

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3851819号
(P3851819)

(45) 発行日 平成18年11月29日(2006.11.29)

(24) 登録日 平成18年9月8日(2006.9.8)

(51) Int.Cl.	F I	
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	Z N A A
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	A
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15	Z
請求項の数 12 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-550259 (P2001-550259)	(73) 特許権者	500039463
(86) (22) 出願日	平成13年1月5日(2001.1.5)		ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバ
(65) 公表番号	特表2003-518943 (P2003-518943A)		ーシテイ・オブ・テキサス・システム
(43) 公表日	平成15年6月17日(2003.6.17)		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/000321		オースティン、ウエスト・セブンス・スト
(87) 国際公開番号	W02001/049719		リート・201
(87) 国際公開日	平成13年7月12日(2001.7.12)	(74) 代理人	100109726
審査請求日	平成14年7月8日(2002.7.8)		弁理士 園田 吉隆
(31) 優先権主張番号	09/479,309	(74) 代理人	100101199
(32) 優先日	平成12年1月6日(2000.1.6)		弁理士 小林 義敦
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カスパーゼの活性化因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)又は(b)の単離されたポリペプチド:

(a) 配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列を持つポリペプチド、及び

(b) (a) のポリペプチドにおいて、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは挿入されたアミノ酸配列を持ち、該ポリペプチドが外因性の ATP 無しでカスパーゼ3 を活性化し、そのミトコンドリアからサイトゾルへの移行によってアポトーシスのマーカーを提供する S m a c (第2のミトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子) であるポリペプチド。

【請求項2】

以下の(a)又は(b)の単離されたポリペプチド:

(a) 配列番号: 2 のアミノ酸 5 6 - 2 1 7 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び

(b) (a) のポリペプチドにおいて、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは挿入されたアミノ酸配列を持ち、該ポリペプチドが外因性の ATP 無しでカスパーゼ3 を活性化し、そのミトコンドリアからサイトゾルへの移行によってアポトーシスのマーカーを提供する S m a c (第2のミトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子) であるポリペプチド。

【請求項3】

配列番号: 2 の残基 1 - 8 ; 配列番号: 2 の残基 4 - 1 3 ; 配列番号: 2 の残基 7 - 1

10

20

7 ; 配列番号 : 2 の残基 1 3 - 2 4 ; 配列番号 : 2 の残基 1 8 - 2 7 ; 配列番号 : 2 の残基 3 5 - 4 9 ; 配列番号 : 2 の残基 4 7 - 5 4 ; 配列番号 : 2 の残基 7 1 - 7 8 ; 配列番号 : 2 の残基 8 3 - 9 2 ; 配列番号 : 2 の残基 1 1 5 - 1 2 4 ; 配列番号 : 2 の残基 1 4 1 - 1 4 8 ; 配列番号 : 2 の残基 1 6 6 - 1 7 4 ; 配列番号 : 2 の残基 1 7 6 - 1 8 4 ; 配列番号 : 2 の残基 1 8 3 - 1 9 1 ; 配列番号 : 2 の残基 1 9 2 - 2 0 0 ; 配列番号 : 2 の残基 2 0 1 - 2 0 8 ; 配列番号 : 2 の残基 2 0 9 - 2 1 6 ; 配列番号 : 2 の残基 2 1 5 - 2 2 2 ; 配列番号 : 2 の残基 2 2 3 - 2 3 1 ; 及び配列番号 : 2 の残基 2 3 2 - 2 3 9 からなる群から選択されるポリペプチド、かつ該ポリペプチドが外因性の A T P 無しでカスパーゼ 3 を活性化し、そのミトコンドリアからサイトゾルへの移行によってアポトーシスのマーカーを提供する S m a c (第 2 のミトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子) に 10
対して特異的な抗体を誘発するポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 に記載のポリペプチドをコードする組換え体ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号 : 1 のヌクレオチド 1 - 2 3 4 又は配列番号 : 1 のヌクレオチド 5 2 5 - 7 2 0、どちらかの逆相補鎖、又は少なくとも長さ 2 4 ヌクレオチドのいずれかの断片からなる組換え体ポリヌクレオチドであって、特異的に S m a c タンパク質コード化 c D N A (配列番号 : 1) とハイブリダイズするポリヌクレオチドで、S m a c タンパク質が外因性の A T P 無しでカスパーゼ 3 を活性化し、そのミトコンドリアからサイトゾルへの移行によってアポトーシスのマーカーを提供する、組換え体ポリヌクレオチドからなるプローブ。 20

【請求項 6】

断片が少なくとも長さ 3 6 ヌクレオチドである請求項 5 に記載のポリヌクレオチドからなるプローブ。

【請求項 7】

断片が、：配列番号 : 1 のヌクレオチド 1 - 2 4 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 1 8 - 4 2 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 4 5 - 6 9 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 7 5 - 9 2 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 1 1 6 - 1 4 1 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 1 6 6 - 1 9 9 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 2 1 1 - 2 3 4 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 5 2 5 - 5 4 8 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 5 7 5 - 5 9 8 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 6 2 4 - 6 4 8 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 6 4 4 - 6 6 9 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 6 4 9 - 6 7 2 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 6 5 4 - 6 7 7 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 6 6 5 - 6 8 8 ; 配列番号 : 1 のヌクレオチド 6 8 7 - 7 1 0 ; 及び配列番号 : 1 のヌクレオチド 6 9 7 - 7 2 0 からなる群から選択される請求項 5 に記載のポリヌクレオチドからなるプローブ。 30

【請求項 8】

配列番号 : 1 のヌクレオチド 1 6 6 - 6 5 1 からなる請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 1 ないし 3 に記載のポリペプチドと特異的に結合する相補性決定領域 (C D R) 配列を含んで成る抗体。 40

【請求項 10】

請求項 1 ないし 3 に記載のポリペプチド : 又は

請求項 4 ないし 8 に記載のポリヌクレオチド又はプローブ :

の配列を検出するステップを含んでなる、特異的な抗体又はポリヌクレオチドプローブを用いて特異的ポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列を検出する方法であって、前記配列が S m a c タンパク質又は S m a c タンパク質をコードする c D N A であり、S m a c タンパク質が外因性の A T P 無しでカスパーゼ 3 を活性化し、そのミトコンドリアからサイトゾルへの移行によってアポトーシスのマーカーを提供する S m a c タンパク質をコードする、特異的ポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列を検出する方法。

【請求項 11】

配列番号：2の残基1-78、又は配列番号：2の残基176-239、又は少なくとも長さ8アミノ酸のどちらかの断片の少なくとも一つを含んで成るポリペプチド；又は

配列番号：1のヌクレオチド1-234、又は配列番号：1のヌクレオチド525-720、どちらかの逆相補鎖、又は少なくとも長さ24ヌクレオチドのいずれかの断片の少なくとも一つを含んで成るポリヌクレオチド；

を検出するステップを含んでなる、特異的ポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列を検出することを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

請求項1ないし3に記載のポリペプチドの結合を調節する薬剤をスクリーニングする方法であって、前記方法が：

請求項1ないし3に記載の単離されたポリペプチドと、前記ポリペプチドの結合標的と、候補薬剤を含んで成る混合物を、前記薬剤が存在しなければ前記ポリペプチドが基準親和性で前記結合標的と特異的に結合する条件下でインキュベートし；

薬剤偏向親和性を決定する前記ポリペプチドと前記結合標的との結合親和性を検出するステップを含んで成り、

薬剤偏向親和性と基準親和性との間の差が、前記薬剤が前記結合標的への前記ポリペプチドの結合を調節することを示す方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

当該出願において実施された研究は、国立予防衛生研究所からの助成金（G M R O 1 - 5 7 1 5 8）により一部援助を受けた。政府は当該発明における権利を有し得る。

【0002】

（序論）

発明の分野

本発明の分野は細胞のアポトーシスに關与する酵素の制御因子である。

背景

アポトーシスに關する重要な制御ステップの一つは、カスパーゼの活性化で、クロマチンの凝縮、ヌクレオソーム断片へのDNAの断片化、核膜崩壊、ホスファチジルセリンの外表面化及び直ちに貪食されるアポトーシス小体の形成を含む、アポトーシス細胞に關連する特徴的な形態学的変化を導く（Liu等，1997 Cell 89, 175-184；Enari等，1998 Nature 391, 43-50；Sahara等，1999 Nature 401, 168-173；Lazebnik等，1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9042-9046；Martin等，1996 J. Biol. Chem. 271, 28753-28756；Zhang等，1999 J. Cell Biol. 145, 99-108）。

ある主要なアポトーシスカスパーゼ活性化カスケードは、普段はミトコンドリアにおける電子伝達系で機能するタンパク質であるチトクロームcによって誘発される（Liu等，1996 Cell 86, 147-157）。生細胞中では、ホロチトクロームcがミトコンドリアの膜間腔中に排他的に存在し、その結果、サイトゾルにおける致命的（deadly）な相手である、Apaf-1（Zou等，1997 Cell 90, 405-413）から隔離されている。血清の欠乏、細胞表面の死受容体の活性化、及びDNAの過剰なダメージなどのアポトーシス刺激を受けると、ミトコンドリア外膜はチトクロームcに対して透過性となる（Reed，1997 Cell 91, 559-562で総説されている）。サイトゾルへ放出されると、チトクロームcは、Apaf-1と2：1のストイキオメトリーで結合し、dATP又はATPの存在下でオリゴマーのApaf-1/チトクロームc複合体を形成する（Purring等，1999 J. American Chem. Soc. 121, 7435-7436；Zou等，1999 J. Biol. Chem. 274, 11549-11556）。このオリゴマー化したApaf-1/チトクロームc複合体は、その後、この経路の先端のカスパーゼであるプロカスパーゼ-9を補充し、活性化する（Li等，1997 Cell 91, 479-489；Zou等，1999）。次にカスパーゼ-9は、アポトーシス細胞における主要なカスパーゼ活性を構成するカスパーゼ-3，-6及び-7などの下流のカスパーゼを活性化する（Li等，1997；Srinivasa等，1998 Mol. Cell 1, 949-957；Faleiro等，1997 EMBO J. 16, 2271-2281）。

。

10

20

30

40

50

【0003】

ここに、チトクローム c / A p a f - 1 依存的カスパーゼの活性化を促進する新規因子の同定、精製、分子クローニング及び性質決定を開示する。チトクローム c の様に、本タンパク質は普段はミトコンドリア中に位置し、細胞がアポトーシスを起こすとサイトゾルへ放出される。チトクローム c 後の第二のミトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子 (the second mitochondria-derived activator of caspase) という理由で、本タンパク質を S m a c と名付けた。S m a c をサイトゾル抽出物へ添加すると d A T P の添加無しでも抽出物中における強いカスパーゼの活性化を引き起こす。また、S m a c はカリウム塩の生理的レベルでの存在下においてもカスパーゼの活性化を可能にする。

【0004】

10

(本発明の概要)

本発明は 細胞のアポトーシスに関与する酵素、特にカスパーゼのポリペプチド制御因子 (活性化因子及び阻害因子) に関する方法及び組成物を提供する。特別な態様において、本発明はカスパーゼ活性化因子のポリペプチド及びポリヌクレオチド配列診断を提供する。これらの配列及びこれらの配列を具体化するポリペプチド及びポリヌクレオチドは、活性化因子又はカスパーゼ又はこのような活性化因子をコードする遺伝子又は転写物の発現及び / 又は機能を検出及び / 又は調節することに関与する広範な診断上及び治療上の用途を見いだす。さらに特別な態様において、本発明はカスパーゼの活性化因子に特異的な遺伝学的及び免疫学的プローブを提供する。

アポトーシスの好ましくない活性又は不活性化は、癌、自己免疫疾患及び神経変性疾患などの多くのヒトの疾患に関連しているため、ここで開示されるカスパーゼ制御ポリペプチド及びポリヌクレオチドは、アポトーシスを促進又は阻害する薬剤標的及び制御因子の両方を提供する。また、開示される天然の S m a c タンパク質は、元来、アポトーシスの最中にミトコンドリアからサイトゾルへ移行するため、S m a c タンパク質は、例えば、融合タンパク質などの標識化 S m a c 又は検出可能な S m a c 特異的な結合薬剤を用いることで、正常又は疾病段階でのアポトーシスに対する診断マーカーとして使用され得る。

20

【0005】

(本発明の特定の実施態様の詳細な説明)

以下に示す特定の実施態様及び実施例の説明は例示的な方法で提供され、限定されるものではない。他に禁忌を示すか又は注記しな限り、ここでの説明及び本明細書全体を通じて、「ア (a) 」及び「アン (a n) 」なる用語は、一又は複数を意味し、「オア (o r) 」なる用語は、及び / 又はを意味し、ポリヌクレオチド配列は、反対側の鎖並びにここで記述される選択的バックボーンまで包含すると理解される。

30

対象のポリペプチド配列は多種多様な適用を見いだす。一実施態様において、対象の配列は、プロテオミックマイクロアレイでの使用 (例えば、Silzel JW, 等 Clin Chem 1998 Sep; 44(9):2036-43) 、合理的薬剤デザインのモデル、抗体誘発の為に抗原などを含む多くの適用を順次提供するポリペプチドを合成するために使用される。また、ポリペプチド配列は、配列番号 : 2、又はその断片、特に、配列番号 : 2、残基 1 - 78 又は配列番号 : 2、残基 176 - 239 又はこれらの断片又はこのような配列を含むポリペプチドのうち少なくとも一つを含んで成る配列を特異的に検出するためにも使用される。如何なる簡便な配列検出方法も使用可能で、直接的配列検出のためのコンピューターを利用した方法 (例えば、BLAST型アルゴリズム、アライメントなど) 及びポリマーの推定配列検出のための物理的方法 (例えば、質量分光法など) を含む。

40

また、直接的な合成に加えて、対象のポリペプチドは対応する親ポリヌクレオチド、又は縮重オリゴヌクレオチドプライマー及び対象のポリペプチド配列から創出された (“ G C G ” ソフトウェア、Genetics Computer Group, Inc, Madison WI) プローブを用いて単離された天然コード化ポリヌクレオチド、又はコンピューターアルゴリズムに従って対象のポリペプチドを逆翻訳 (back-translating) することにより作成される選択された発現系に最適化されたポリヌクレオチド (例えば、Holler 等 (1993) Gene 136, 323-328 ; Martin 等 (1995) Gene 154, 150-166) などのコード化ポリヌクレオチドから細胞及び無細胞

50

系で発現させることもできる（例えば、Jermutus L,等, Curr Opin Biotechnol. 1998 Oct;9(5):534-48）。

【 0 0 0 6 】

対象のポリペプチドは S m a c 特異的なアミノ酸配列、結合特異性又は機能を有する列挙される配列の断片を含む。好ましい断片は、配列番号： 2、特に、少なくとも配列番号： 2、残基 1 - 7 8 又は配列番号： 2、残基 1 7 6 - 2 3 9 の少なくとも 8、好ましくは少なくとも 1 0、好ましくは少なくとも 1 5、より好ましくは少なくとも 2 5、より好ましくは少なくとも 3 5、最も好ましくは少なくとも 5 0 の連続した残基を含み、対応ペプチド特異的抗体結合、誘発、又は結合もしくは誘発阻害活性を持つ。

特異的活性又は機能は、インヴィトロにおける簡便な細胞ベースの又はインヴィボにおけるアッセイなどによって決定される：例えば、インヴィトロ結合アッセイなど。結合アッセイは、結合標的と対象ポリペプチドとの分子相互作用が評価される如何なるアッセイも包含する。結合標的は制御タンパク質などの天然結合標的、又は抗体などの特異的免疫タンパク質、又は後述するスクリーニングアッセイにおいて同定されるような特異的薬剤などの非天然結合標的であってもよい。異種性宿主（例えば、齧歯類又はウサギ）などにおいて特異的抗体を誘発するために、結合特異性は、結合平衡定数（通常、少なくとも約 10^7 M^{-1} 、好ましくは少なくとも約 10^8 M^{-1} 、さらに好ましくは少なくとも約 10^9 M^{-1} ）、カスパーゼの活性化又はアポトーシスアッセイ、対象ポリペプチドが発現細胞内でネガティブ突然変異として機能する能力によってアッセイされる。特別の実施態様において、特にキャリアタンパク質に結合される場合、対象のポリペプチド断片は、特異的な抗原及び/又は免疫原を提供する。例えば、ペプチドはキーホールリンペット抗原（K L H）と共有結合的に接合され、接合体は完全フロイトアジュバント中にエマルジョン化される。実験用ウサギは定法に従って免疫化され飼育される。特異的抗体の存在は、固定化された対応ペプチドを用いて固相免疫吸着アッセイによってアッセイされる、例えば、表 1 を参照のこと。

【 0 0 0 7 】

表 1 . 特異的ウサギポリクローナル抗体を誘発する免疫原性 S m a c ポリペプチド：ポリペプチド - K L H 接合体は上述の方法により免疫化された。

ポリペプチド配列	免疫原性
配列番号： 2、残基 1 - 8	+++
配列番号： 2、残基 4 - 1 3	+++
配列番号： 2、残基 7 - 1 7	+++
配列番号： 2、残基 1 3 - 2 4	+++
配列番号： 2、残基 1 8 - 2 7	+++
配列番号： 2、残基 3 5 - 4 9	+++
配列番号： 2、残基 4 7 - 5 4	+++
配列番号： 2、残基 7 1 - 7 8	+++
配列番号： 2、残基 8 3 - 9 2	+++
配列番号： 2、残基 1 1 5 - 1 2 4	+++
配列番号： 2、残基 1 4 1 - 1 4 8	+++
配列番号： 2、残基 1 6 6 - 1 7 4	+++
配列番号： 2、残基 1 7 6 - 1 8 4	+++
配列番号： 2、残基 1 8 3 - 1 9 1	+++
配列番号： 2、残基 1 9 2 - 2 0 0	+++
配列番号： 2、残基 2 0 1 - 2 0 8	+++
配列番号： 2、残基 2 0 9 - 2 1 6	+++
配列番号： 2、残基 2 1 5 - 2 2 2	+++
配列番号： 2、残基 2 2 3 - 2 3 1	+++
配列番号： 2、残基 2 3 2 - 2 3 9	+++

【 0 0 0 8 】

対象のポリペプチド及びその断片は単離され又は純粹である：「単離された」ポリペプチドは天然の状態で付随する物質の少なくとも幾つかを伴わず、好ましくは所定のサンプル中の全ポリペプチド重量の少なくとも 0.5%、及びより好ましくは少なくとも約 5% を構成し、純粹ポリペプチドは所定のサンプル中の全ポリペプチド重量の少なくとも約 90%、及び好ましくは少なくとも約 99% を構成する。ポリペプチドが合成され、組換え技術によって生産され、又は細胞から精製される。多種多様な分子及び生化学的手法が生化学的合成、分子発現及び対象の成分の精製に対して利用できるが、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, 等 Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, 等, Greene Publ. Assoc., terscience, NY) 又は当該技術分野で既知の他の文献を参照のこと。

10

本発明は対象のポリペプチドに特異的な結合薬剤、それら薬剤の同定及び調製方法、及びそれらの使用を提供する。例えば、特異的な結合薬剤は種々の診断及び産業上の適用において有用であり、特異的な抗体又は T 細胞抗原レセプターの様な体細胞性の組換えポリペプチドレセプター（例えば、Harlow 及び Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory を参照のこと）、1 - , 2 - , 3 - ハイブリッドスクリーニングなどのアッセイにより同定される細胞内結合薬剤、後述の化学的ライブラリーのスクリーニングにおいて同定される非天然の細胞内結合薬剤などを含む。従って、本発明は相補性決定領域 (CDR) 配列及びこれら配列のライブラリーを提供する。

対象の CDR 配列には多種多様な適用が見いだされる。一実施態様において、対象の CDR 配列はイムノ - マイクロアレイ、アフィニティ試薬などを含む多くの適用を順次提供するポリペプチドを合成するために使用される。また、直接的な合成に加えて、対象の CDR ポリペプチドは、対応する親ポリヌクレオチド、又は縮重オリゴヌクレオチドプライマー及び対象のポリペプチド配列から創出された ("GCG" ソフトウェア、Genetics Computer Group, Inc, Madison WI) プローブを用いて単離された天然コード化ポリヌクレオチド、又はコンピューターアルゴリズムに従って対象のポリペプチドを逆翻訳 (back-translating) することにより作成される選択された発現系に最適化されたポリヌクレオチド（例えば、Holler 等 (1993) Gene 136, 323-328; Martin 等 (1995) Gene 154, 150-166) などのコード化ポリヌクレオチドから細胞及び無細胞系で発現させることもできる（例えば、Jermutus L, 等, Curr Opin Biotechnol. 1998 Oct;9(5):534-48）。一般に、CDR ポリペプチドはイムノグロブリン又はその断片の結合ドメインとして発現され、使用される。

20

30

【0009】

本発明は薬剤、化合物又は対象のポリペプチドが結合標的と相互作用する能力を調節する薬剤のためのリード化合物を同定する効率的な方法を提供する。インヴィトロにおける標識されたタンパク質 - タンパク質結合アッセイ、イムノアッセイ、カスパーゼ活性化アッセイ、アポトーシスアッセイのような細胞ベースのアッセイなどを含む結合薬剤のための多種多様なアッセイが提供される。本方法は、リード化合物に関する化学的ライブラリーの自動化された、費用効率の良いハイスループットなスクリーニングを受け入れ易い。インヴィトロ結合アッセイは対象ポリペプチドを含む構成成分の混合物を利用し、対象ポリペプチドは、例えば、検出又は固着等のためのタグなどの他のペプチド又はポリペプチドとの融合産物の一部であってもよい。アッセイ混合物は結合標的を含む。特別の実施態様において、結合標的はポリペプチドに特異的な抗体である。天然の結合標的全長が使用される場合、一部分がアッセイにおいて容易に測定可能な対象ポリペプチドに対する結合親和性及び結合活性を提供する限り、その部分を使用することが多くの場合好ましい。また、該アッセイ混合物は候補となる薬理学的薬剤も含む。候補薬剤は多数の化学的分類 (class) を含むが、典型的にはそれらは有機化合物であり；好ましくは小有機化合物であって、合成又は天然化合物を含む多種多様な原料から得られる。また、種々の他の試薬が該混合物中に含まれてもよい。これらは塩、バッファー、アルブミンなどの中立的タンパク質、界面活性剤、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤、その他使用される様な試薬を含む。結果的として生じる混合物は、仮に候補の薬理学的薬剤が存在しなけれ

40

50

ば、ポリペプチドが基準の結合親和性で結合標的、部分又は類似体と特異的に結合する条件下でインキュベートされる。混合物の構成成分は必要とされる結合を提供する如何なる順番でも添加可能であり、インキュベーションは至適な結合を促進する如何なる温度において実施してもよい。同様に、インキュベーション期間は至適な結合のために選択されるが、速やかなハイスループットスクリーニングを促進するために最小限とされる。インキュベーション後、ポリペプチドと一又は複数の結合標的との間における薬剤偏向 (biased) 結合は、何れか容易な方法によって検出される。種々の方法が、例えば、光学的又は電子的密度、放射性放射、非放射性エネルギー転移などを通じて、又は抗体接合体などで間接的に検出される、標識の性質及び他のアッセイ構成要素に依存する標識を検出するために使用される。薬剤の存在下における結合親和性に対して薬剤の非存在下において比較されるポリペプチドの標的に対する結合親和性の差は、その薬剤が結合標的に対するポリペプチドの結合を調節することを示す。ここで用いられる差とは、統計学的に有意であって、好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 90 % の差を表す。

【 0 0 1 0 】

対象のポリヌクレオチド配列は、多種多様な適用を見いだす。例えば、ポリヌクレオチド配列は S m a c 配列、特に配列番号： 1、その逆相補鎖又はその断片、好ましくは少なくとも配列番号： 1、ヌクレオチド 1 - 2 3 4 又は配列番号： 1、ヌクレオチド 5 2 5 - 7 2 0、どちらかの逆相補鎖、又はこれら何れかの断片、又はこのような配列を含むポリヌクレオチドのうちの一つを特異的に検出するためにも使用される。簡便な配列検出方法の何れも使用され得る。一実施態様において、候補又は未知の配列が決定され、候補又は未知の配列を分類するために開示された配列と比較される。例えば、B L A S T などのアルゴリズム (例えば、初期設定値を使用する Build sol2.5-x86 01:40:37 05-Feb-1998, Copyright(C)1997 Warren R. Gish, Altschul等, Methods in Enzymology, 215:403-410 (1997)) は、コンピューターベースの方法において、S m a c 関連性の一又は複数の対象配列診断に対する関連性を定義するために使用されてもよい。

他の実施態様において、開示された配列は合成するために使用され、及び / 又は、マイクロアレイベースの方法論、例えば Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl), Debouck C, 等 48-50 を含めた掲載されている全刊行物を参照のこと ; 遺伝子発現解析、例えば Carulli JP, 等, J Cell Biochem Suppl 1998;30-31:286-96 を参照のこと ; 薬剤標的発見及び設計、例えば Jones DA, 等, Curr Opin Chem Biol 1999 Feb;3(1):71-6 を参照のこと ; コンビナトリアルケミストリー、例えば Lukas TJ, 等, J Med Chem. 1999 Mar 11;42(5):910-919 ; リボザイム及び治療、例えば Rossi JJ, Chem Biol 1999 Feb;6(2):R33-7 を参照のこと ; マッピング ; などを含む多くの適用を順次提供するポリヌクレオチドにおいて具体化される。一実施態様において、候補及び / 又は未知のポリヌクレオチドが、例えば開示されたポリヌクレオチドのマイクロアレイ化ライブラリーを用いて、一又は複数の開示されたポリヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションにより、単離され、比較され及び / 又は分類される (例えば、関連性により)。また、このようなポリヌクレオチドは、天然遺伝子及び転写物を局在化、単離、増幅などさせるためのプローブ及び / 又はプライマーとしても使用される。他の実施態様において、開示されたポリヌクレオチド又は断片又はそのようなポリヌクレオチドのライブラリーは、「n」-ハイブリッドシステム、例えば Vidal M, 等, 1999, Nucleic Acids Res. 27(4):919-929 及び Proc Natl Acad Sci U S A. 93(19):10315-20 及び 10321-6 を参照のこと ; 全ゲノムのファージディスプレイライブラリーを用いたタンパク質 - リガンド相互作用マッピング、例えば Palzkill T, 等, Gene 1998 Oct 9;221(1):79-83 ; ペプチドリガンドの DNA ベースの選択及びスクリーニング、例えば Bartoli F, 等, Nat Biotechnol 1998 Nov;16(11):1068-73、などを含む多種多様なクローニング、ディスプレイ、発見、その他の適用のために細胞へ形質移入される。

【 0 0 1 1 】

特別の実施態様において、本発明は開示されたポリヌクレオチドのマイクロアレイ及びここで記述され又は引用されるようなそれらの使用を提供する。接触蒸着、例えば US Pat Nos. 5,807,522; 5,770,151, DeRisi JL, 等 Curr Opin Oncol 1999 Jan;11(1):76-9, など

10

20

30

40

50

；フォトリトグラフベースの方法、例えばUS Pat Nos. 5,861,242;5,858,659;5,856,174;5,856,101;5,837,832, Lipshutz RJ,等 Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl):20-4, など；インクジェット分配技術、例えばLemmo AV,等, Curr Opin Biotechnol 1998 Dec;9(6):615-7；フローパスベースの方法、例えばUS Pat No. 5,384,261；ディップ - ペンナノリトグラフベースの方法、例えばPiner,等, Science Jan 29 1999:661-663, など；等を含む多種多様な材料及び方法が、ガラス、シリコン、プラスチック、ナイロン膜などの基質の分離したエレメントにポリヌクレオチドをアレイ化するために当該技術分野において既知である。

また、本発明は配列番号： 1 の配列を持つポリヌクレオチド、又はその逆相補鎖に対してハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。特別の実施態様において、長さが少なくとも36、好ましくは少なくとも48、さらに好ましくは少なくとも96ヌクレオチドの配列であって、表A - C中で同定され、記述されるような、ハイブリダイゼーション条件#1、好ましくは#2、さらに好ましくは#3及び同様に#10までに基づいたハイブリダイゼーション条件下で該配列と第二のポリヌクレオチドが特異的にハイブリダイズするような配列番号：1、好ましくは配列番号：1、ヌクレオチド1 - 234又は配列番号：1、ヌクレオチド525 - 720、又はどちらかの逆相補鎖から成る第二のポリヌクレオチドと配列類似性を有する配列を含んで成る組換え体の第一のポリヌクレオチドを包含する。従って、例えば、ハイブリダイゼーション条件#7が好ましい場合、その結果、関連する又は相同なポリヌクレオチドを同定し、分類するために用いられる条件は、40のハイブリダイゼーション温度においてハイブリダイゼーションバッファーマ、及び55の洗浄温度において洗浄バッファーマEを利用する。条件#1は、標的ポリヌクレオチド（ここで記述されるように計算された%同一性を持つ）との少なくとも約50%の配列同一性を持つポリヌクレオチドを同定する。続く各条件により、緊縮性は、単離されるポリヌクレオチドが、次に低い条件番号を用いることにより単離されるものより少なくとも5%高い配列同一性を持つようなものである。従って、例えば、条件#2は標的ポリヌクレオチドと少なくとも約55%の配列同一性を持つポリヌクレオチドを同定し、条件#9及び#10は、標的ポリヌクレオチドに対して各々少なくとも約90%及び95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドを同定する。

【0012】

配列番号：1は、天然Smacをコードする天然のヒト転写物に由来する（以下の実施例を参照のこと）。配列番号：1の例示的なより高い緊縮性のハイブリダイゼーションポリヌクレオチド（約95%の配列番号：1配列との同一性を持つ）は、配列番号：3 - 5と命名され、配列番号：1の例示的なより低い緊縮性のハイブリダイゼーションポリヌクレオチド（約90%の配列番号：1配列との同一性を持つ）は、配列リスト中で配列番号：6 - 8と命名されている。より密接に関連するポリヌクレオチドを分類することが望まれる場合、ハイブリダイゼーション条件は所望の特異性が得られるまで一ずつ増加させることにより上昇させる。好ましくは、各ハイブリダイズポリヌクレオチドは、ここで記述されたハイブリダイズするポリヌクレオチド配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%及び最も好ましくは少なくとも90%の長さを持つ。

表A及びB中、ホルムアミドは、1Xから6XSSCを含んで成る緩衝化希釈液（1XSSCは150mM NaCl及び15mM クエン酸ナトリウム；SSPEはSSCと置換可能、1XSSPEは150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄及び1.25mM EDTA, pH7.4）中パーセント（v/v）で表される。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションに関する手順は、当該技術分野において周知である（Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)；Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989；Shilo及びWeinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792；及びPCT公報W099/01466を参照のこと）。

【0013】

表 A

ハイブリダイゼーション バッファー	X SSC	% ホルムアミド
G	1	25
H	2	25
I	3	25
J	4	25
K	5	25
L	6	25
M	1	0
N	2	0
O	3	0
P	4	0
Q	5	0
R	6	0

表 B

洗浄バッファー	X SSC
A	0.2
B	0.3
C	0.4
D	0.5
E	0.6
F	0.8
G	1
H	2
I	3
L	4
K	5
L	6

10

表 C

ハイブリダイゼーション 条件#	ハイブリダイゼーション バッファー	ハイブリダイゼーション 温度	洗浄バッファー	洗浄温度
1	R	25°C	L	35°C
2	R	25°C	L	40°C
3	R	27°C	L	47°C
4	R	34°C	H	45°C
5	R	40°C	F	45°C
6	O	40°C	E	50°C
7	M	40°C	E	55°C
8	L	42°C	D	60°C
9	H	42°C	C	65°C
10	G	42°C	B	70°C

20

30

【 0 0 1 4 】

また、本発明は前述の方法で、特に核酸ハイブリダイゼーションプローブ及び複製 / 増幅プライマーとして用いられる親及び / 又はホモログのポリヌクレオチドの断片も提供する。これらの断片は対応する配列番号又はその相補鎖と特異的にハイブリダイズ化するために十分な長さを持ち、通常、対応する配列番号（例えば表 2 を参照のこと）の少なくとも 1 2、好ましくは少なくとも 2 4、より好ましくは少なくとも 3 6 及び最も好ましくは 9 6 の連続するヌクレオチドを含んで成る。

40

【 0 0 1 5 】

表 2 . ハイブリダイゼーション条件 # 5 の条件下で配列番号 : 1 の鎖とハイブリダイズする例示的な S m a c ポリヌクレオチド断片。

ポリヌクレオチド断片

配列番号 : 1、ヌクレオチド 1 - 2 4
 配列番号 : 1、ヌクレオチド 1 8 - 4 2
 配列番号 : 1、ヌクレオチド 4 5 - 6 9
 配列番号 : 1、ヌクレオチド 7 5 - 9 2
 配列番号 : 1、ヌクレオチド 1 1 6 - 1 4 1
 配列番号 : 1、ヌクレオチド 1 6 6 - 1 9 9

ハイブリダイゼーション

+
 +
 +
 +
 +
 +

50

配列番号：1、ヌクレオチド 2 1 1 - 2 3 4 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 2 5 5 - 2 9 9 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 3 5 9 - 3 8 3 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 4 3 6 - 4 6 0 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 4 9 1 - 5 1 3 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 5 2 5 - 5 4 8 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 5 7 5 - 5 9 8 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 6 2 4 - 6 4 8 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 6 4 4 - 6 6 9 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 6 4 9 - 6 7 2 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 6 5 4 - 6 7 7 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 6 6 5 - 6 8 8 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 6 8 7 - 7 1 0 +
 配列番号：1、ヌクレオチド 6 9 7 - 7 2 0 +

10

【0016】

対象のポリヌクレオチドは S m a c 特異的配列を持つ列挙される配列の断片を含む。好ましい断片は、配列番号：1、特に配列番号：1、ヌクレオチド 1 - 2 3 4 又は配列番号：1、ヌクレオチド 5 2 5 - 7 2 0、何れかの逆相補鎖のうち少なくとも一つの、少なくとも 3 4、好ましくは少なくとも 3 6、好ましくは少なくとも 5 6、さらに好ましくは少なくとも 9 6、さらに好ましくは少なくとも 1 8 6 の連続的なヌクレオチドを含む。対象のポリヌクレオチド及びその断片は、標識又は他のポリヌクレオチド/ポリペプチド配列（即ち、それらはより長い配列の一部であってもよい）などの他の構成要素と連結されていてもよく、合成/非天然配列であり、及び/又は単離、即ち、天然状態で付随している物質の少なくとも幾つかを伴わず、所定のフラクション中に存在する全核酸重量の少なくとも約 0.5%、好ましくは少なくとも約 5% を構成し、通常組換え体であって、それらが天然の染色体上で連結しているもの以外の核酸と連結される非天然配列又は天然配列を含むことを意味する。対象の配列番号又はそれらの断片を含んで成る組換え体ポリヌクレオチドは、終端において天然の染色体上で連結しているもの以外の配列が極近くに隣接し（即ち、連続し）、又は終端にあるか又は天然の染色体上で連結しているもの以外の配列が極近くに隣接する 10 kb より短く、好ましくは 2 kb より短く、さらに好ましくは 500 ベースより短く、最も好ましくは 100 ベースより短い天然隣接領域によって隣接されるような配列又は断片を含む。通常、核酸が R N A 又は D N A である場合、調節された安定性などを提供するために他の塩基又は核酸アナログを含む核酸を用いることは、しばしば有利である。

20

30

【0017】

実施例

I. S m a c 発現評価のための D N A マイクロアレイ構成及び使用

マイクロアレイ化されたポリヌクレオチドライブラリーを用いる比較遺伝子発現は、実際には DeRisi, 等 Science 1997 October 24; 278:680-686 中に記述されるように実施される。マイクロアレイ設計及び構成は、Brown 等, Stanford University Department of Biochemistry による <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html> における 1998 年 8 月 10 日発行により実施される。特に述べない限り、全ての手順は、室温で複蒸留水を用いて行われる。ソフトウェア：J. DeRisi 及び V. Iyer (1999) ArrayMaker v1.5, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/software.html> において 1999 年 2 月 15 日に発行された。

40

【0018】

1. スライドの調製

材料	量 (Qty)	オーダー情報
顕微鏡スライドガラス	60	Gold Seal#3010
スライドラック	2	Shandon Lipshaw#121←各ラックは30 のスライドを収納する
スライドチャンバー	6	Shandon Lipshaw#121←各チャンバーは 350mLを収納する
ddH ₂ O	~5 L	
NaOH	70 g	
95%エタノール	420 mL	
ポリ-L-リジン	70 mL	Sigma#P8920
組織培養PBS	70 mL	
真空オープン (45℃)		
スライドボックス	1	Research Products International#163000

1. スライドラック内にスライドを置く。チャンバー内にラックを置く。
2. クリーニング溶液を調製する：70 gのNaOHを280 mLのddH₂Oに溶解させる。420 mLの95%エタノールを添加する。総量は700 mL (= 2 X 350 mL)；完全に混合されるまで攪拌する。溶液が濁ったままの場合はddH₂Oを透明になるまで加える。
3. 溶液をスライドを収納するチャンバーへ注ぎ込む；チャンバーをガラスの蓋で覆う。オービタル (orbital) 振盪機で2時間混合する。スライドがきれいになったら、できるだけ空気に曝さないようにする。埃粒子がコーティング及びプリンティングを妨害することになる。
4. ddH₂Oで満たした新しいチャンバーへラックを速やかに移す。ラックを上下させることにより強めにリンスする。ddH₂Oで4回リンスを繰り返す。NaOH - エタノールの全ての痕跡を除去することが重要である。
5. ポリリジン溶液を調製する：560 mL水中に70 mLのポリ-L-リジン + 70 mL組織培養PBS。プラスチック製のメスシリンダー及びビーカーを使用する。
6. スライドをポリリジン溶液中へ移し、15分間 - 1時間振盪する。
7. ddH₂Oで満たした新しいチャンバーへラックを移す。リンスのため5回上下させる。
8. マイクロタイタープレートキャリアー上 (液を吸収するためラックの下にペーパータオル置く) でスライドを500 rpmにて5分間、遠心する。真空オープンへの移動のためのカバーを有する空のチャンバーへ、スライドラックを移す。
9. 10分間、45℃の真空オープン中でスライドラックを乾燥させる (真空は任意)。

10. 閉じたスライドボックス中でスライドを保存する。
11. プリンティングアレイ前：疎水性を確認するためにサンプルスライドをチェックする - 水滴が玉となって流れ落ちなくてはならない。ポリリジンのコーティングが透明であることを確認する。スライドバッチの品質を判定するためにサンプルスライドをテストプリント、ハイブリ及びスキャンする。

【0019】

2. DNAサンプルの調製

親ポリヌクレオチドのクローンは、5' 端にアミノ - 連結させたプライマーを用いて96 - ウェル形式中でのPCRにより増幅させる。精製されたPCR産物は、3 X SSC中、~ 0.5 mg / mL濃度で懸濁し、各産物の~ 5 ngが後述の手順の方法によりコートされたガラス上にアレイ化される。1.8 cm四方の領域に全10,000エレメントが175 µm離れた間隔を置いてアレイ化される。

DNA沈殿

1. DNAを96 - ウェルV底組織培養プレート (Costar) へ移す。
2. 1 / 10体積の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) + 同体積のイソプロパノールを

10

20

30

40

50

加える。 - 20 で数時間保存する。

3. Sorvall中で3500rpmにて45分間遠心する。

4. 70%エタノールでリンスし、再び遠心する。

5. ホイルでプレートをカバーするか又はペーパータオル上でプレートを逆さまにして、一晚、空気乾燥させる。或いは、スピード-バック(5分間)でプレートを乾燥させる。

5. DNAを30uLの3XSSC中に一晚かけて再懸濁させる。

6. 7つのプリントプレートセット二組を調製するために4uL分量を384-ウェルプレート(Corning Costar #6557)へ移す。保存のため、アルミニウムホイル(R.S. Hughes #425-3)できっちりとプレートをシールする。長期間の保存のためには、プリントプレートセットを乾燥させ、室温で保存する。使用前に、4uL ddH₂O中に一晚懸濁させる。

7. DNAをポリリジンスライド上へ16-チップアレイヤーでスポットする。使用したプリントプレートを2回目及び3回目の使用の間の保存のためには乾燥させる。

【0020】

3. アレイの後処理

その後、マイクロアレイは、後述の手順によるハイブリダイゼーション前に、DNAをガラス表面上へ固定化させるために後処理される：

30アレイ用の材料	量 (Qty)	オーダー情報
保湿チャンバー	1	Sigma#H6644
逆ヒートブロック (70-80℃)	1	
ダイヤモンドスクライバー	1	VWR#52865-005
スライドラック	1	Shandon Lipshaw#121
スライドチャンバー	2	Shandon Lipshaw#121
無水コハク酸	5.5 g	Aldrich#23,969-0
1-メチル-2-ピロリジノン	325 mL	Aldrich#32,863-4
ホウ酸ナトリウム (1M, pH8)	25 mL	←ホウ酸を使用しpHを 水酸化ナトリウムで調整する。

ddH₂O ~1 L

2L ビーカー 1

95%エタノール 350 mL

1. 再水和アレイ：保湿チャンバーの底を1XSSCで満たす。アレイの表面を下にして1XSSC中に置き、チャンバーを蓋で覆う。アレイのスポットがきらきらと輝くようになるまで再水和させる。スポットを多少膨潤させても良いが、互いに流れ込ませてはならない。

2. 70-80 の逆ヒートブロック上で3秒間各アレイをスナップ乾燥 (snap-dry) (DNAの面を上にして) させる。

3. ダイヤモンドスクライバーを用いてスライドの背面上にアレイの境界をマークする。アレイは後処理の後には見えなくなる。

4. Stratalinkerセットを用いて65mJ. (ディスプレイを、650x100uJ. となる「650」にセットする) (任意) でDNAをガラスにUVクロスリンクさせる。

5. アレイをスライドラック内に配置する。空のスライドチャンバーをオービタル振盪機上に準備する。

6. ブロッキング溶液を準備する：5.5 gの無水コハク酸を325 mLの1-メチル-2-ピロリジノン中へ溶解させる。無水コハク酸が溶解後すぐに25 mLのホウ酸ナトリウムを添加する。

7. ホウ酸ナトリウム溶液が混合した後すぐに溶液を空のチャンバー内へ注ぎ込む。溶液中で数回ラックを沈める。オービタル振盪機上で15-20分間混合する。その間に~700 mLの水 (スライドラックを覆うために十分な量) を2Lビーカー中で95 に熱する。

10

20

30

40

50

8. 95 の水中に2分間スライドラックをゆっくりと沈める。
9. 95 %エタノール中へスライドラックを5回沈める。
10. マイクロタイタープレートキャリアー上(液を吸収するためラックの下にペーパータオル置く)でスライドを500rpmにて5分間、遠心する。
11. アレイはすぐに使用するか、又はスライドボックス中に保存する。最高速度で1分間遠心する。

【0021】

4. アレイのハイブリダイゼーション

全ての測定はSmac - 特異的な発現を実証する解析のためにコンピューターデータベース中に保存する。

10

蛍光DNAプローブのための指示:

1. プローブの最終体積は、4XSSC中、競合DNAなどを含んで10 - 12uLでなくてはならない。
2. アレイをハイブリダイゼーションチャンバー中にセットする。湿度を保つためスライドの端に10uLの3XSSCを載せる。
3. 0.3uLの10%SDSをプローブに添加する。
4. プローブを2分間ボイルする。
5. アレイ上にプローブをピペティングし、22mmX22mmのカバースリップをその上にゆっくりと載せる。
6. ハイブリダイゼーションチャンバーを閉め、63 の水浴中へ浸す。
7. 4 - 24時間ハイブリダイズさせる。
8. ハイブリダイゼーションチャンバーを取り外し、アレイを1XSSC / 0.03% / SDS中でリンスする。
9. アレイを新しいスライドラックへ移し、0.2XSSC中で2回目のリンスする。
10. 0.05XSSC中で3回リンスする。全てのSDSを除去することが重要である。
11. マイクロタイタープレートキャリアー上(液を吸収するためラックの下にペーパータオル置く)でスライドを500rpmにて5分間、遠心する。
12. すぐにアレイをスキャンする。

20

【0022】

30

II. 天然Smacポリペプチド及びポリヌクレオチドの同定及び性質決定

Smacの同定。運良く行った実験において、界面活性剤を含むバッファー中で調製した細胞抽出物には、界面活性剤を含まないバッファー中で調製したものと比較して、非常に多くのカスパーゼ-3を活性化する活性が存在することに気がついた。既知の可溶性因子であるApaf-1、チトクロームc及びプロカスパーゼ-9に加えてカスパーゼ-3の活性化を促進する膜結合性因子が存在することが推論できるため、界面活性剤中に膜沈殿物を可溶化させ、バッファーに可溶性の抽出物の100,000xg遠心上清(S-100)中へ再添加した。界面活性剤で可溶化された膜抽出物(SME)は、それ自体ではカスパーゼ-3を活性化する活性は有しなかったが、S-100画分へ添加するとカスパーゼ-3を活性化する活性が有意に刺激された。同量の界面活性剤をS-100へ単に添加するだけでは、カスパーゼ-3の活性化には効果がなかった。本実験は、通常水溶性画分において欠如するカスパーゼ-3活性化促進因子が膜画分中に存在することを示す。

40

我々が以前調製した生化学的画分及びS-100抽出物にのみ基づく再構成実験により、1mM dATPの存在下においてカスパーゼ-3活性化反応を再構成するのに必要かつ十分な3つのタンパク質を同定することが可能となった。これらのタンパク質は、シー・エレガンスのCED-4タンパク質の哺乳類ホモログである130kDaタンパク質、Apaf-1 (Zou等, 1997; Yuan及びHorvitz 1992 Development 116, 309-320); プロカスパーゼ-9 (Li等, 1997)、及びホモジナイズの段階でS-100へ遊離されるチトクロームc (Liu等, 1996)である。界面活性剤で可溶化された膜抽出物が、Apaf-1、又はチトクロームc、又はプロカスパーゼ-9を代替するタンパク質を含むかどうかを

50

調べるために、最初にこれら3つのタンパク質を各々S - 100から免疫除去し、界面活性剤で可溶化された膜画分を除去抽出物へ添加した。カスパーゼ - 3を活性化する活性はこれらの除去抽出物中には認められなかったため、この因子はA f a - 1、チトクロームc、又はプロカスパーゼ - 9を代替することはできないことを示す。さらに、本因子の活性はA p a f - 1、チトクロームc、又はプロカスパーゼ - 9に依存する。本因子が通常ミトコンドリアに局在することから、第二ミのトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子 (second mitochondria-derived activator of caspase) との理由でS m a cと名付けた。

【0023】

S m a cの精製。アッセイとして再構成実験を用いて、0.5%CHAPS中に可溶化させたH e L a細胞の大規模培養から膜フラクションを分画した。S m a cの活性はS - 100中のカスパーゼ - 3の活性化を刺激する能力に関してスコア化された。S m a cの精製は、6ステップの手順を経て達成された(以下の実験手順を参照のこと)。S m a c活性は、~250mM NaClにおける単一のピークとしてM o n o Qカラムから溶出された。同一のタンパク質フラクションをSDS - PAGEにかけ、その後銀染色を行った。25kDaの位置に泳動されたタンパク質のバンドはS m a c活性と関連した。天然のS m a cはゲル濾過カラムでは~100kDaに溶出するため、S m a cはホモ四量体であることを示す。活性フラクション中に見いだされる50kDaの夾雑タンパク質は活性のピークと関連しなかった。

S m a cの分子クローニング。M o n o Qカラムから溶出されたフラクション3及び4由来の25-kDaのタンパク質のバンドは、トリプシン消化された。その結果生じた4つのペプチドは逆相HPLCによって精製され、エドマン分解法により配列決定された。データベースサーチにより、これらのペプチド配列はESTデータベース(T53449)中の未だ性質決めされていないcDNAと一致することが明らかとなった。EST配列をプローブとして用いて、S m a cをコードするcDNAがH e L a細胞cDNAライブラリーからクローン化された。cDNA及びコードされるアミノ酸配列は配列番号: 1及び2として各々開示される。フレームの合ったストップコドンが開始メチオニンの前に見いだされたため、このcDNAはS m a cの全長コード領域をコードすることを示す。S m a cの全長タンパク質配列はタンパク質データベース(GeneBank及びProsite)に対して検索するために用いられたが、S m a cと相同なタンパク質配列又はモチーフは見いだされなかった。

S m a cの組織分布を調べるために、複数のヒト成人組織由来のmRNAプロットを用いてノザンプロット分析が実施された。調べられた全組織中に、~1.5kbの顕著なmRNAが検出され、この事はS m a cの偏在性の発現を示めす。S m a cのmRNAの発現は成人の精巣で最も高く、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、前立腺及び卵巣で高かった。S m a cのmRNAの発現は脳、肺、胸腺及び末梢血白血球では低い。

【0024】

S m a cはアポトーシスの間にサイトゾルへ放出されるミトコンドリアタンパク質である。細胞内におけるS m a cの正確な位置を特定するために、バクテリアで発現させた組換え体S m a c(アミノ酸95-239)に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫染色及び生化学的な分画によってS m a cの位置付けをするためにこの抗体を用いた。S m a c抗体による生細胞の免疫染色により、チトクロームcと共局在する斑点状のミトコンドリアへの局在が明らかにされた。しかしながら、細胞がUVによって誘導されたアポトーシスを起こしている場合、S m a c及びチトクロームcの染色は、斑点状のミトコンドリア局在からより散在生のサイトゾルのパターンへと双方ともに変化した。両タンパク質はUV照射から2時間後に散在生のサイトゾル染色を呈し始め、そのパターンは8時間後により明らかとなった。チトクロームcとS m a cの最も散在した分布を示す細胞は、D A P I染色により評価するとクロマチンの凝縮も明らかにした。

さらに免疫染色の結果を確認するために、ミトコンドリア及びサイトゾルのフラクションを正常又はUV照射したH e L a細胞から単離した。生細胞中、S m a c及びチトクロームcは排他的にミトコンドリアフラクション中に局在した。UV照射から2時間後、チト

10

20

30

40

50

クローム c 及び S m a c は共にサイトゾルフラクション中に観察された。サイトゾルの S m a c 及びチトクローム c は、対応するミトコンドリアにおける減少と一致して 8 時間、増加し続けた。

25 - k D a S m a c はカスパーゼ - 3 活性化刺激活性に対して必要である。25 - k D a S m a c がカスパーゼ - 3 活性化促進活性に対して絶対的に必要であることを実証するために、界面活性剤可溶化膜粗抽出物 (S M E) から免疫除去するために S m a c に対するポリクローナル抗体を使用した。抗 S m a c 血清を用いた免疫除去により S M E から 25 - k D a タンパク質が定量的に除かれた。25 - k D a タンパク質の存在しない抽出物は S - 100 中でのカスパーゼ - 3 活性化を刺激する能力を失ったが、このことは 25 - k D a S m a c がそのような活性に必要であることを示す。

10

【 0 0 2 5 】

S m a c の成熟にはそのシグナルペプチドの切断が必要である。さらに S m a c 活性の性質を決定するために、バキュロウィルスの発現系で S m a c をコードする全長 c D N A を発現させた。組換え体 S m a c は均一に精製された。S m a c の全長 c D N A は分子量 27 k D a の 239 アミノ酸からなるオープンリーディングフレームをコードするが、H e L a 及び S f - 21 細胞の双方から精製された S m a c は約 25 - k D a であり全オープンリーディングフレームより小さい。ヘリカルホイール分析によると S m a c の N 末端領域は典型的なミトコンドリア標的シグナル配列に類似することが明らかとなった：片側にポジティブ電荷アミノ酸 (A r g - 10 , A r g - 17 , A r g - 19 , L y s - 31 , L y s - 32 , A r g - 33 , A r g - 40) 側鎖を持つ両親媒性の α - ヘリックス (S c h a t z 及び D o b b e r s t e i n , 1996 Science 271, 1519-1526 を参照のこと) 。直接的配列決定分析は、S f - 21 細胞から精製された成熟 S m a c はアミノ酸 56 から始まっていることを示した。S f - 21 細胞中で発現される 25 k D a の組換え体 S m a c が完全に活性を持つということは、アミノ酸 1 - 55 は後で切断されたミトコンドリア標的シグナルペプチドであることを示す。シグナルペプチドを有する無傷の全長 S m a c も、全長 S m a c を含むバキュロウィルスベクターで感染させた S f - 21 細胞でのウェスタンブロット分析によって観察された。全長 S m a c は如何なる活性も示さず、このことはミトコンドリア内でのシグナルペプチドの切断が S m a c がアポトーシス活性を得るのに必要とされるステップであることを示す。

20

S m a c はインヴィボにおけるアポトーシス刺激に対する細胞の感受性を増大させる。インヴィボにおける S m a c の役割を研究するために、タンパクの C 末端に F L A G タグを融合させた全長 S m a c を用いて H e L a 細胞を一過的に形質移入した。細胞内で一過的に発現された S m a c はアポトーシス刺激がないとカスパーゼ - 3 の活性化及びアポトーシスを誘導しなかった。F L A G でタグ化した S m a c はミトコンドリアに排他的に局在した。その後、形質移入された細胞は U V ランプの下で照射時間の長さを増加させながら照射された。U V 照射 2 秒後、S m a c 形質移入細胞の ~ 60 % がクロマチン凝縮によって評価されるアポトーシスの徴候を示した。また、活性なカスパーゼ - 3 もこれらの細胞抽出物中にウェスタンブロット分析及び酵素学的アッセイにより認められた。これに対して、ベクターで形質移入した細胞の ~ 20 % のみが同じ条件下でアポトーシスの徴候を示し、カスパーゼ - 3 の活性はほとんど検出されなかった。U V により長く曝すことによって、より多くのアポトーシス及びカスパーゼ - 3 活性が認められたが S m a c 及びベクターによる形質移入細胞同士における差はより小さくなった。

30

40

【 0 0 2 6 】

S m a c はカリウム塩の生理的な濃度の存在下において外来性の d A T P 無しにカスパーゼ - 3 の活性化を促進する。カスパーゼ - 3 の活性化に関する我々のこれまでの生化学的研究により、カスパーゼ - 3 の活性化に対して必要かつ十分である A p a f - 1、プロカスパーゼ - 9、及びチトクローム c を同定してきた (Z o u 等 , 1991) 。活性化反応には 0 . 1 m M d A T P 及び 10 m M K C l の至適濃度が必要である。しかし、インヴィボにおいて d A T P 濃度はおよそ 10 μ M であり、カリウム塩は約 150 m M であり、A p a f - 1、チトクローム c 及びプロカスパーゼ - 9 によって触媒されるカスパーゼ - 3 の

50

活性に対して阻害的な濃度である。S m a c の存在が d A T P 及びカリウム塩の生理的な濃度下においてカスパーゼ - 3 の活性化を促進するか否か調べるために、バキュロウィルスの発現系から精製された組換え体 S m a c を透析した S - 1 0 0 に添加し、カスパーゼ - 3 の活性化に関しアッセイした。S m a c 非存在下において、カスパーゼ - 3 の活性化は d A T P 濃度が 0 . 1 m M 及び K C l が 1 0 m M に達したときにも認められた。S m a c 存在下では、カスパーゼ - 3 の活性化は外来性の d A T P が添加されないときでも認められ、その活性化は 1 0 μ M d A T P でプラトーに達した。また、同様の結果が A T P についても認められた。驚くべきことに、S m a c の存在下では、K⁺ 濃度が 1 5 0 m M に達したときでも強いカスパーゼ - 9 及びカスパーゼ - 3 の活性化が認められた。増強されたカスパーゼ - 3 の活性化は、カスパーゼ - 3 活性化に関し上流のカスパーゼであるカスパーゼ - 9 の増強された活性化が原因であった。

10

実験手順：一般的方法及び材料。ヌクレオチドはPharmaciaから；ウマ心臓チトクローム c はSigmaから；チトクローム c に対するモノクローマ抗体はPharmlingenから；放射活性物質はAmershamから及びS D S - P A G E とゲル濾過カラムクロマトグラフィーに対する分子量標準はBio-Radから入手した。タンパク質濃度はブラッドフォード法により決定された；一般的な分子生物学的手法は、Sambrook等, 1989 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pressの中の記述に従って使用された。

【 0 0 2 7 】

H e L a 細胞からの S - 1 0 0 フラクシオンの調製。ヒト H e L a S 3 細胞は、1 5 0 - m m 組織培養ディッシュで 1 0 % (v / v) ウシ胎児血清を添加した D M E M 培地 (1 0 0 U / m l ペニシリン及び 1 0 0 m g / m l ストレプトマイシン硫酸塩を含む Dulbecco's modified eagle's medium) 中にて培養され、3 7 、5 % C O₂ の環境において単層で生育させた。7 0 % コンフルエントの細胞は 1 x リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 1 回洗浄し、4 にて 8 0 0 x g 、5 分間遠心して回収した。細胞沈殿物は 3 倍量のバッファ A (2 0 m M H e p e s - K O H , p H 7 . 5 , 1 0 m M K C l , 1 . 5 m M M g C l₂ , 1 m M N a E D T A , 1 m M N a E G T A , 1 m M D T T , 及び 0 . 1 m M P M S F) に懸濁させ、細胞抽出物は Liu 等, 1996 中の記述に従って調製した。抽出物調製の間、ミトコンドリアが無傷に保たれる必要がある場合、細胞沈殿物は Yang 等, 1997 Science 275, 1129-1132 中の記述に従って 2 5 0 m M スクロースを含むバッファ A 中に溶解させた。

20

30

カスパーゼ - 3 の活性化に関するアッセイ。カスパーゼ - 3 は既述 (Liu 等, 1996) のように翻訳され、精製された。インヴィトロで翻訳されたカスパーゼ - 3 の 2 μ l 分量が、1 m M d A T P 及び 1 m M の更なる M g C l₂ の存在下において、バッファ B で最終体積 2 0 μ l となるようにして、3 0 、1 時間、対象のタンパク質フラクションと共にインキュベートされた。インキュベーションの最後に、7 μ l の 4 x S D S サンプルバッファが各反応混合物に添加された。3 分間ボイルした後、各サンプルは 1 5 % S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) にて泳動された。ゲルをニトロセルロースフィルターにトランスファーさせ、次いで Phosphorimaging プレートに暴露し、Fuji BAS-1500 Phosphorimager で視覚化した。

40

可溶化した膜抽出物 (S M E) の調製。1 0 0 リットルの懸濁培養した H e L a 細胞 (5 x 1 0⁶ 細胞 / m l) からの 2 5 0 m l 細胞沈殿物を 1 リットルのバッファ A 中に再懸濁させた。細胞をホモジナイズし、Liu 等, 1996 中の記述に従って核を取り除いた。上清は重い膜フラクションをを沈殿させるために、4 で 3 0 分間、1 0 , 0 0 0 x g で遠心した。その結果得られた膜沈殿物は 0 . 5 % (w / v) C H A P S を含む 1 リットルのバッファ A 中に再懸濁させ、可溶化した混合物は、Beckman SW 28 ローター中、4 で 1 時間、1 0 0 , 0 0 0 x g で遠心した。その結果得られた上清 (可溶化された膜抽出物、S M E) は - 8 0 で保存し、タンパク質 S m a c の精製のための開始材料として用いた。

【 0 0 2 8 】

50

SMEからのSmacの精製。全ての精製ステップは4で実施された。Q-Sepharoseカラム(Pharmacia)及びハイドロキシアパタイトカラム(Bio-Rad)のクロマトグラフィーステップは従来の段階的なクロマトグラフィーを用いて実施された。Phenyl Superose, Superdex 200及びMono-Qのクロマトグラフィーステップは、全自動高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)装置(Pharmacia)により実施された。

可溶化された膜フラクション(5gの総タンパク質量)の1リットルが、バッファーAで平衡化させたQ-Sepharoseカラム(100-mlのベッド体積)に添加された。カラムは200mlのバッファーA、次に、100mM NaClを含むバッファーA、500mlで洗浄された。カラム上に結合した物質は300mM NaClを含む500mlのバッファーAで溶出させた。50mlのフラクションが集められ、Smac活性についてアッセイされた。活性なタンパク質フラクションの150-mlがブールされ、40%飽和となるように固体の硫酸アンモニウムを添加することで沈殿させ、タンパク質沈殿物は35,000xg、20分間の遠心により収集した。その結果得られたタンパク質沈殿物は、170mlのバッファーA中に溶解させ、バッファーAで平衡化させたハイドロキシアパタイトカラム(50-mlのベッド体積)に添加した。カラムは150mlのバッファーA、次に、1M NaClを含むバッファーAで洗浄し、その後再度150mlのバッファーAで洗浄した。結合した物質は、100mlの0.12M KPO₄, pH 7.5で溶出した。10mlのフラクションが集められて、Smac活性についてアッセイされた。全部で40-mlの活性タンパク質フラクションがブールされ、3.1gの硫酸アンモニウムが最終濃度0.5Mの硫酸アンモニウムを調製するために添加された。タンパク質-硫酸アンモニウム混合物は1時間回転させて平衡化し、その後35,000xg、40分間の遠心を行った。その結果生じた上清(44-ml)は、0.5M硫酸アンモニウムを含むバッファーAで平衡化したPhenyl Superose 5/5(Pharmacia)に添加した。カラムを0.5Mの硫酸アンモニウムを含む30mlのバッファーAで洗浄し、0.5の硫酸アンモニウムを含むバッファーAからバッファーBまで100mlの線形勾配で溶出させた。5-mlのフラクションが集められて、Smac活性についてアッセイされた。130-180mM硫酸アンモニウムで溶出された全部で15mlの活性フラクションを集め、100mM NaClを含むバッファーAで平衡化したSuperdex 200(26/60)ゲル濾過カラムに2回に分けて通した。カラムは同じバッファーで溶出した。90-mlの溶出から開始して、4-mlの活性フラクションが集められ、Smac活性についてアッセイされた。全部で24-mlの活性フラクションをブールし、100mM NaClを含むバッファーAで平衡化したMono Q(5/5)カラムに添加した。カラムは200mM NaClを含む10-mlのバッファーAで洗浄され、バッファーA中の200mM NaClから500mM NaClの直線的な濃度勾配によって溶出された。1mlのフラクションが集められ、Smac活性についてアッセイされた。活性のあるフラクション(2µgの全タンパク質)がバッファーA中の270-300mM NaClにおいて溶出され、20%グリセロールを添加して分取され、-80で保存された。

【0029】

Smacのタンパク質配列決定。Mono Qカラムからの25-kDaバンド(~8p.mol)がクマジーブルーで染色された15%のSDS-PAGEゲルから切り出された。バンドはトリプシン(Promega)で消化され、生じたペプチドはキャピラー逆相FPLCカラム(LC Packing, Inc.)によって分離された。4つの個別のペプチドがApplied Biosystemsシーケンサーで配列決定された。

SmacのcDNAクローニング。4つのポリペプチド配列が得られ、ESTデータベース(tBlastn)のサーチに用いられた。1つのポジティブESTクローン(T53449)が同定され、HeLa cDNAライブラリーからPCRによりcDNAクローンを得るためのオリゴヌクレオチドを設計するために鋳型として用いた。1ml(10⁸ p.f.u)分量の1Exlox HeLa cDNAライブラリー(Yokoyama等, 1993 Cell 75, 187-197)

10

20

30

40

50

は、94、1分間、1サイクル及び94、30秒間；55、30秒間；72、1分間、35サイクルの後、72、10分間の伸長によるPCR条件を使用し、プライマーを用いて直接増幅されたDNAを遊離させるために99で15分間、熱処理された。559-bp PCR産物が得られ、続いてTA cloning kit (Invitrogen)を用いてPCR IIへサブクローニングした後、配列決定を行った。559-bp PCR産物は、rediprime II random prime labeling kit (Amersham)を用いて α -³²P-dCTPで標識され、Rapid-hyb buffer (Amersham)中、42で一晩、二組のフィルターをハイブリダイズすることによりHeLa 1E x 10⁵ cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして使用された。フィルターは、1 x クエン酸食塩水 (SSC) / 0.1 % SDSで15分間、室温にて2回洗浄し、0.5 x SSC / 0.1 % SDSで10分間、65にて1回洗浄した。スクリーニングされた5 x 10⁵のプラークから、14のポジティブクローンが同定され配列決定された。719-bpの全長cDNAが得られた。

【0030】

Sma c ポリクローナル抗体の作製。プライマーはプラスミド中のSma c cDNAの437-bpをPCR増幅させるために設計された。Sma cの95-239アミノ酸をコードする増幅されたDNA断片は、読み枠が合うようにバクテリア用発現ベクターpET-15b (Novagen)のXho I / Bam H I 部位へサブクローン化された。発現プラスミドはバクテリアBL21 (DE3)中へ形質転換した。典型的なSma c標品においては、Sma c発現ベクターを含む5-mlの一晩バクテリア培養物が500-mlのLB培養液へ添加され、37、250 rpmで振盪することにより培養した。培養物の吸収が600 nmで0.8に達した時、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) が最終濃度1 mMになるように添加され、培養物をさらに3時間振盪した。バクテリアは遠心により沈殿させ、10 mlのバッファーB (6 M GuHCl, 0.1 M リン酸ナトリウム, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) にバクテリア沈殿物を再懸濁させた。10,000 x gで15分間遠心後、上清をニッケルアフィニティカラム (4 ml) 添加した。カラムは300 mlのバッファーBで洗浄し、その後300 mlのバッファーC (8 M 尿素, 0.1 M リン酸ナトリウム, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) で洗浄した。カラムは250 mM イミダゾールを含むバッファーCで溶出した。~10 mgのSma cタンパク質が500-ml培養から精製された。本精製Sma c融合タンパク質はウサギに免疫することによりポリクローナル抗体を生産するために用いられた。

【0031】

ウェスタンブロット分析。Apa f - 1、カスパーゼ - 9 及びチトクローム c に対するウェスタンブロット分析が既述 (Li等, 1997) に従って実施された。抗Sma c抗血清は組換え体Sma c融合タンパク質でウサギを免疫することにより作製された (上記を参照のこと)。Sma cのイムノブロット分析は西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギイムノグロブリンGにより、Enhanced Chemiluminescence (ECL) ウェスタンブロットティング検出試薬 (Amersham) を用いて行われた。

ノザンブロット分析。複数のヒト成人組織に由来するレーンあたり2 μgのPoly (A)⁺ RNAを含むPoly (A)⁺ RNAブロットはClontechから購入した。ブロットは、cDNAライブラリーのスクリーニングに用いた2 x 10⁶ cpm/mlのランダムプライム化した559-bpのSma c PCR断片 (上記を参照のこと) を用いてRapid hyb buffer (Amersham) 中、65で一晩ハイブリダイズさせた。フィルターは2 x SSC / 0.1 % SDSで65、15分間洗浄後、1 x SSC / 0.5 % SDSで65、15分間洗浄した。その後、同じフィルターからプローブを剥がし、2.0 kb β-アクチンcDNAプローブを用いて65で2時間ハイブリダイズさせ、その後、フィルターは上述したように洗浄した。増感スクリーンを用い、80でフィルターをX線フィルムに暴露した。

免疫染色。接着性HeLa細胞は10% (v/v) ウシ胎児血清を添加したDMEM培養液中、チャンバースライド (Nagler Nunc International) あたり1 x 10⁴ 細胞となるよ

10

20

30

40

50

うに播き、5% CO₂ 環境、37 °C において単層で生育させた。24時間後、培養液が除去され、HeLa細胞はUVランプ(5,000 mW/cm², Philips, G36T6L)の下3.5 cmで、15分間照射された。その後、処理した細胞は新しいDMEM培養液中で上述したように数時間培養し続けた。細胞培養はPBSで3回洗浄することにより停止させ、その後新しく調製したPBS中の3%パラホルムアルデヒドで10分間固定化した。固定した細胞を各々15分間PBS中で3回洗浄し、その後PBS中の0.15% トリトンX-100で15分間膜透過性処理を行った。その後細胞をブロッキングバッファー(PBS中の2%ウシ血清アルブミン)中で60分間ブロッキングし、Smacに対する抗血清(1:200)又はチトクロームcに対するマウスモノクローナル抗体(1:200)と共に4時間インキュベーションした。細胞は各々ブロッキングバッファー中で10分間、3回洗浄し、Smacに対するフルオレセイン結合ヤギ抗ウサギ抗体(1:500)(Molecular Probe)又はチトクロームcに対するテキサスレッド標識ヤギ抗マウスIgG(1:500)(Molecular Probe)と共に1時間インキュベーションした。免疫染色した細胞は、各々PBS中で10分間、3回洗浄した後、1 µg/mlのDAPI(Molecular Probe)で染色し、Nicon Eclipse E800 Fluorescence Microscopeで調べた。

【0032】

Smac cDNAによるHeLa細胞の形質移入。Smacの全コード領域を含む719-bpのcDNA及びカルボキシル末端のFlagタグは、pcDNA3.1(-)ベクター(Invitrogen)のXhoI/EcoRI部位へサブクローン化され、該プラスミドはpcDNA-Smacと命名され、Qiagen Midiprep kitを用いて調製された。HeLa細胞は10%(v/v)ウシ胎児血清を添加したDMEM培養液中で60-mmディッシュあたり1×10⁵で調製し、5% CO₂ 環境、37 °C において単層で生育させた。24時間インキュベートした後、各ディッシュはそれぞれ4 µgのpcDNA3.1(-)ベクター又は4 µgのpcDNA-Smacにより、Fugene 6形質転換試薬(Roche)を用いて形質転換した。16時間後、培養液は除去され、細胞は異なる時間長で上述したようにUV照射した。照射後、形質移入した細胞は、新しいDMEM培養液中でさらに6時間培養し、S-100抽出物の調製のために0.5% CHAPSの存在下、バッファーA中に回収した。全部で20 µgのタンパク質が15%のSDS-PAGEで泳動され、ゲルはニトロセルロースフィルターへトランスファーし、続いてSmacに対するポリクローナル抗体又はヒトカスパーゼ-3に対するモノクローナル抗体(Transaction Laboratories)でプロットした。

バキュロ発現系における組換え体Smacタンパク質の生産。カルボキシル末端において9-ヒスチジンタグと融合した全長Smacをコードする719-bp cDNAはバキュロウィルス発現ベクターpFastBac1(Life Technologies, Inc)のBamHI/NotI部位へサブクローニングされた。発現プラスミドはDH10Bac大腸菌(Life Technologies, Inc)へ形質転換された。組換え体ウィルスDNA、バクミドはBac-To-Bac Baculovirus Expression procedureに従って精製され、PCR増幅分析によって確認された。その後、DNAはCellfectin試薬(GIBCO-BRL)を用いて昆虫細胞、Sf-21に形質移入するために使用された。細胞は、10%ウシ胎児血清(FCS)、2.6 g/L リン酸トリブトース、4 g/L Yeastolate、及び0.1% Pluronic F-68、加えて、ペニシリン(100 u/ml)、ストレプトマイシン(100 mg/ml)及びファンギゾン(0.25 g/ml)を添加したIPL41培地で生育させた。組換え体Smacの発現はウェスタンブロットによって分析した。ウィルスストックは100 mlに増幅し、密度が2×10⁶細胞/mlのSf21細胞、1リットルに感染させるために用いた。感染後24時間、細胞は遠心によって回収し、細胞沈殿物は0.5%のCHAPSを含む5倍量のバッファーA中に再懸濁させた。再懸濁させた細胞はホモジナイズによって溶解させ、細胞溶解物は10,000×g、4 °Cで1時間遠心した。上清を3-mlのニッケルアフィニティークロマトグラフィーに添加した。カラムは1 M NaCl及び15 mM イミダゾールを含む300 mlのバッファーAで洗浄後、20 mlのバッファーAで平衡化した。カラムに結合したSmacは250 mM イミダゾールを含むバッファーAで溶出

10

20

30

40

50

した。溶出された S m a c は複数に分注して - 8 0 で保存した。

【 0 0 3 3 】

I I I . ハイスルーブットなポリペプチド - 抗体結合干渉アッセイの手順。

A . 試薬 :

- Neutralite Avidin : P B S 中、2 0 μ g / m l
 - ブロッキングバッファー : P B S 中、5 % B S A、0 . 5 % ツイーン 2 0 ; 室温にて 1 時間。

- アッセイバッファー : 1 0 0 m M K C l、2 0 m M H E P E S p H 7 . 6、1 m M M g C l₂、1 % グリセロール、0 . 5 % N P - 4 0、5 0 m M b - メルカプトエタノール、1 m g / m l B S A、プロテアーゼインヒビターのカクテル。

- ³³ P S m a c ポリペプチド 1 0 x ストック : 2 0 0、0 0 0 - 2 5 0、0 0 0 c p m の標識ポリペプチド (Beckman counter) を加えた 10^{-8} - 10^{-6} M 「コールド」ポリペプチド。スクリーニングの間、4 のマイクロフリッジ (microfridge) 中に置く。

- プロテアーゼインヒビターカクテル (1 0 0 0 X) : 1 0 m l の P B S 中、1 0 m g トリプシンインヒビター (BMB#109894)、1 0 m g アプロチニン (BMB#236624)、2 5 m M ベンザミジン、(Sigma#B-6506)、2 5 m g ロイペプチン (BMB#1017128)、1 0 m g A P M S F (BMB#917575)、及び 2 m M N a V O₃ (Sigma#S-6508)。

- 抗体 : P B S 中、 10^{-7} - 10^{-5} M ビオチン化抗体。

B . アッセイプレートの調製 :

- ウェルあたり 1 2 0 μ l の N-Avidin で 4 、一晩コートする。
 - 2 0 0 μ l P B S で 2 回洗浄する。
 - 1 5 0 μ l のブロッキングバッファーでブロッキングする。
 - 2 0 0 μ l P B S で 2 回洗浄する。

C . アッセイ :

- 4 0 μ l アッセイバッファー / ウェルを添加する。
 - 1 0 μ l 化合物又は抽出物を添加する。
 - 1 0 μ l ³³ P - ポリペプチド (2 0 - 2 5、0 0 0 c p m / 0 . 1 - 1 0 p m o l e s / ウェル = 10^{-9} - 10^{-7} M 最終濃度)
 - 2 5 で 1 5 分間振盪。
 - 2 5 でさらに 4 5 分間インキュベートする。
 - 4 0 μ M ビオチン化抗体 (アッセイバッファー中、0 . 1 - 1 0 p m o l e s / 4 0 μ l)
 - 室温で 1 時間インキュベートする。
 - 2 0 0 μ M P B S で 4 回洗浄することにより反応を停止させる。
 - 1 5 0 μ M シンチレーションカクテルを添加する。
 - トップカウントでカウントする。

D . 全てのアッセイに対するコントロール (各プレートに位置づけられる)

a . 非特異的結合

b . 8 0 % 阻害で可溶性 (非ビオチン化抗体)

配列番号 : 2 及びその欠失突然変異体を含む例示的なポリペプチドを用いたアッセイは、これに対する特異的な抗体の検出を提供する。同様に、配列番号 : 2 及びその断片から成る群から選択される配列に対して特異的な C D R s を含んで成る例示的なポリペプチドを用いる相補性アッセイは、そのような対応配列を含んで成るポリペプチドの検出を提供する。

【 0 0 3 4 】

本明細書中で引用された全ての出版物及び特許明細書及びそれらに引用された全ての引例は、個々の出版物又は特許明細書又は引例が、出典により取り込まれることが特異的及び個別的に示されたものとして、出典により取り込まれている。前述の発明は、理解を明確にする目的で例示及び実施例の方法によりある程度詳細に記述されたが、当業者にとって

10

20

30

40

50

、本発明を教示するという観点において、ある程度の変更及び修飾は、添付の請求の範囲の理念及び範囲から逸脱する事無く行われることは、容易に明らかであろう。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Wang, Xiaodong
      Du, Chunying
<120> Activators of Caspases
<130> UTSD0630
<140>
<141>
<160> 8
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 720
<212> DNA
<213> human
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(717)

<400> 1
atg gcg gct ctg aag agt tgg ctg tgg cgc agc gta act tca ttc ttc 48
Met Ala Ala Leu Lys Ser Trp Leu Ser Arg Ser Val Thr Ser Phe Phe
   1             5             10             15

agg tac aga cag tgt ttg tgt gtt cct gtt gtg gct aac ttt aag aag 96
Arg Tyr Arg Gln Cys Leu Cys Val Pro Val Val Ala Asn Phe Lys Lys
          20             25             30

cgg tgt ttc tca gaa ttg ata aga cca tgg cac aaa act gtg acg att 144
Arg Cys Phe Ser Glu Leu Ile Arg Pro Trp His Lys Thr Val Thr Ile
          35             40             45

ggc ttt gga gta acc ctg tgt gcg gtt cct att gca cag aaa tca gag 192
Gly Phe Gly Val Thr Leu Cys Ala Val Pro Ile Ala Gln Lys Ser Glu
          50             55             60

cct cat tcc ctt agt agt gaa gca ttg atg agg aga gca gtg tct ttg 240
Pro His Ser Leu Ser Ser Glu Ala Leu Met Arg Arg Ala Val Ser Leu
          65             70             75             80

gta aca gat agc acc tct acc ttt ctc tct cag acc aca tat gcg ttg 288
Val Thr Asp Ser Thr Ser Thr Phe Leu Ser Gln Thr Thr Tyr Ala Leu

```

10

20

30

40

85	90	95	
att gaa gct att act gaa tat act aag gct gtt tat acc tta act tct			336
Ile Glu Ala Ile Thr Glu Tyr Thr Lys Ala Val Tyr Thr Leu Thr Ser			
100	105	110	
ctt tac cga caa tat aca agt tta ctt ggg aaa atg aat tca gag gag			384
Leu Tyr Arg Gln Tyr Thr Ser Leu Leu Gly Lys Met Asn Ser Glu Glu			
115	120	125	
gaa gat gaa gtg tgg cag gtg atc ata gga gcc aga gct gag atg act			432
Glu Asp Glu Val Trp Gln Val Ile Ile Gly Ala Arg Ala Glu Met Thr			
130	135	140	10
tca aaa cac caa gag tac ttg aag ctg gaa acc act tgg atg act gca			480
Ser Lys His Gln Glu Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Trp Met Thr Ala			
145	150	155	160
gtt ggt ctt tca gag atg gca gca gaa gct gca tat caa act ggc gca			528
Val Gly Leu Ser Glu Met Ala Ala Glu Ala Ala Tyr Gln Thr Gly Ala			
165	170	175	
gat cag gcc tct ata acc gcc agg aat cac att cag ctg gtg aaa ctg			576
Asp Gln Ala Ser Ile Thr Ala Arg Asn His Ile Gln Leu Val Lys Leu			
180	185	190	20
cag gtg gaa gag gtg cac cag ctc tcc cgg aaa gca gaa acc aag ctg			624
Gln Val Glu Glu Val His Gln Leu Ser Arg Lys Ala Glu Thr Lys Leu			
195	200	205	
gca gaa gca cag ata gaa gag ctc cgt cag aaa aca cag gag gaa ggg			672
Ala Glu Ala Gln Ile Glu Glu Leu Arg Gln Lys Thr Gln Glu Glu Gly			
210	215	220	30
gag gag cgg gct gag tcg gag cag gag gcc tac ctg cgt gag gat tga			720
Glu Glu Arg Ala Glu Ser Glu Gln Glu Ala Tyr Leu Arg Glu Asp			
225	230	235	

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Met Ala Ala Leu Lys Ser Trp Leu Ser Arg Ser Val Thr Ser Phe Phe
 1 5 10 15
 Arg Tyr Arg Gln Cys Leu Cys Val Pro Val Val Ala Asn Phe Lys Lys
 20 25 30
 Arg Cys Phe Ser Glu Leu Ile Arg Pro Trp His Lys Thr Val Thr Ile
 35 40 45
 Gly Phe Gly Val Thr Leu Cys Ala Val Pro Ile Ala Gln Lys Ser Glu
 50 55 60
 Pro His Ser Leu Ser Ser Glu Ala Leu Met Arg Arg Ala Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Val Thr Asp Ser Thr Ser Thr Phe Leu Ser Gln Thr Thr Tyr Ala Leu
 85 90 95
 Ile Glu Ala Ile Thr Glu Tyr Thr Lys Ala Val Tyr Thr Leu Thr Ser
 100 105 110
 Leu Tyr Arg Gln Tyr Thr Ser Leu Leu Gly Lys Met Asn Ser Glu Glu
 115 120 125
 Glu Asp Glu Val Trp Gln Val Ile Ile Gly Ala Arg Ala Glu Met Thr
 130 135 140
 Ser Lys His Gln Glu Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Trp Met Thr Ala
 145 150 155 160
 Val Gly Leu Ser Glu Met Ala Ala Glu Ala Ala Tyr Gln Thr Gly Ala
 165 170 175
 Asp Gln Ala Ser Ile Thr Ala Arg Asn His Ile Gln Leu Val Lys Leu
 180 185 190
 Gln Val Glu Glu Val His Gln Leu Ser Arg Lys Ala Glu Thr Lys Leu
 195 200 205
 Ala Glu Ala Gln Ile Glu Glu Leu Arg Gln Lys Thr Gln Glu Glu Gly
 210 215 220
 Glu Glu Arg Ala Glu Ser Glu Gln Glu Ala Tyr Leu Arg Glu Asp
 225 230 235

10

20

<210> 3

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence

<400> 3

atggcggtctc tgaagagttg gctgttgccg agcgtaactt cattcttctg gtacagacag 60

30

tgtttgtgtg tttctgttgt ggctaactat aagaagcggg gtttctcaga aatgataaga 120
 ccaaggcaca aaactgtgac gattggctat ggagtaaccc tgtgagcggg tcctattgca 180
 cagaaatcag agccacattc cctttgtagt gaagcattga tgaggagtgc agtgtctttg 240
 gtaactgata gcacctctac ctttctctct ctgaccacat atgcattgat tgaagctatt 300
 actgaaaata ctaaggctgt ttatacctaa acttctcttt accgacaata aacaagttta 360
 cttgggataa tgaattcaga ggaggatgat gaagtgtggc aggtgttcat aggagccaga 420
 gctgagatga cttcaaaaaca ccaagtgtac ttgaagctgg aaacctcttg gatgactgca 480
 gttggtcatt cagagatggc agcagaagca gcatatcaaa ctggcacaga tcaggcctct 540
 ataaccgcca agaatacaca tcagcaggtg aaactgcagg tggaagagga gcaccagctc 600
 tcccgaaaag ctgaaaccaa gctggcagat gcacagatag aagagctccg tctgaaaaca 660
 caggaggtag gggaggagcg ggctgagtct gacgaggagg cctacctgcg tgtggattga 720

10

<210> 4
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence

<400> 4
 atggcgcgtc tgaagagttg gctgtcgccc agcgtaactt cattcttcac gtacagacag 60
 tgtttgtgtc ttctgttgtt ggctaccttt aagaagcggg gtttctcaga attcataaga 120
 ccatgccaca aaactgtgac gattgccttt ggagtaaccc tgtgtccggg tcctattgca 180
 cagaaatcac agcctcattc ccttactagt gaagcattga tgacgagagc agtgtctttg 240
 gtaagagata gcacctctac ctttgtctct cagaccacat atgggttgat tgaagctatt 300
 agtgaatata ctaaggctgt ttatacgtta acttctcttt accgacaata tacaagttta 360
 cttggggaaa tgaattcaga ggaggaagat gaggtgtggc aggtgatgat aggagccaga 420
 gctgagatga gttcaaaaaca ccaagactac ttgaagctgc aaaccacttg gatgactgca 480
 gttgtctctt cacagatggc agcagaagct gcatatcaaa ctgccgcaga tcaggcctct 540
 ataaccacca ggaatacaca tcagctcgtg aaactgcagg tggaagacgt gcaccagctc 600
 tccgggaaaag cagaaaccaa gctgggagaa gcacagatag aagagctgcg tcagaaaaca 660
 caggagggag gggaggagcg ggctgagtgg gacgaggagg cctacctggg tgaggattga 720

20

<210> 5
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence

<400> 5
 atggcggcac tgaagagttg gctgtcgcg agcgaaactt cattcttctg gtacagacag 60

30

```

tttttgtgtg ttctgtgtgt ggctatcttt aagaagcggg gttactcaga attgataaga 120
ccatggctca aaactgtgac gataggcttt ggagtaaccc tgtgtgcggt tcctattgca 180
cagtaatcag agcctcattc ccttagtaat gaagcattga tgaggtgagc agtgtctttg 240
gtaacagatt gcacctctac ctttcaactct cagaccacat atgcgttgaa tgaagctatt 300
actgtatata ctaaggctgt ttatacttta acttctcttt acggacaata tacaagttta 360
cttgggaaac tgaattcaga ggagcaagat gaagtgtggc aggtgatgat aggagccaga 420
gctgacatga cttcaaaaca ccaagactac ttgaagctgg aaagcacttg gatgactgca 480
gttgctcttt cagagatggc agcacaagct gcatatcaaa ctggggcaga tcaggcctct 540
ataacggcca ggaatcacat tcagctggtc aaactgcagg tggaagacgt gcaccagctc 600
tcccgaaac cagaaaccaa gctggcaca gcacagatag aagagctcgg tcagaaaaca 660
caggaggaac gggaggagcg ggctgagtgg gaggaggagg cctacctgcc tgaggattga 720

```

10

```

<210> 6
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

```

```

<400> 6
atggcgggtc tgatgagttg gctgtcgcga agcgaaactt cattcttttag gtactgacag 60
agttagtgtg ttctgtgtgt ggctatcttt tagaagcggg gtttctcaaa atagataaga 120
ccaaggcaca aaacagtgac gtttggcttt ggagttaccc tgagtgcgga tcctattgct 180
ctgaaatcag agcctcattc cctaagtaga gaagcattga tgtggtgagc agtgtctttg 240
gtaacagtta gctcctctac ctatcaactct cagaccacat atgcgttagat agaagctatt 300
actgtttata ctaaggctgt taatacctaa acttctcttt accgacttta tacaagttta 360
caagggaaaa tgaattcaga ggaggttgat gaagtgtggc aggagatcaa aggagccagt 420
gctgagatga cttcaatata ccaagtgtac ttgatgctgg aaaccactag gatgacagca 480
gttggactat cagagatggc agctgatgct gcatatcaaa caggcgcaga acaggcctct 540
atatccgcct ggaatcacat tcagcagggtg aatctgcagg aggatgaggt gcaccagctc 600
tccaggaaaa cagaaacctt gctggctgaa gcacagatag aagtgtctcg tctgaaaaca 660
ctggaggatg gggaggagcg ggctgagacg gaggaggagg ccaaccagcg agaggattga 720

```

20

```

<210> 7
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

```

30

```

<400> 7
atggcggctc tgaagagttg cgtgtcgcgc agcgtaactt cattcttgcg gtacagacag 60

```

tgtttcgggtg ttctgtgtgt ggctaagctt aagaagcggg gtttctcacg attgataaga 120
 ccatgogaca aaactgtgac gattgcgttt ggagtaaccc tgtgtgccct tcctattgca 180
 cagaaatggg agcctcattc ccttacgagt gaagcattga tgaggagagc cgggtctttg 240
 gtaagcgata gcacctctac ctttctgtct gagaccacat atcggttgat tgaagctatt 300
 actgaatata ctaaccctgt ttatagggtt acttctcttt accgggaata tacaagttta 360
 cttgccaaaa tgaattcaga ccaggaagat gaagtgtggc acctgatcat aggagccaga 420
 cgtgagatga cttcaaaaca ccaacggtag ttgaagctgg aaaggacttg gatgactgca 480
 gttctctctt cagagatggc acgagaagct gcatatcaaa ctggcgcaga tcagcgtctt 540
 ataaccgcca ggaatcacat tcagctcctg aaactgcacc tggaagaggt gcaccagctc 600
 tcggccaaag cagaaaccaa gctggcagaa gcacagatag aagagctccg tcagaaaaca 660
 caccaggaag gggaggagcg ggctgagtcg gaccaggagg cctagctgcg tgaggattga 720

10

<210> 8

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence

<400> 8

atggaggctc tgacgagttg gctgtcgagc agcctaactt cattcatcag gtacacacag 60
 tgattgtctg ttctgtgtgt ggctaactat aacaagcggg gattctcaca attgataaga 120
 ccaagccaca aaactgtgac gaatgccttt ggagtaaccc tgtgacgggt tcctatacca 180
 cagaaatcag agcctcattc cctacgtagt gaagcattac tgaggagagc agtgtctttg 240
 gtaacagaac gcacctctac cttagtctct cagaccacat atgcgttggt tgaaggtatt 300
 actgtatata gtaaggctgt ttataccttt agttctcttt tgcgacaata tacaagttta 360
 gttgggaaat tgaattcaga ggtggaagat gaagtgtggg aggtgatcat tggagccaga 420
 ggtgagttga gttcaaaaca ccaagtgtag ttgaagctgg atacgacttg gatgactgca 480
 gttgcacttt cagagatgcc agcagaagca gcatatcaaa ctggcgcaga tcagcactct 540
 ataaccacaa ggaatcacat tcagctgcag aaactgcagg tggaagagca gcaccagctc 600
 tcccgaaaac aagaaaccaa gctcacagaa gcacagatag aagagccacg tcagaaaaca 660
 cacaaggaag gggaggagcg ggctgagtta gacaggagg tatacctgcg tgaggattga 720

20

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D

(72)発明者 ワン, ジアオドン
アメリカ合衆国 テキサス 7 5 3 9 0 - 9 0 5 0 , ダラス, ハリー ハイન્ズ プールバード
5 3 2 3 , デパートメント オブ バイオケミストリー, ユー. ティー. サウスウェスタン メデ
ィカル センター

(72)発明者 デュ, チューニン
アメリカ合衆国 テキサス 7 5 3 9 0 - 9 0 5 0 , ダラス, ハリー ハイન્ズ プールバード
5 3 2 3 , デパートメント オブ バイオケミストリー, ユー. ティー. サウスウェスタン メデ
ィカル センター

審査官 松田 芳子

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/09
CA(STN)
REGISTRY(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)

专利名称(译)	caspase的激活剂		
公开(公告)号	JP3851819B2	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	JP2001550259	申请日	2001-01-05
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
当前申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	ワンジアオドン デュチューニン		
发明人	ワン,ジアオドン デュ,チューニン		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/09 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/50		
CPC分类号	C07K14/4747		
FI分类号	C07K14/47 C12N15/00.ZNAA C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/53.D		
审查员(译)	松田良子		
优先权	09/479309 2000-01-06 US		
其他公开文献	JP2003518943A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供与胱天蛋白酶激活剂多肽例如胱天蛋白酶激活剂多肽和多核苷酸序列诊断有关的方法和组合物。 这些序列以及体现这些序列的多肽和多核苷酸检测和/或调节活化剂或胱天蛋白酶或编码此类活化剂的基因或转录本的表达和/或功能。 ，找到与生产针对胱天蛋白酶激活因子的遗传和免疫探针有关的多种诊断和治疗应用。

ハイブリダイゼーション 条件#	ハイブリダイゼーション バッファー	ハイブリダイゼーション 温度	洗浄バッファー	洗浄温度
1	R	25°C	L	35°C
2	R	25°C	L	40°C
3	R	27°C	L	47°C
4	R	34°C	H	45°C
5	R	40°C	F	45°C
6	O	40°C	E	50°C
7	M	40°C	E	55°C
8	L	42°C	D	60°C
9	H	42°C	C	65°C
10	G	42°C	B	70°C