 18-22, 72-78
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 *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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 May 2001		14/05/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/30535

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WOODFIELD KUEI ET AL: "Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 336, no. 2, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 287-290, XP002163952 ISSN: 0264-6021 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>HALESTRAP ANDREW P ET AL: "Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1366, no. 1-2, 10 August 1998 (1998-08-10), pages 79-94, XP000990683 ISSN: 0006-3002 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>CROMPTON MARTIN ET AL: "Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 258, no. 2, December 1998 (1998-12), pages 729-735, XP002163953 ISSN: 0014-2956 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 62-67

Claim 62-67 refer to an agent altering the mitochondrial permeability transition, respectively a method for altering survival of the cell and/or a method for altering mitochondrial permeability transition by using such an agent without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.I(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/30535

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0026370 A	11-05-2000	AU 2472900 A	22-05-2000
		EP 1049780 A	08-11-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 P	21/02	C 4 H 0 4 5
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50			M
	33/53		33/566	
		C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566		5/00	B

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F
 , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,
 M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G
 M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z
 , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z ,
 M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M ,
 A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B
 Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K
 , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E ,
 G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J
 P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R
 , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K ,
 M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R
 O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J
 , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z ,
 V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 ウィリー, サンドラ イー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122,
 サン ディエゴ, ギャロウェイ ドラ
 イブ 3195

(72)発明者 アンドレイェフ, アレクサンドル ワ
 イ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92128,
 サン ディエゴ, カミニト ピネロ
 179, アパートメント 163

(72)発明者 フライゲリ, ルチアーノ ジー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122,
 サン ディエゴ, ハッキングズ ウェイ
 4669

(72)発明者 ベリセレピ, ゴヌル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130,
 サン ディエゴ, タランテラ レーン
 4688

(72)発明者 デイビス, ロバート イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130,
サン ディエゴ, グレンクリフ ウェ
イ 13272

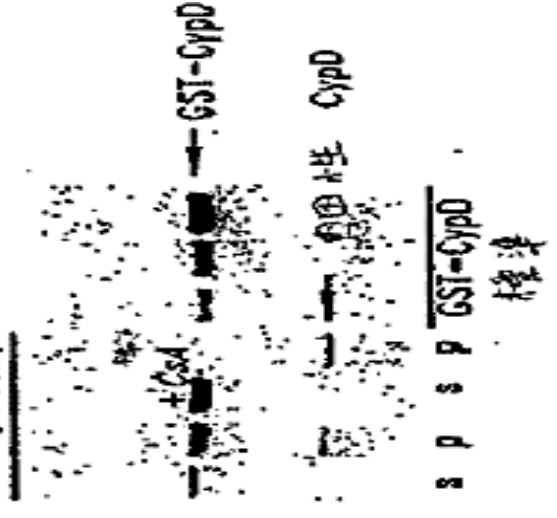
F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36
4B024 AA01 BA80 CA04 DA02 DA03
DA06 DA12 FA15 HA17
4B063 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR74
QR82 QX02
4B064 AG01 BH09 CA19 CC24 CE02
CE09 CE12 DA01
4B065 AA93Y AB01 CA24 CA44
4H045 AA10 AA20 BA10 BA41 BA60
CA45 EA20 FA74

专利名称(译)	线粒体组分相互作用和组合物的测定以及鉴定改变这种相互作用的试剂的方法		
公开(公告)号	JP2003516128A	公开(公告)日	2003-05-13
申请号	JP2001535558	申请日	2000-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	Maitoko		
申请(专利权)人(译)	Maitoko		
[标]发明人	マーフィーアンエヌ クレベンガーウィリアム ウィリーサンドライー アンドレイエフアレクサンドルワイ フライゲリルチアーノジー ベリセレビゴヌル デイビスロバートイー		
发明人	マーフィー, アン エヌ. クレベンガー, ウィリアム ウィリー, サンドラ イー. アンドレイエフ, アレクサンドル ワイ. フライゲリ, ルチアーノ ジー. ベリセレビ, ゴヌル デイビス, ロバート イー.		
IPC分类号	C07K14/435 C07K14/47 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/90 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/61 C12N15/62 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/ /542 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/5079 C07K14/43595 C07K2319/00 C07K2319/21 C07K2319/23 C07K2319/50 C07K2319/60 C12N9/90 C12N15/62 G01N33/542		
FI分类号	C07K14/47 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/ /50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024 /AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/FA15 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR74 4B063/QR82 4B063 /QX02 4B064/AG01 4B064/BH09 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE09 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/BA60 4H045/CA45 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	09/434354 1999-11-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于鉴定改变线粒体膜通透性变化的试剂的组合物和方法。筛选方法通常会识别可改变线粒体腺嘌呤核苷酸转运蛋白和亲环蛋白D相互作用的物质。此类试剂可用于例如治疗与线粒体功能改变有关的各种疾病。一方面,本发明还是核酸表达构建体,其中所述构建体是编码与另外的多肽或其变体融合的改变线粒体通透性的孔组分多肽或其变体的多核苷酸。提供了一种核酸构建体,其包含核苷酸和可操作地连接至多核苷酸的表达控制序列。

6 1/2 1/2



S P P GST-CypD

CypD