

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508611

(P2005-508611A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-502036 (P2003-502036)	(71) 出願人	598125981
(86) (22) 出願日	平成14年6月6日 (2002.6.6)		サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシ
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月8日 (2003.12.8)		エルシェ・シヤンティフィック
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/007064		Centre National de
(87) 国際公開番号	W02002/098916		la Recherche Scient
(87) 国際公開日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		ifique
(31) 優先権主張番号	01401476.5		フランス国、75794 パリ・セデクス
(32) 優先日	平成13年6月7日 (2001.6.7)		16、リュ・ミシェル・アーンジュ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		3
		(74) 代理人	100058479
			弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100091351
			弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞成長又は細胞増殖の調節に関与する遺伝子の転写制御因子。該制御因子の治療剤又は診断剤としての使用

(57) 【要約】

遺伝毒性的損傷又は異常増殖の際における細胞増殖の調節を維持するためには、腫瘍抑制遺伝子 p 5 3 及び I R F 1 (インターフェロン制御因子 1) の構成的な発現が必要とされる。 G A A P - 1 又は G A A P - 2 と表記される正の転写因子 (I R F 1 と p 5 3 に共通の配列を結合する因子) を結合する p 5 3 及び I R F - 1 の両遺伝子のプロモーター領域内に存在する転写制御因子。本発明は、 G A A P - 1 又は G A A P - 2 c D N A の同定とクローニングに、及び選択的にスプライシングされた P R D I I - B F 1 m R N A 前駆体の 7 5 k D a 産物に対応するコードされたタンパク質の同定に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 図 1 4 A に示されている番号 1 で表される D N A 配列又は図 1 4 B に示されている番号 3 で表される D N A 配列を備えたヌクレオチド配列、

(2) 図 1 5 A に示されている番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列又は図 1 5 B に示されている番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(3) 図 1 4 C に示されている番号 5 で表される D N A 配列を備えたヌクレオチド配列、

(4) 図 1 5 C に示されている番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、 10

(5) (1)、(2)、(3)、又は(4)に記した配列から誘導されるヌクレオチド配列であって、修飾によって得られたヌクレオチド配列が、D N A 配列 A A A T G N N N N C (N は任意のヌクレオチド (G、A、C、又は T (U))) を有する I P C S という名称のヌクレオチド配列を結合することができるポリペプチドをコードするように、前記配列が、とりわけ 1 以上のヌクレオチドの欠失、付加、又は置換によって修飾されているヌクレオチド配列、

の中から選択されるヌクレオチド配列の使用であって、I P C S という名称の前記ヌクレオチド配列と相互作用することが可能であり、且つ前記 I P C S 配列の制御下に置かれた、前記真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写するための正の転写因子として作用することが可能であるポリペプチドを所定の真核細胞中で発現するための使用。 20

【請求項 2】

細胞成長、細胞増殖、細胞分化、又は細胞のアポトーシスの調節に関与する遺伝子の中から選択される遺伝子に対する正の転写因子として作用するポリペプチドを発現させるための、請求項 1 に記載のヌクレオチドの使用。

【請求項 3】

前記ヌクレオチド配列が前記 P R D I I - B F 1 遺伝子の転写物の 2 . 5 k b コード配列に対応する c D N A を備える、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 4】

開始コドンが前記 P R D I I - B F 1 遺伝子のエキソン I I I の上流に付加される請求項 3 に記載の使用。 30

【請求項 5】

前記ヌクレオチド配列が前記 P R D I I - B F 1 遺伝子のエキソン I I I、V、V I、V I I、V I I I、及び I X が連続したものを備え、前記ヌクレオチド配列が、G A A P - 1 の場合には前記 P R D I I - B F 1 遺伝子のエキソン I V を欠き、G A A P - 2 の場合にはエキソン I V の最初の 4 5 ヌクレオチドを含有する、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 6】

前記ヌクレオチド配列が、番号 2 若しくは番号 4 で表されるアミノ酸配列を備える G A A P - 1 ポリペプチドをコードし、又は番号 6 で表されるアミノ酸配列を備える G A A P - 2 ポリペプチドをコードする、請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の使用。 40

【請求項 7】

前記ヌクレオチドが前記 G A A P - 1 ポリペプチド又は前記 G A A P - 2 ポリペプチドのバリエーションをコードし、I P C S 配列を結合する G A A P - 1 又は G A A P - 2 の特性及び前記 I P C S 配列の調節下に置かれ且つ真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写するための転写因子として作用する G A A P - 1 又は G A A P - 2 の特性を保持するように、1 又は数個のアミノ酸残基を挿入、欠失、又は置換することによって、前記バリエーションが G A A P - 1 又は G A A P - 2 から誘導される、請求項 1 乃至 5 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

ストリンジェントな条件下で、前記ヌクレオチド配列が、番号 1 若しくは番号 3 で表され 50

るDNA配列とハイブリダイズし、又は番号5で表されるDNA配列とハイブリダイズする、請求項1乃至6の何れか1項に記載の使用。

【請求項9】

前記ヌクレオチド配列が、構成的プロモーター又は誘導性プロモーターの中から選択されるプロモーター配列の調節下に置かれている、請求項1乃至8の何れか1項に記載されたヌクレオチド配列の使用。

【請求項10】

前記真核細胞が悪性細胞である、請求項1乃至9の何れか1項に記載されたヌクレオチド配列の使用。

【請求項11】

前記真核細胞が発達した腫瘍の細胞である、請求項1乃至10の何れか1項に記載された使用。

【請求項12】

細胞のアポトーシスを調節するための、請求項1乃至9の何れか1項に記載されたヌクレオチド配列の使用。

【請求項13】

転写活性の正の制御が、p53、IRF1、Rb、p21(WAF1)、p27、wt1、bax、TNF受容体、及びFASの中から選択される遺伝子に対して得られる、請求項1乃至12の何れか1項に記載されたヌクレオチド配列の使用。

【請求項14】

転写活性の正の制御によって、前記被処理細胞中に存在する複数の遺伝子の転写が制御可能となる、請求項1乃至13の何れか1項に記載されたヌクレオチド配列の使用。

【請求項15】

番号1で表されるDNA配列を備えたヌクレオチド配列であって、PRDII-BF1遺伝子中でエキソンIVを形成する配列を欠いたヌクレオチド配列。

【請求項16】

番号1で表されるDNA配列からなる、請求項15に記載されたヌクレオチド配列。

【請求項17】

請求項15又は16の何れかに記載されたヌクレオチド配列から誘導されるヌクレオチド配列であって、

(1)番号1、番号3、又は番号5で表される前記DNA配列又はそれらの変異配列の存在を検出するための特異的プローブとして使用することができる、番号1で表されるDNA配列(図14A)の断片又は番号3で表されるDNA配列(図14B)の断片、

(2)番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又は番号4で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又は番号6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(3)(1)又は(2)に記載されている配列から誘導されるヌクレオチド配列であって、該配列は、とりわけ1以上のヌクレオチドの欠失、付加、又は置換によって修飾されており、修飾によって得られるヌクレオチド配列は、DNA配列AAATGRYKKCを有するIPCSという名称のヌクレオチド配列を結合することができるポリペプチドをコードしているとともに、適切な条件下で使用したときに、所定の真核細胞中において、IPCSという名称のヌクレオチド配列と相互作用し且つ前記IPCS配列の制御下に置かれ、前記真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写する正の転写因子として作用するポリペプチドを発現することができるヌクレオチド配列

【請求項18】

2001年5月29日に、受託番号01052921でECCCに寄託されたプラスミドpGAAP-1上に含有されるヌクレオチド配列。

【請求項19】

IPCSという名称のヌクレオチド配列と相互作用することが可能であり、且つ前記IP

10

20

30

40

50

C S 配列の調節下に置かれたヌクレオチド配列であり真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写するための正の転写因子として作用することが可能であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を真核細胞中で発現させた産物である、組換えポリペプチド。

【請求項 20】

請求項 15 乃至 18 の何れか 1 項に記載されたヌクレオチド配列を真核細胞中で発現させた産物である、組換えポリペプチド。

【請求項 21】

p 53 と I R F 1 の中から選択される遺伝子を構成的に発現する真核細胞中で発現したときに、前記遺伝子の転写活性を制御する、請求項 19 乃至 20 の何れかに記載された組換えポリペプチド。

10

【請求項 22】

S D S P A G E 電気泳動による見かけの分子量が 75 k D a である、請求項 19 乃至 21 の何れか 1 項に記載された組換えポリペプチド。

【請求項 23】

請求項 15 乃至 18 の何れか 1 項に記載されたヌクレオチド配列を哺乳類細胞から選択された真核細胞中で発現させた産物である組換えポリペプチドであって、前記真核細胞中で可能な翻訳後修飾を含んだ組換えポリペプチド。

【請求項 24】

番号 2 で表されるアミノ酸配列、又は番号 4 で表されるアミノ酸配列、又は番号 6 で表されるアミノ酸配列を備えた、請求項 19 乃至 23 の何れか 1 項に記載の組換えポリペプチド。

20

【請求項 25】

番号 2 で表されるアミノ酸配列の断片を備えた請求項 19 乃至 23 の何れか 1 項に記載された組換えポリペプチドであって、I P C S という名称のヌクレオチド配列と相互作用して、前記 I P C S 配列の調節下に置かれ且つ真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写するための正の転写因子として作用することが可能である組換えポリペプチド。

【請求項 26】

請求項 15 乃至 18 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列の挿入によって組換えられた組換え真核細胞。

【請求項 27】

前記挿入されたヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを発現する請求項 26 に記載の組換え真核細胞。

30

【請求項 28】

細胞成長、細胞増殖、細胞分化、又は細胞のアポトーシスの調節に関与する遺伝子を通常発現している細胞の中から選択される、請求項 26 又は 27 に記載の組換え真核細胞。

【請求項 29】

悪性細胞である請求項 26 乃至 28 の何れか 1 項に記載の組換え真核細胞。

【請求項 30】

I P C S という名称のヌクレオチド配列と相互作用することが可能であり、前記 I P C S 配列の制御下に置かれ且つ前記真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写するための正の転写因子として作用することが可能であるポリペプチドが、適切な条件下で、発現できるようにするために、I P C S という名称で D N A 配列 A A A T G N N N N C を備えたヌクレオチド配列を結合することが可能なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列で組換えられた組換え真核細胞。

40

【請求項 31】

前記ポリペプチドが、番号 2 で表されるアミノ酸配列、又は番号 4 で表されるアミノ酸配列、又は番号 6 で表されるアミノ酸配列を備えた、請求項 26 乃至 30 の何れか 1 項に記載の組換え真核細胞。

【請求項 32】

U 937、K 562、S K - N - S H、M C F 7、K G 1、T F 1 の中から選択される、

50

請求項 2 6 乃至 3 1 の何れか 1 項に記載の組換え真核細胞。

【請求項 3 3】

請求項 1 5 乃至 1 8 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列からなる挿入物によって組換えられた組換えベクター。

【請求項 3 4】

真核細胞中で前記挿入物を発現させるのに適した発現ベクターである請求項 3 3 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 5】

前記挿入物を一過性に発現させ又は調節して発現させるのに適した、請求項 3 4 に記載の組換えベクター。

10

【請求項 3 6】

生理的に許容される化合物によって制御されるプロモーターの調節下に前記挿入物が置かれている、請求項 3 4 又は 3 5 の何れか 1 項に記載の組換えベクター。

【請求項 3 7】

前記挿入物の転写が外来のトランス活性化システムの調節下に置かれている、請求項 3 4 又は 3 5 の何れか 1 項に記載の組換えベクター。

【請求項 3 8】

遺伝子治療に適した請求項 3 4 乃至 3 7 の何れか 1 項に記載の組換えベクター。

【請求項 3 9】

ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、アデノウイルス、A A V ベクターの中から選択される、請求項 3 8 に記載の組換えベクター。

20

【請求項 4 0】

治療用途に適した組成物であって、請求項 1 5 乃至 1 8 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列又は請求項 2 6 乃至 3 2 の何れか 1 項に記載の組換え細胞又は請求項 1 9 乃至 2 5 の何れか 1 項に記載の組換えポリペプチドを備えた組成物。

【請求項 4 1】

抗ウイルス剤と抗癌剤の中から選択される治療剤と併用される請求項 4 0 に記載の組成物であって、前記併用が、前記組成物と前記治療剤を時間若しくは部位的に同時に又は別個に使用することによって達成される組成物。

【請求項 4 2】

前記抗癌剤が免疫治療剤、化学療法剤、又は放射線治療である、請求項 4 1 に記載の組成物。

30

【請求項 4 3】

悪性細胞を治療するための請求項 4 0 乃至 4 2 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

請求項 1 5 乃至 1 8 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列又は請求項 2 6 乃至 3 2 の何れか 1 項に記載の組換え細胞又は請求項 1 9 乃至 2 5 の何れか 1 項に記載の組換えポリペプチドの使用であって、細胞成長、細胞増殖、細胞分化、又は細胞のアポトーシスの調節に関与する遺伝子のプロモーター配列中に存在する I P C S 配列と相互作用することが可能であり、且つ前記 I P C S 配列の制御下に置かれたヌクレオチド配列の転写を制御することが可能である化合物をスクリーニングする生物学的ツールを調製するための使用。

40

【請求項 4 5】

欠陥のある B R D I I - B F 1 遺伝子をインビトロで検出する方法であって、

- 番号 1 若しくは番号 3 若しくは番号 5 で表されるヌクレオチド配列、又は B R D I I 遺伝子のエキソン V I の中に位置するドメインに対応する Z n フィンガー結合ドメインを備えたそれらの断片から構成されるプローブを、前記遺伝子を通常構成的に発現している細胞の D N A と、ストリンジェントな条件で接触させる工程と、

- 前記プローブと前記細胞の D N A とのハイブリダイゼーション産物を検出する工程と、
を備えた方法。

50

【請求項 46】

細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスの調節に関与する遺伝子の転写活性の欠陥をインビトロで検出する方法であって、I P C S 配列を結合できるポリペプチドを本来コードしており、その結果、前記 I P C S 配列の調節下に置かれたヌクレオチド配列の転写を正に制御するはずである前記遺伝子の転写物の産生欠陥を検出する工程、を備えた方法。

【請求項 47】

細胞が悪性状態に転換されるのを予後にインビトロで検出する方法であって、前記細胞中で通常発現される P R D I I - B F I 遺伝子中に突然変異を検出するか、又は前記遺伝子のスプライシングによって得られた転写物中に突然変異を検出する工程を備え、前記突然変異が発現の欠如をもたらすか又は I P C S 配列に結合することができる前記 P R D I I - B F I 遺伝子のポリペプチド発現産物の異常発現をもたらす、方法。

10

【請求項 48】

プロモーター領域中に I P C S 配列を含有し、細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスを調節する活性を有する遺伝子の転写活性を制御することができる化合物をスクリーニングする方法であって、

- プロモーター領域中に I P C S 配列を含有する遺伝子が発現している細胞の D N A に前記アッセイすべき化合物を接触させる工程と、

- D N A - 化合物複合体の形成を検出し、I P C S 配列を含有する前記遺伝子に対する転写活性をアッセイする工程と、

20

を備えた方法。

【請求項 49】

G A A P - 1 又は G A A P - 2 のアゴニストとして使用するのに適した分子をスクリーニングするための、請求項 19 乃至 25 の何れか 1 項に記載の組換えポリペプチドの使用。

【請求項 50】

G A A P - 1 又は G A A P - 2 のアンタゴニストとして使用するのに適した分子をスクリーニングするための、請求項 19 乃至 25 の何れか 1 項に記載の組換えポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞成長又は細胞増殖の調節に関与する遺伝子の転写制御因子に関し、治療又は診断手段を調製するための前記遺伝子の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトの体内では、特定の遺伝子（この中には、細胞内で構成的に発現されているものもある）の発現等多くのパラメータによって、細胞が悪性状態に転化しないように調節されている。悪性細胞への転換を取り除くために、あるいは、このような状態が腫瘍の形成へと進行するのを停止させるために、さらに、ある種の事例では悪性状態を正常な状態に回復させるために、とりわけ新しい治療的アプローチや製品等のツールを発見する目的で、細胞の悪性転換の機序を明らかにすることに多大な努力がこれまで注力されてきた。

40

【0003】

癌研究の分野では、細胞の悪性状態への転換に際して、その制御が影響を受ける遺伝子が細胞の中に幾つか同定されている。このような遺伝子には、「癌抑制遺伝子」が含まれ、既に幾つかの癌抑制遺伝子が同定、クローニングされ、配列決定されている。これらの遺伝子の中でも、p 53 と I R F 1 (I n t e r f e r o n R e g u l a t o r y F a c t o r 1) は、その性状が特に明らかとなっている遺伝子であり、悪性細胞の成長を阻止するためには、遺伝毒性的損傷又は異常増殖に際する細胞増殖の調節において、それらを維持することが必要であることが示されている。

50

【 0 0 0 4 】

細胞の悪性状態への転換の防止に p 5 3 と I R F 1 遺伝子が関与しているという観察から始まって、本発明者らはそれらの制御について研究を行い、これらの遺伝子によって調節される調節機能に相互作用を及ぼす方法を発見した。

【 0 0 0 5 】

本発明は、細胞の悪性状態への転換を妨げることができる手段、又は細胞のアポトーシスを可能とすること等によってこのような細胞の伝搬を調節するために使用することができる手段であって、少なくともある程度まで、幾つかの欠点、特に、p 5 3 又は I R F 1 遺伝子の活性レベルが不十分であるというこれらの遺伝子を用いて治療プロトコルを設計したときに見られる欠点を克服することが可能な手段を提供する。

10

【 0 0 0 6 】

本発明によって、正常な増殖又は細胞の分化を維持する機能を有する広範な遺伝子の転写を調節することが実際に可能となるであろう。

【 0 0 0 7 】

文献 (L a l l e m a n d C . e t a l , 1 9 9 7) によれば、「 I R F 1 p 5 3 共通配列 (I P C S) 」と表記される配列であって、被トランスフェクト U 9 3 7 細胞中の異種プロモーターの制御下に置かれたレポーター配列の転写活性を顕著に増加させる配列が、I R F 1 及び p 5 3 癌抑制遺伝子の何れのプロモーター領域中にも存在することが開示されている。

【 0 0 0 8 】

この文献によれば、I P C S 配列は、配列 A A A T G R Y K K C M M S (I U A P コード) (この文献によれば、I P C S 結合因子 (I P C S - B F) と表記される核因子を結合することが示されている。) に応答する縮退したモチーフとして定義されている。前記 I P C S - B F 因子は、健康なドナーから得た U 9 3 7 細胞及び末梢血単核細胞の核抽出物中に構成的に存在する 2 6 k D a の単一ポリペプチドから構成される。L a l l e m a n d C . らの前記文献によれば、p 5 3 及び I R F 1 遺伝子の転写制御は、I P C S - B F 因子の I P C S 配列への結合によって影響を受けると考えられている。

20

【 発明の開示 】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、同一の P R D I I - B F 1 遺伝子の発現を起源とし、G A A P - 1 及び G A A P - 2 (G a t e k e e p e r o f A p o p t o s i s A c t i v a t i n g P r o t e i n s) と表記される二つの種類が含まれ、少なくとも p 5 3 と I R F 1 遺伝子の転写制御に影響を与える新規関連転写因子を同定するに至った。本発明によれば、これらの G A A P - 1 と G A A P - 2 因子は、p 5 3 及び I R F 1 の両遺伝子のプロモーター領域中に見出される I P C S 配列に特異的に結合する。G A A P - 1 は、公知の遺伝子である P R D I I - B F 1 (F a n C . M . a n d M a n i a t i s , T . , 1 9 9 0 ; M u c h a r d t C . e t a l , 1 9 9 2) の選択的スプライス産物である約 7 5 k D a のタンパク質に対応する。

30

【 0 0 1 0 】

G A A P - 2 は、P R D I I - B F 1 遺伝子の別の選択的スプライシング産物である。G A A P - 2 は、G A A P - 1 のアミノ酸配列に対して付加された 2 3 アミノ酸残基を含有している。

40

【 0 0 1 1 】

P R D I I - B F 1 遺伝子は、広く間隔が開いた 2 つの Z n フィンガーを有する 3 0 0 k D a の細胞タンパク質をコードする遺伝子として開示されている。P R D I I - B F 1 遺伝子は、それぞれ、2 0 0 k D a 及び 7 0 k D a のタンパク質をコードするスプライシングされた遺伝子産物の選択的な産生を可能にすることも示されている。スプライシングされた型の P R D I I - B F 1 c D N A は、上記した M u c h a r d t C . らの文献に開示されており、短い転写物はエキソン I V に対応する P R D I I - B F 1 遺伝子のヌクレオチド配列を欠いていることを示している。

50

【0012】

従って、この短い転写物は、PRDII-BF1遺伝子のエキソンI、II、III、V、VI、VII、VIII、及びIXをコード配列として備え、Fanら1990を参照するMuchradtら1992に開示されている前記遺伝子の461位から6394位間の配列を欠如したcDNA配列を与える。

【0013】

本発明は、幾つかの遺伝子の制御領域中に存在する特異的な配列と相互作用し、従って、悪性細胞に関連する病態を含む様々な病態の治療的、診断的、又は予後的アプローチにおいて有用な手段を確立する新しい道を開く、GAPP-1及びGAPP-2を含む新規転写因子を同定する。上述の因子GAPP-1とGAPP-2は何れも、同一遺伝子(すなわち、PRDII-BF1)の選択的スプライシング産物に相当し、同一遺伝子のバリエーションと見ることができる。

10

【0014】

本発明は、

(1) 図14Aに示されている番号1で表されるDNA配列又は図14Bに示されている番号3で表されるDNA配列を備えたヌクレオチド配列、

(2) 図15Aに示されている番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列又は図15Bに示されている番号4で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(3) 図14Cに示されている番号5で表されるDNA配列を備えたヌクレオチド配列、

20

(4) 図15Cに示されている番号6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(5) (1)、(2)、(3)、又は(4)に記した配列から誘導されるヌクレオチド配列であって、修飾によって得られたヌクレオチド配列が、DNA配列AAATGNNNNC(Nは任意のヌクレオチド(G、A、C、又はT(U)))を有するIPCSという名称のヌクレオチド配列を結合することができるポリペプチドをコードするように、前記配列が、とりわけ1以上のヌクレオチドの欠失、付加、又は置換によって修飾されているヌクレオチド配列、

の中から選択されるヌクレオチド配列の使用であって、IPCSという名称の前記ヌクレオチド配列と相互作用することが可能であり、且つ前記IPCS配列の制御下に置かれた、前記真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写する正の転写因子として作用することが可能であるポリペプチドを所定の真核細胞中で発現するための使用に関する。

30

【0015】

上記ヌクレオチド配列は、前記したIPCS配列との相互作用、特にIPCS配列との結合を可能にする条件で、本発明の転写因子をコードする。

【0016】

IPCS配列は、Lallemantら、1997の先行文献に記載されており、概ね10ヌクレオチドの配列中に含まれる6ヌクレオチド残基のコンセンサス配列として存在する。該配列は、IUPACコードに基づいて記載されており、従って、GNNNNNの位置は、それぞれ、グアニンヌクレオチドと任意のヌクレオチド(G、A、C、又はT(U))にそれぞれ対応する。

40

【0017】

具体的なIPCS配列としては、以下のDNA配列、AAATGATTTCAC(p53遺伝子の場合)及びGAATGACGGCACG(IRF1遺伝子の場合)を有するIPCS配列がp53とIRF1遺伝子中に見出されている。この配列は、Rb、p21(WAF1)、p27、wt1、bax、TNF受容体、及びFAS遺伝子等の他の癌抑制遺伝子中にも見出されている。

【0018】

これらのIPCS配列を含有する遺伝子を参照することによって、これらのIPCS配

50

列が以下に記載されている。

【 0 0 1 9 】

遺伝子	位置	配列 I P C S	g e n e b a n k 参照番号
R b	6 8 0	a a a t g t a t t c	L 1 1 9 1 0
P 2 1	1 1 3 8	a a a t g t a t t c	U 2 4 1 7 0
P 2 1	1 8 7 6	a a a t g a a a a c	U 2 4 1 7 0
P 2 1	2 0 3 1	a a a t g g t g a c	U 2 4 1 7 0
P 2 1	4 3 1 4	a a a t g t g t c c	U 2 4 1 7 0
P 2 7	2 9 2	a a a t g g c a a c	A B 0 0 3 6 8 8
W t 1	1 8 2 8	a a a t g g g c t c	X 7 4 8 4 0
B a x	6 7 9	a a a t g g t g c c	U 1 7 1 9 3
B a x	6 9 4	a a a t g a a g g c	U 1 7 1 9 3
T N F r	9 4 6	a a a t g a a c a c	U 5 3 4 8 3
F A S	5 8 0	A a a t g t c a a c	U 3 1 9 6 8

10

番号 1、3、及び 5 で表される D N A 配列は、それぞれ、図 1 4 A、1 4 B、及び 1 4 C に示されている配列であって、それぞれ、G A A P - 1 及び G A A P - 2 と表記される。

【 0 0 2 0 】

番号 2、4、及び 6 で表される アミノ酸配列は、それぞれ、図 1 5 A、1 5 B、及び 1 5 C に示されている配列であって、それぞれ、G A A P - 1 及び G A A P - 2 と表記される。

20

【 0 0 2 1 】

図 1 5 B に開示されている G A A P - 1 の分子量の理論値と図 1 5 C に開示されている G A A P - 2 の分子量の理論値は、それぞれ、7 5 . 7 及び 7 7 . 5 k D a である。

【 0 0 2 2 】

G A A P - 1 をコードする前記 D N A 配列を基にして、本発明の上記ヌクレオチドに与えられる欠失、挿入、又は置換には、前記コードされる本発明のポリペプチドの特性が変異配列中においても保持される点変異又は複数のヌクレオチド変異が含まれる。好ましい実施態様によれば、このような変異配列は、元の配列の Z n フィンガードメインを保持している。

30

【 0 0 2 3 】

ある変異配列は、図 1 5 C に示されている G A A P - 2 をコードする D N A 配列を包含する。図 1 5 B に示されている G A A P - 1 アミノ酸配列は、図 1 5 A に示されている G A A P - 1 のバリエーションであって、P R D I I - B F 1 遺伝子のエキソン I I I から翻訳されるアミノ酸配列を付加することによって得られる。

【 0 0 2 4 】

本発明のヌクレオチド配列は、とりわけ、単離された又は精製されたヌクレオチド配列である。

【 0 0 2 5 】

本発明は、とりわけ、細胞成長 (c e l l u l a r g r o w t h)、細胞増殖 (c e l l u l a r p r o l i f e r a t i o n)、細胞分化、又は細胞のアポトーシスの調節に關与する遺伝子の中から選択される遺伝子に対する正の転写因子として作用するポリペプチドを発現するための、上記の定義に適合するヌクレオチド配列の使用に関する。前記遺伝子には、上記した癌抑制遺伝子が含まれる。

40

【 0 0 2 6 】

本発明において、細胞成長、細胞増殖、細胞分化、又は細胞のアポトーシスの発現を「調節する (c o n t r o l) 」とは、用いたヌクレオチド配列が、直接又は間接に、単独で又は他の細胞若しくは非細胞性因子との複合効果の結果として、細胞の成長、増殖、分化、又はアポトーシスに対して、質的又は量的に影響を与え得ることを意味する。

【 0 0 2 7 】

50

本発明のある実施態様では、本発明のヌクレオチド配列の欠失は、分化又は自発的アポトーシス又は遺伝毒性を有する薬物による誘導性アポトーシスを引き起こすことができる。

【0028】

この「調節」における前記ヌクレオチドの使用の影響を検出するためのアッセイとしては、所定の遺伝子（例えば、p53又はIRF1遺伝子）の発現に対する該ヌクレオチド配列の発現産物の活性の影響を、所定の細胞中で、本発明の前記ヌクレオチド配列が発現していない条件下における同一遺伝子の発現と比較することが考えられる。

【0029】

本発明の第一の好ましい実施態様によれば、使用するヌクレオチド配列は、PRDII-BF1遺伝子の転写物の2083ヌクレオチド（nt）のコード配列（具体的なコード配列は図14Aに示されている。）に対応するcDNAを備えている。

10

【0030】

本発明の別の実施態様によれば、使用するヌクレオチド配列は、特に、PRDII-BF1遺伝子のエキソンIとIIに対応するヌクレオチドを欠失させ、PRDII-BF1遺伝子のエキソンIIIの上流に開始コドンが付加して、真核細胞中でポリペプチドが発現できるようにすることによって、前記2.5kbの配列に対して、又は図14Aに示されているコード配列に対して修飾が施される。具体的なコード配列は、図14Bに示されている。

【0031】

20

このように、本発明のある実施態様では、使用するヌクレオチド配列は、PRDII-BF1遺伝子のエキソンIII、V、VI、VII、VIII、及びIXの連続を備え、GAAP-1の場合には、前記ヌクレオチド配列はPRDII-BF1遺伝子のエキソンIVを欠如しており、GAAP-2の場合には、エキソンIVの最初の45ヌクレオチドを含有している。

【0032】

本発明のさらなる実施態様によれば、使用するヌクレオチド配列は、PRDII-BF1遺伝子の選択的転写物の2152ntコード配列に由来するcDNAを備えている。この実施態様の配列は、図14Bと14Cに記されている。

【0033】

30

図14Bと14Cに記されている配列は、図14Aに記されている配列のバリエーションと考えることもできる。図14Cに示されているバリエーションは、69の連続するntの付加、すなわち、エキソンIII中に24nt、エキソンIV中に45ntが付加されることによって得られる。

【0034】

本発明の別の実施態様では、使用するヌクレオチド配列は、番号2で表されるアミノ酸配列を備えたGAAP-1ポリペプチドをコードし、又は番号4で表されるアミノ酸配列を備えたGAAP-1ポリペプチドをコードする。

【0035】

あるいは、用いるヌクレオチド配列は、GAAP-1ポリペプチドのバリエーションをコードし、該バリエーションは、IPCS配列を結合するGAAP-1の特性を保持し、IPCS配列の制御下に置かれ且つ真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写させる転写因子として作用する特性を保持するように、1又は複数のアミノ酸残基を挿入、欠失、又は置換することによってGAAP-1から誘導される。

40

【0036】

GAAP-2は、エキソンIIIとIVから翻訳される特定の23アミノ酸残基が付加されることによって、選択的スプライシングの結果として付加されたヌクレオチド残基を有するGAAP-1のバリエーションと考えることができる。付加される23アミノ酸残基は、図15Aの配列に以下の配列

M G Q K F Q K K K S Y R L V L K E L R N P L K

50

が付加されたポリペプチドを形成する。

【 0 0 3 7 】

G A A P - 2 の翻訳の開始は、G A A P - 1 に対して作用する A T G と同一の A T G の制御下にある。

【 0 0 3 8 】

本発明は、ストリンジェントな条件下で、配列番号 1 で表される D N A 配列とハイブリダイズすることが可能な前記ヌクレオチド配列のバリエーション、特により短い配列を使用することも包含する。本発明におけるストリンジェントな条件は、60 のハイブリダイゼーション温度と N a C l 4 0 m M S D S 0 . 5 % 中での三段階での洗浄を必要とする。

10

【 0 0 3 9 】

次いで、ハイブリダイズされた転写物は、例えば、ノーザンブロット又は電気泳動によって同定し、選択される。

【 0 0 4 0 】

本発明において、使用するヌクレオチド配列は、ポリペプチド発現を可能とするために、構成的又は誘導性プロモーターから選択されるプロモーター配列の制御下におくことができる。制御要素、特にプロモーターは、企図する発現の最終目的に応じて選択される。前記プロモーターは、当業者によって一般的に使用されるプロモーターであり、例えば、C M V、5 V 4 0、 β -アクチン、e F 1 α の中から選択される。

【 0 0 4 1 】

上記のヌクレオチド配列の特に好ましい使用は、該ヌクレオチド配列の挿入によって形質転換された真核細胞は悪性細胞であるという事実によって特徴付けられる。

20

【 0 0 4 2 】

本発明において「悪性細胞」とは、その起源が何であれ、イオン化、放射線、遺伝毒性を有する薬物、ウイルスの癌遺伝子等を含む遺伝毒性的損傷の結果、成長、分化又は増殖が変化した細胞である。

【 0 0 4 3 】

別の用途では、上記ヌクレオチド配列の 1 つを挿入することによって形質転換された前記真核細胞は、発達した腫瘍の細胞である。

【 0 0 4 4 】

本発明の別の好ましい実施態様では、本発明のヌクレオチド配列を用いることによって、細胞のアポトーシスの調節が可能になる。

30

【 0 0 4 5 】

細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスを調節する効果は、p 5 3、I R F 1、R b、p 2 1 (W A F 1)、p 2 7、w t、b a x、T N F 受容体、及び F A S から選択される遺伝子、より有利には、被処理細胞中に存在する複数の遺伝子の転写活性を正に制御して、効率の増大を可能とすることを通じて、本発明により達成することができる。

【 0 0 4 6 】

細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスの調節に関わる複数の遺伝子のプロモーター領域に I P C S 配列が存在する結果、本発明は、共通の経路を通じ、おそらくは一種の化合物を用いることにより、複数の遺伝子の調節というこの機能と広く相互作用させる方法を提供する。本発明は、このように、上記調節の変化を処理するのに、より高い効率性を有し得る手段を提供する。

40

【 0 0 4 7 】

本発明は、番号 1 又は 3 で表される D N A 配列を備えたヌクレオチド配列であって、P R D I I - B F 1 遺伝子中のエキソン I V を形成する配列を欠いたヌクレオチド配列にも関する。

【 0 0 4 8 】

本発明のある実施態様では、該ヌクレオチド配列は、番号 1 又は番号 3 で表される D N

50

A 配列からなる (図 1 4 A 又は図 1 4 B) 。

【 0 0 4 9 】

本発明は、番号 5 で表される D N A 配列を備えたヌクレオチド配列であって、配列番号 1 の配列に 6 9 のヌクレオチドが付加されたヌクレオチド配列にも関する。

【 0 0 5 0 】

本発明のある実施態様では、該ヌクレオチド配列は、番号 5 で表される D N A 配列からなる (図 1 4 C) 。

【 0 0 5 1 】

該 D N A 配列は、c D N A ライブラリーから単離され得るので、c D N A 配列と表記されることがある。「c D N A」という表現により、本発明が包含するのは、m R N A の逆転写によって得られる完全長の D N A 配列のみに限られない。本発明は、遺伝子の転写物の O R F に対応するコード配列、又は適切な条件で用いたときに、本発明において規定した前記特性を有するポリペプチドの発現を可能にするのに十分な任意のコード配列を備え又は任意のコード配列からなる D N A 配列も包含する。

10

【 0 0 5 2 】

本発明のコード配列は、このように、前記ポリペプチドを発現させるための異種プロモーターの制御下に置くことができ、適切であれば、さらなる制御配列又は別の制御配列の制御下に置くことができる。

【 0 0 5 3 】

従って、本発明には、宿主細胞又は標的細胞中でクローニング及び / 又は発現用の制御配列を備えた組換えヌクレオチド配列中に含まれた前記コード配列が包含される。

20

【 0 0 5 4 】

上記のヌクレオチド配列から得られるヌクレオチド配列は、

(1) 番号 1、3、若しくは 5 で表される前記 D N A 又はそれらの変異配列の存在を検出するための特異的プローブとして使用することができる、番号 1 で表される D N A 配列 (図 1 4 A) の断片又は番号 3 で表される D N A 配列 (図 1 4 B) の断片、

(2) 番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又は番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又は番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

30

(3) (1) 又は (2) に記載されている配列から誘導されるヌクレオチド配列であって、該配列は、とりわけ 1 以上のヌクレオチドの欠失、付加、又は置換によって修飾されており、修飾によって得られるヌクレオチド配列は、D N A 配列 A A A T G R Y K K C を有する I P C S という名称のヌクレオチド配列を結合することができるポリペプチドをコードしているとともに、適切な条件下で使用したときに、所定の真核細胞中において、I P C S という名称のヌクレオチド配列と相互作用し且つ前記 I P C S 配列の制御下に置かれ、前記真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写する正の転写因子として作用するポリペプチドを発現することができるヌクレオチド配列。

【 0 0 5 5 】

好ましいヌクレオチド配列は、2 0 0 1 年 5 月 2 9 日に、寄託番号 0 1 0 5 2 9 2 1 で E C A C C (イギリス) に寄託されたプラスミド p G A A P - 1 上に含有される G A A P - 1 のヌクレオチド配列である。

40

【 0 0 5 6 】

但し、本発明は、P R D I I コード配列 (図 1 4 に P R D I I と表記されている配列) それ自体に関するものではない。また、本発明は、コードされている P R D I I という名称の配列 (図 1 5 に表記されている配列) に関するものでもない。

【 0 0 5 7 】

P R D I I のコード配列とアミノ酸配列は、図 1 4 と 1 5 に矢印でマークされている位置が G A A P - 1 とは異なる。

【 0 0 5 8 】

50

本発明は、I P C S という名称のヌクレオチド配列と相互作用することが可能であり且つ前記I P C S 配列の制御下に置かれたヌクレオチド配列であって前記真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写させる正の転写因子として作用することが可能であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を真核細胞中で発現させた産物である、組換えポリペプチドにも関する。

【0059】

好ましい実施態様では、I P C S 配列の制御下に置かれた前記ヌクレオチド配列は、細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスの調節に関与する遺伝子である。

【0060】

本発明の別の定義によれば、本発明の組換えポリペプチドとは、上述したヌクレオチド配列を真核細胞中で発現させた産物である。 10

【0061】

好ましい組換えポリペプチドは、図15A、15B、又は15Cのアミノ酸配列を有する。

【0062】

本発明のある実施態様によれば、上記の定義に包含される組換えポリペプチドは、p53とIRF1の中から選択される遺伝子を構成的に発現している真核細胞中で発現されたときに、該遺伝子の転写活性を制御可能であることが認められる。

【0063】

このようなポリペプチドが遺伝子（所定の遺伝子でもよいし、未知の遺伝子でもよい）の転写活性の制御を達成する能力をアッセイするためには、U937（ATCC CRL 1593）、K562（ATCC CL243）、SK-N-SH（HTB 11）、MCF7（HTB 22）、又はKG-1（CL-246）を含む様々な細胞株を使用することができる。これらの細胞には、本発明のヌクレオチド配列がトランスフェクトされ、被検細胞株中で発現されるp53又はIRF遺伝子のI P C S 配列への結合能が検出され、続いて、転写活性がアッセイされる。 20

【0064】

本分野では、トランス作用因子として作用する化合物の結合能を検出するための様々な方法が記載されている。DNA-タンパク質複合体を同定する方法は、例えば、「Molecular Cloning-A laboratory Manual」（Sambrook and Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）に記載されているゲル遅延測定法によって産物を解析することを含む方法である。遺伝子の転写物を解析する方法も、本分野において周知である。このような方法には、例えば、上記の「Molecular Cloning-A laboratory Manual」中に記載されている転写ラン・オン法によって一次転写産物を解析することが含まれる。同じく「Molecular Cloning-A laboratory Manual」に記載されている他の方法には、制御要素の活性のマーカーとしてレポーター遺伝子を用いること、例えば、CAT（chloramphenicol acetyltransferase）、ルシフェラーゼ、又はβ-ガラクトシダーゼ遺伝子、EGFP（Enhanced Green Fluorescent Protein）を用いることが含まれる。 30

【0065】

本発明の組換えポリペプチドは、74.7 kDaの理論分子量を有するポリペプチドと定義することもできる。 40

【0066】

GAP-1は、組換えヌクレオチド配列GAP-1/EGFPでHeLa細胞をトランスフェクトした後に、融合タンパク質として発現されるので、インビボで発現されるGAP-1の分子量は正確には決定されていない。トランスフェクトされた細胞をSDS-PAGEゲル上で電気泳動することによって分画すると、抗EGFP抗体によるブロッキングの後に現れる。融合タンパク質の分子量は、98 kDaと64 kDaの間にある。

【0067】

ある実施態様では、真核細胞中での発現産物である前記組換えポリペプチドは、哺乳類 50

細胞中、特にヒト細胞中で発現され、タンパク分解による切断及び／又はリン酸化、ユビキチン化、SUMO化を含む真核細胞中で起こる翻訳後修飾の結果、修飾を受ける。

【0068】

リン酸化は、リン酸化を受け得るアミノ酸残基（すなわち、チロシン、セリン、及びトレオニン）に対する抗体を用いることによって、発現された組換え産物上に検出することができる。

【0069】

本発明のバリエーション組換えポリペプチドは、変異ポリペプチドが元のポリペプチドの結合及び転写活性を保持するように、リン酸化されるアミノ酸残基が変異を受ける結果、得ることができる。

10

【0070】

本発明の好ましい組換えポリペプチドは、番号2又は番号4又は番号6で表されるアミノ酸配列（図15A、15B、及び15C）を備える。

【0071】

本発明の別のポリペプチドは、番号2又は番号4又は番号6で表されるアミノ酸配列又は上記の定義を満たすこれらのバリエーションの中に含まれるさらに短いアミノ酸配列を有する（但し、得られたポリペプチドは、IPCSという名称のヌクレオチド配列と相互作用して前記IPCS配列の制御下に置かれ且つ真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写させる正の転写因子として作用することができる）。

【0072】

本発明は、配列KSYRLVLKELRNPLKRを有するポリペプチドにも関する。該ポリペプチドは、GAAP-2を認識し、PRDII-BF1及びGAAP-1と交叉反応しないと思われる抗体を調製するための抗原として使用することができる。

20

【0073】

さらに、本発明は、上記定義のヌクレオチド配列を挿入することによって組換えられる組換え真核細胞に関する。

【0074】

ある実施態様では、前記組換え真核細胞は、挿入されたヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドを発現し、該ポリペプチドは上述した特性を有する。

【0075】

本発明のヌクレオチド配列は、電気穿孔法や「Molecular Cloning-A laboratory Manual」（Cold Spring Harbour Press-2001）に記載されている方法を含むその他の方法等の公知の方法を用いたトランスフェクションによって挿入することができる。

30

【0076】

目的の組換え真核細胞は、細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスの調節に關与する遺伝子を通常発現している細胞の中から選択される。

【0077】

このような細胞には、発現産物の特性を研究するために用いられるU937、K562、SK-N-SH、TF1、MCF7、又はKG-1細胞株等の細胞株が含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【0078】

本発明のある実施態様では、とりわけ細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスの調節に關与する遺伝子の転写の制御を治療、診断、又は予後のために変化させる前記手段の前記使用との関連では、組換え真核細胞は、患者から得られる細胞であり、とりわけ、悪性細胞又は前記変化を発生させる可能性がある細胞である。

【0079】

本発明の組換え真核細胞は、IPCSという名称のヌクレオチド配列を結合することができるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、IPCSという名称の前記ヌクレオチド配列と相互作用することが可能であり且つ前記IPCS配列の調節下に置かれ、前記真核細胞中に存在するヌクレオチド配列を転写させるための正の転写因子として

50

作用することが可能であるポリペプチドを所定の真核細胞中で発現させるためのDNA配列A A A T G N N N N Cを備えたヌクレオチド配列によって組換えられた細胞と定義することもできる。

【0080】

本発明のある組換え真核細胞においては、前記ポリペプチドは、番号2又は番号4又は番号6で表されるアミノ酸配列(図15A、15B、15C)を有する。

【0081】

本発明に使用するのに適した組換え真核細胞は、U937、K562、SK-N-SH、MCF7、KGI、TF1を含む幹細胞又は分化した細胞の中から選択される。

【0082】

本発明は、融合ポリペプチドである組換えポリペプチドにも関し、融合ポリペプチドには、本発明のポリペプチドがレポーター配列と融合したもの、例えば、EGFP又はEGFP...FcIgG1と融合したものが含まれる。

【0083】

さらに、本発明は、本発明のヌクレオチド配列からなる挿入物によって組換えられた組換えベクターに関する。

【0084】

具体的な組換えベクターは、真核細胞中で、特に上述した細胞から選択される細胞中で前記挿入物を発現させるのに適した発現ベクターである。

【0085】

本発明のある実施態様では、前記組換えベクターは前記挿入物を一過性に発現させ又調節して発現させるのに適している。一過性発現は、細胞中での前記被挿入構築物の発現による好ましくない影響を回避するという治療上の目的で必要となることがあろう。調節された発現には、誘導された発現を得ることができるということ、より一般的には、被挿入構築物の発現レベルを調節することができることが含まれる。

【0086】

調節された発現を得るためには、前記挿入物を誘導性プロモーター(有利には、生理的に許容される化合物によって制御されるプロモーター)の調節下に置くことができる。誘導性プロモーターは、例えば、pUC、pSKpTZ、pGEM、pBluescriptベクター中で用いられる、trp-lac(tac)プロモーター、trp-lac(trc)プロモーター、lacプロモーター等のIPTG誘導性プロモーターである。

【0087】

本発明の別の実施態様では、前記挿入物の転写は、前記組換えベクターの中で、外来のトランス活性化システムの調節下に置かれている。転写を調節するための具体的な人工系には、例えばpTREベクター(Clontech)を用いるテトラサイクリン調節系、ラパマイシン誘導系、ボナステロン誘導系が包含される。

【0088】

本発明の組換えベクターは、有利には、遺伝子治療に適するように設計される。

【0089】

この用途の場合、組換えベクターは、ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、アデノウイルス、AAVベクターの中から選択することができる。これらのベクターを調製する際には、安全で効率的なベクターを設計するために知られている必要事項や利点を考慮に入れなければならない。この分野の技術の概要は、La Thérapié génique (Editions TEC & DOC, 2001)に記載されている。

【0090】

本発明は、治療用途に適した組成物であって、上述のヌクレオチド配列、又は本発明の組換え細胞、又は本発明の組換えポリペプチドを含む組成物にも関する。

【0091】

ある実施態様では、このような組成物は、抗ウイルス剤及び抗癌剤の中から選択される

10

20

30

40

50

治療剤と合わせて使用することができる。併用とは、プロトコールの中で、本発明の組成物が抗癌剤と同時使用されることを意味する。これらの化合物の併合投与は、単一の組成物の形態で行うか、あるいは、本発明の組成物と抗癌剤を別個の組成物として投与することができ、同時又は逐次投与の可能性が含まれる。

【0092】

前記抗癌剤は、免疫療法剤、化学療法剤、又は放射線療法であり得る。適切な薬剤には、5FU、シスプラチン、エトポシド、サイトカインが含まれる。

【0093】

上記の併用により、用いる抗癌剤の有効用量のレベルを下げることも可能となるかもしれない。

10

【0094】

本発明の組成物は、悪性細胞又は腫瘍を治療するための治療用プロトコールに導入することができる。

【0095】

本発明において、「治療 (treatment)」という表現には、悪性状態の進行を阻害し、回避し、ある場合には回復させるために (腫瘍の増殖及び/又は拡散を抑制又は阻害できることを含む)、細胞成長、細胞分化、細胞増殖、腫瘍形成、細胞のアポトーシスの調節に対して与えられる効果が包含される。

【0096】

細胞分化は、例えば、赤白血球 (K562、UT7) のヘモグロビン産生能によってアッセイすることができる。

20

【0097】

細胞増殖は、MTTの減少を測定するか、類似のアッセイによって測定することができる。前記細胞は、腫瘍発生能を測定するために、ヌードマウスに注入することができる。

【0098】

アポトーシスは、「TUNEL」法によって、又はアネキシンVで標識することによってアッセイすることができる。

【0099】

ヌクレオチド配列又は組換え細胞又は組換えポリペプチドの使用であって、細胞成長、細胞増殖、細胞分化、又は細胞のアポトーシスの制御に関与する遺伝子のプロモーター配列中に存在するIPCS配列と相互作用することが可能であり、且つ前記IPCS配列の制御下に置かれたヌクレオチド配列の転写を制御することが可能である化合物をスクリーニングする生物学的ツールを調製するための使用に関する。

30

【0100】

本発明者らは、細胞の悪性細胞への転換の調節に関与している遺伝子を制御するための新規アプローチであって、広範囲にわたる標的遺伝子と相互作用して標的遺伝子の制御を調節し得る手段を提供するアプローチを記載した。

【0101】

本発明は、さらに、細胞成長、細胞分化、細胞増殖、細胞のアポトーシスの調節に関与する遺伝子の転写を制御する経路の調節の変化を検出するのに有用な新規手段を開示する。該手段は、本発明のヌクレオチド配列に対応するスプライシングされた形態のmRNAを通常産生する遺伝子の転写に影響を与える変異又は前記転写物の適切な翻訳に影響を与える変異の結果として生じた、細胞中の異常なBRDII-BF1遺伝子を検出することを基礎としている。異常な遺伝子の存在は、プロモーター領域中にIPCS型の配列を含む遺伝子に起こり得る調節の欠陥に相関することがあり、その結果、細胞が悪性細胞として成長する可能性に、又は本発明によって悪性細胞が治療される可能性に関連することがある。

40

【0102】

従って、本発明は、BRDII-BFI遺伝子の欠陥をインビトロで検出する方法であって、

50

- 番号 1 若しくは番号 3 若しくは番号 5 で表されるヌクレオチド配列、又は B R D I I 遺伝子のエキソン V I の中に位置するドメインに対応する Z n フィンガー結合ドメインを備えたそれらの断片から構成されるプローブを、前記遺伝子を通常構成的に発現している細胞の D N A と、ストリンジェントな条件で接触させる工程と、

- 前記プローブと前記細胞の D N A とのハイブリダイゼーション産物を検出する工程と、を備えた方法に関する。

【 0 1 0 3 】

エキソン 5 からエキソン 9 にまたがるヌクレオチド配列、すなわち番号 1 の配列のヌクレオチド 6 3 9 6 乃至 9 0 2 0 位が、適切なプローブの 1 つであり得る。

【 0 1 0 4 】

本発明は、細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスの調節に関与する遺伝子の転写活性の欠陥をインビトロで検出する方法であって、I P C S 配列を結合できるポリペプチドを本来コードしており、その結果、前記 I P C S 配列の調節下に置かれたヌクレオチド配列の転写を正に制御するはずである前記遺伝子の転写物の産生欠陥を検出する工程を備えた方法も提供する。

10

【 0 1 0 5 】

本発明の別の実施態様によれば、細胞が悪性状態へ形質転換されるのを予後にインビトロで検出する方法であって、前記細胞中で通常発現される P R D I I - B F I 遺伝子中に突然変異を検出するか、又は前記遺伝子のスプライシングによって得られた転写物中に突然変異を検出する工程を備え、前記突然変異が発現を失わせるか又は I P C S 配列に結合

20

【 0 1 0 6 】

本発明は、プロモーター領域中に I P C S 配列を含有し、細胞成長、細胞分化、細胞増殖、又は細胞のアポトーシスを調節する活性を有する遺伝子の転写活性を制御することができる化合物をスクリーニングする方法であって、

- プロモーター領域中に I P C S 配列を含有する遺伝子を発現している細胞の D N A に前記アッセイすべき化合物を接触させる工程と、

- D N A - 化合物複合体の形成を検出し、I P C S 配列を含有する前記遺伝子に対する転写活性をアッセイする工程と、を備えた方法に関する。

30

【 0 1 0 7 】

前記細胞の D N A は、細胞の核抽出物の形態で用いることができる。

【 0 1 0 8 】

本発明は、分子、特に患者に投与するのに有益な小分子をスクリーニングするための上記ポリペプチドの使用であって、G A A P - 1 又は G A A P - 2 に対するアゴニスト特性に関して、又は G A A P - 1 又は G A A P - 2 に対するアンタゴニスト特性に関して、前記分子が選択される使用にも関する。

【 0 1 0 9 】

G A A P - 1 又は G A A P - 2 のアゴニストは、抗癌剤を調製するのに適しているかもしれない。G A A P - 1 又は G A A P - 2 のアンタゴニストは、炎症性疾患又は自己免疫疾患の治療に有益な組成物を調製するのに適しているかもしれない。

40

【 0 1 1 0 】

とりわけ D N A - 化合物の形成を検出するために、このような化合物をスクリーニングするには、数多くの方法を使用することができる。この工程は、ゲル遅延測定法、スーパーシフトアッセイ、競合アッセイを用いて行うことができる。イムノブロットティング又は免疫沈降アッセイを用いる技術も適切かもしれない。

【 0 1 1 1 】

I P C S / G A A P - 1 複合体の形成を阻害又は安定化させることができる化合物の同定は、ゲルシフト技術によって行うことができる。

【 0 1 1 2 】

50

G A A P - 1 又は G A A P - 2 とのパートナーとして作用することができる他のタンパク質の動員を阻害又は補助する化合物の同定は、免疫共沈降によって行うことができる。

【 0 1 1 3 】

細胞質と核の間の転位を誘導することができる化合物の同定には、免疫組織化学を用いることができる。

【 0 1 1 4 】

リン酸化、ユビキチン化、S U M O 化、アセチル化等の G A A P - 1 又は G A A P - 2 の翻訳後修飾を誘導することができる化合物は、ウェスタンブロットによって同定することができる。

【 0 1 1 5 】

以下の実施例と図によって、本発明をさらに説明する。

【 0 1 1 6 】

[実施例]

遺伝毒性的損傷又は異常増殖の際における細胞増殖制御を維持するためには、腫瘍抑制遺伝子 p 5 3 及び I R F 1 (インターフェロン制御因子 1) の構成的な発現が必要とされる。DNA が損傷を受けると、主としてタンパク質が安定化されることによって、p 5 3 の活性が増大し、そのレベルは相当に上昇する。DNA を修復し、又は最終的にアポトーシスを引き起こす細胞増殖の停止に関与する遺伝子の転写を誘導することにより、p 5 3 はその効果を発揮する (Vogelstein 00)。p 5 3 遺伝子のコード領域中の突然変異 (5 0 を超えるヒトの癌で観察される) (Soussi 00)、ウイルス性オンコプロテイン E 1 A 又は E 6 との結合による p 5 3 の不活性化、又は p 5 3 の代謝回転に関係する因子の調節解除が、DNA 損傷に対する反応異常の最も多い原因である (Vogelstein 00)。しかし、p 5 3 遺伝子が完全に機能しているように見られるにもかかわらず、様々な腫瘍細胞株での p 5 3 遺伝子の発現が存在せず、又は発現が弱いことが観察されている (Raman 00)。このことは、p 5 3 遺伝子の転写調節の解除が、p 5 3 の機能喪失に関与するメカニズムのうちの 1 つと考えられることを示唆している。

【 0 1 1 7 】

転写因子 I R F 1 は、元来、インターフェロン系の正の制御因子として同定された (M i y a m o t o F u j i t a)。蓄積された証拠によって、I R F - 1 は腫瘍への感受性を制御することも示唆される。このため、I R F - 1 の異所性発現により、c - m y c 又は f o s - B 発現細胞の形質転換された表現型を抑制することができる (Tanaka 94)。さらに、c - H A - r a s は、初代マウス線維芽細胞 (M E F s) を形質転換することはできないが、I R F 1 のノックアウトマウス由来の線維芽細胞を形質転換することはできる (Tanaka 94a)。I R F 1 は、遺伝毒性的ストレスによる細胞周期の停止に必要であり (Tanaka 96)、細胞周期制御において中枢的な役割を果たす少なくとも 2 つの遺伝子、P 2 1 w a f 1 及び p 2 7 k i p 1 の活性化を担当する (Tanaka 1996 Coccia 99、M o r o 00)。さらに、I R F 1 は、p 5 3 と同様、アポトーシス遺伝子であるカスパーゼ (F u r u k a w a 99) と B a x の誘導に関与する。I R F - 1 は、F A S アポトーシス経路とも関係している。実際に、F a s L プロモーターには、T C R による F a s L の誘導能を直接的に制御する I R F - 1 に特異的な結合部位が存在する (Wa 00)。I R F - 1 遺伝子の変化は種々の疾患とも関連がある。I R F 1 遺伝子の 2 つの対立遺伝子のうちの 1 つが染色体欠失を受け又は不活化されると、通常、ヒト白血病又は前白血病症候群が伴う (Taniguchi 1995)。特定のエキソンを飛ばして解読することによって機能的 I R F 1 m R N A が喪失されていることが、脊髄形成異常症患者の 20 % で報告されている (Harada 94)。最後に、胃又は食道癌患者では、I R F 1 遺伝子座におけるヘテロ接合性の喪失が観察されることが多い (Ogasawara 96、Tamura 96)。

【 0 1 1 8 】

p 5 3 遺伝子の発現は、多数の様々な刺激によって誘導することが可能である。p 5 3 プロモーター内には、- 70 位から - 40 位にわたる遺伝毒性ストレス応答配列 (24)、c - M y c - M a x ヘテロダイマーの結合部位 (25)、p 5 3 遺伝子の構成的発現に

10

20

30

40

50

関係している - 227 位から - 194 位にわたる NF1 と YY1 に対する 2 つの重複結合部位 (27)、及び - 204 / - 201 位に位置する HOXA5 の部位等の異なる数個の制御因子が存在する。HOXA5 は正常な乳房上皮中に存在する正の p53 転写制御因子であり、その発現の欠如が、ヒト乳癌細胞中での p53 発現喪失の主たる原因である可能性もある (Raman 00)。

【0119】

IRF1 遺伝子の発現は、IFN α / β 及び IFN γ の両方によって強く誘導される。この特性は、IRF1 プロモーター (28) 内の IR (逆リピート) と呼ばれる制御因子の存在によるものであって、IRF1 プロモーター中には、この遺伝子の基礎的転写活性に恐らく関与しているものと思われる Sp1 部位の候補が幾つかも含まれている (21、28)。

10

【0120】

p53 及び IRF1 プロモーターには、酸化ストレス、IL-1 β 及び TNF- α 等の様々な異なる因子により各遺伝子に誘導能を与える NF- κ B 部位 (28、30) も、含有されている。2 つの前記遺伝子が共通して有する他の性質は、形質転換されていない組織のほぼ全体にわたって構成的且つ普遍的に発現されていること (22)、及び TATA ボックスが欠如していることである (28、31、32)。

【0121】

本発明は、GAAP-1 cDNA のクローニングについて記述し、この因子の構造及び機能に関するデータを示す。GAAP-1 の構造は、細胞内分布、DNA 結合、及びトランス活性化活性等の GAAP-1 の幾つかの性質の相関している。

20

【0122】

実験方法

GAAP-1 のクローニング

S. cerevisiae YM4271 とレポーターベクター pHISi は Clontech から入手した。1 コピーの二本鎖オリゴヌクレオチド、5' - AAAATGATTTCCAC3'、及び 3' - AACGATTTCCAC - 3'、5' - GAAATGACGGGCACG3' (それぞれ、以前に同定された IPCS - p53、IPCS - p53M、及び IPCS - IRF1 配列に対応する (Lallemant 97)) を EcoRI 及び pHISi の XbaI 部位に挿入することによって、前記レポーター構築物を作製した。これらのプラスミドを直鎖化して、YM2471 コンピテント細胞を形質転換するために使用した。ヒスチジンを欠く合成デキストロス培地上で選択することによって酵母レポーター株を生育させた。各酵母レポーター株は、固有の HIS3 の漏出發現を有しているので、IPCS - p53、IPCS - IRF1、及び IPCS - p53m 酵母レポーター株のバックグラウンド増殖を抑制するために、それぞれ、20 mM、30 mM、及び 45 mM の 3-AT (3-アミノ-1,2,4-トリアゾール) を添加した。1 つの IPCS - p53 配列の制御下にある HIS3 レポーター遺伝子を保有する酵母株において、GAL4 活性化と融合させたタンパク質をコードするヒト白血球 cDNA ライブラリ (Clontech) のスクリーニングを酢酸リチウム法 (Gietz 92) によって行った。20 mM 3-AT を含有し、ヒスチジンとロイシンを欠く合成培地中の選択的条件下で、形質転換された酵母細胞を播種した。陽性クローンのトランス活性化特性を確認するために、プラスミドを迅速な単離方法によりこれらのクローンから回収し (Kaiser & Auer 1993)、E. coli を形質転換するために使用した。次いで、これらのプラスミドのミニプレパレーション (Wizard、Promega) を用いて、IPCS - p53、IPCS - IRF1 又は IPCS - p53M 配列の制御下にある HIS3 レポーター遺伝子を保有する酵母株を形質転換した。IPCS - p53 / HIS3 及び IPCS - IRF1 / HIS3 及び非 IPCS - p53M を含む株にヒスチン栄養要求性を付与することができるプラスミドのみを保存した。

30

40

【0123】

細胞株と薬物

10% ウシ胎児血清を補充した RPMI 1640 培地中で、ヒト組織球性リンパ腫由

50

来のU937細胞(ATCC CRL 1593)及びヒト骨髓球性白血病由来のK562(ATCC CL 243)を培養した(Life Technologies、Inc.)。10%ウシ胎児血清を補充したDMEM培地中で、Hela細胞(ATCC CL-2)を培養した。5-フルオロウラシル、シトシンβ-D-アラビノフラノシド及びヘミンをSigma-Aldrichから購入した。

【0124】

プラスミド

以下のプライマー、5'-AGCATGGCATTAGGTAAATCAAAAGTCCACAG-3'、5'-CCATCAGGTTTGCTATCACCAAGC-3'を使用して、pcDNA3.1発現ベクター(Invitrogen)中にヒト白血球cDNAライブラリ(Clontech Laboratories)からのPCR産物(nt 6396~8601)をクローニングすることにより、GAAP-1発現ベクターを作成した。それぞれ、EGFP及びGAAP-1コード領域を増幅するために、下記のプライマー対(5'-ACCATGGTGAAGCAAGGGCGA-3'、5'-GATTACCTAATGCTCTCTTGTACAGCTCG-3')、及び(5'-GGACGAGCTGTACAAGATGGGGCAGAAAGTTTCAAAA-3'、5'-CCATCAGGTTTGCTATCACCAAGC-3')を使用して、融合PCR(Higuchi, R., In PCR protocols, a guide to methods and applications(Eds Innis, M.A.Gelfand,))によってEGFP/GAAP-1融合タンパク質を発現するプラスミドを得た。それぞれ、下記の重複プライマー対(5'-CCTTAATCAAAAGTGAAAGATGGAGGATATAAGTCA-3'、5'-ATCCTCCATCTTTCACCTTTTGATTAAAGGAATT-3')、(5'-GCAGAAAGAAAGCTGGGAATACGTTGTAAAGAAAC-3'、5'-AGCTTCTTCTTGCAATGTATTTTCTCTTCTC-3')及び(5'-GCAATGAAGTCCAAAGGCAGGAAGCAAGAAATGTGTGGA-3'、5'-TCCTGCCCTTGGAAGCTTTCATTGCTTTTGTCAAGATTTCC-3')を用いた重複PCRにより(Higuchi 上記)、EGFP/GAAP-1 del NLS、GAAP-1 mtZ1、及びGAAP-1 mtZ2を得た。全てのコード領域を発現ベクターpcDNA3.1.(Invitrogen)中にクローン化した。配列決定を行うことにより、前記構築物が完全であることを実証した。pRL-SV40は、Promega(Promega)から購入した。

【0125】

トランスフェクション

Lallemant 97に記載されているように、電気穿孔により 10^6 細胞/0.8 mlの培地当り10 µgのDNAを用いてトランスフェクションを行った。Superfect(Qiagen)を製造業者の指示書に従って使用して、細胞にDNAをトランスフェクトした。トランスフェクション効率を標準化するために、pRL-SV40(Promega)を内部標準として使用した。トランスフェクションの後、トランスフェクションした細胞を24時間培養し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム(Promega)を使用して、ルシフェラーゼ活性を分析した。

【0126】

ウェスタンブロット分析

下記のとおりで作製した10マイクログラムの核抽出物を、ローディング緩衝液(100 mM Tris、12.1% グリセロール、2.4% SDS、1.4% β-メルカプトエタノール、2.3% ブロモフェノールブルー)中で5分間煮沸することによって変性させた後、12% SDS-PAGE中で分画してPVDFメンブレンフィルターに転写した。抗GFP(Zymed)、抗p53(pAb 240)(Santa Cruz Biotechnology Inc.)、又は抗IRF-1(Santa Cruz Biotechnology Inc.)抗体を用いて、他の文献(参考文献)に記載されているように免疫検出を行った。ECLキット(Amersham)でシグナルを検出し

た。

【0127】

核抽出物

O s b o r n ら (3 4) が記述した方法を修正したものを使用して、核抽出物を調製した。簡単に言えば、 10^7 細胞をリン酸緩衝生理食塩水で2度洗浄し、10 mM HEPES pH 7.9、0.1% ノニデット p - 40 (F l u k a)、1.5 mM の M g C l ₂、10 mM の K C l、0.5 mM の D T T、並びに下記のプロテアーゼ阻害薬：1 mM のフェニルメチルスルホニルフルオリド、50 μ g / ml [α] - フェニルメチルスルホニルフルオリド、及び各 5 μ g / ml のロイペプチン、ペプスタチン、アプロチニン、及びアンチパイン) を含有する緩衝液 20 μ l を用いて溶解した。標本を氷の上で15分間培養し、細胞ライセートをボルテックスで暫時攪拌して、4 で10分間、マイクロ遠心機で遠心分離した。15 μ l の抽出緩衝液 (上述のものと同じプロテアーゼ阻害剤とともに、20 mM HEPES、pH 7.9、25% グリセロール、420 mM NaCl、1.5 mM M G C l ₂、0.2 mM E D T A、0.5 mM D T T) 中に核ペレットを懸濁し、4 で15分間培養して、暫時混合し、4 で10分間、マイクロ遠心機で遠心分離した。次に、前記上清を同量の保存緩衝液 (上述したものと同じプロテアーゼ阻害剤とともに、20 mM HEPES pH 7.9、20% グリセロール、0.2 mM E D T A、0.5 mM D T T) に添加し、その後 - 70 で保管した。

10

【0128】

EMSA

S e q u e n a s e を用いて「充填すること」によって、合成二本鎖オリゴヌクレオチドプローブを α - ³² P d C T P (A m e r s h a m C o r p .) で標識した後、S e p h a d e x G - 50 で精製した。20 μ l の結合緩衝液 (20 mM T r i s - H C l、25 mM K C l、1 mM D T T、1 mM E D T A、0.1% ノニデット P - 40、4% グリセロール、1 mg / ml ウシ血清アルブミン、 μ g / ml ポリ (d l - d C)) 中の核抽出物 5 μ g と 0.1 fmol のプローブを使用して、4 で20分間、タンパク質 - DNA 結合反応を行った。50 μ l の T N T 結合網状赤血球ライセート系 (P r o m e g a) と 1 μ g の適切なプラスミドによって、インビトロ翻訳産物を産生した。5 μ l の前記インビトロ産物を必要に応じて核抽出物の代わりに使用した。次に、6% 非変性アクリルアミドゲル上で前記反応混合物を電気泳動した。50倍モル過剰の非標識プローブを使用して競合実験を行った。これらの研究には、下記のオリゴヌクレオチド (及びその相補鎖) を使用した。I P C S - I R F 1、5' - A G C C T G A T T T C C C G A A A T G A C G G C A C G C A G C C - 3' ; I P C S - p 5 3、5' - A A T G C A G G A T T C C T C C A A A A T G A T T T C C A C - 3' ; N F - κ B - M H C 5' - G A T C C T C T G G G G A T T C C C C A T G G A - 3' 。

20

30

【0129】

アポトーシスの検出

ヘモグロビンレベルの分光光度アッセイ

以前に記載した方法をわずかに修正した方法により、ヘモグロビンレベルを測定した (R a y 96)。 5×10^5 細胞を P B S で2度洗浄し、35 μ l の受動溶解緩衝液 (P r o m e g a) 中に再懸濁した。前記細胞ライセートを微量遠心管中で、4 で15分間、14000 rpm で遠心分離した。96ウェルマイクロタイタープレート中で、新たに調製した100 μ l のベンジジン - H C l (0.5% 酢酸中の10 mg / ml) 及び1 μ l の30% H ₂ O ₂ と、30 μ l の上清とを混合した。90秒後に、マイクロタイタープレートリーダーで604 nm の吸光度を測定した (参考文献)。

40

【0130】

結果

G A A P - 1 c D N A のクローニングと性質決定

p 5 3 と I R F 1 プロモーター (I P C S) の中には共通の配列が存在するが、この共

50

通配列はU937細胞の核抽出物中に存在する構成的因子を結合し、レポーター遺伝子の転写活性化を誘導することが以前に報告されている。この構成的因子は、単一のポリペプチド鎖に存する26kDaタンパク質として同定されている(allem and 97)。

【0131】

I PCS配列と相互作用可能なタンパク質をコードする相補的DNAを同定するために、本発明者らは、酵母ワンハイブリッド系を使用した。レポータープラスミドであるpHISi-I PCSをYM4271株(Clontech)(HisUraLeu)中に導入することによって、酵母のテスター株であるYI PCSを樹立した。前記pHISi-I PCSは、配列AAAATGATTCCACに対応するp53プロモーター由来の14-bpのI PCS(I PCS-P53)を、pHISiベクターのHIS3遺伝子(Clontech laboratories)の最小プロモーターの上流に含有していた。YI PCS株をヒト白血球cDNAライブラリ(Clontech)により形質転換し、その中でcDNAをGAL4活性化ドメインと融合させ、ロイシンとヒスチジンを欠き、20mMの3-ATを含有する培地上に播種した。本発明者らは、このようにして、10⁷形質転換体から、GAL4活性化ドメインと融合したタンパク質をコードする2.5kbのcDNAクローンを単離した。本発明者らは、このタンパク質のI PCSとの相互作用の特異性を制御するために、2.5kbのcDNAクローンを有する様々なI PCS配列(図1A)の制御下にあるHIS3レポーター遺伝子を内蔵する酵母細胞株を形質転換した。前記ハイブリッドタンパク質は、p53及びIRF1遺伝子からの野生型I PCSにより制御されたHIS3遺伝子をアップレギュレートすることができたが、変異型I PCSにより制御されたHIS3遺伝子をアップレギュレートすることはできなかった(図1B)。この結果から、2.5kb cDNAクローンによってコードされるタンパク質は、p53プロモーター(ヌクレオチド6396~6488)由来のI PCS配列に対して結合特性を有することが示唆される。

【0132】

GAP-1 cDNAと呼ばれる2.5kb cDNAの配列分析により、nt 6488からnt 9020間に網羅された領域においてヒトPRDI-BF1 cDNA(Fan 90等)との95%の類似性を明らかにした(Fan 90でのPRDI-BF1のATGに関連)(図2A)。2.5kbのmRNAは、エキソン4の読み飛ばしによってPRDI-BF1遺伝子から産生されることができ、従って、2.5kb mRNAがエキソン5に直接融合したエキソン3を含有していることが以前に立証されている(Gaynor 91)。GAP-1 cDNAによって包囲されておらず、cDNAライブラリから得られたクローン中に存在するGAL4活性化ドメインをコードする配列によって置換される最初の90bpを除いて、GAP-1 cDNAは、Gaynorらが記述した2.5kbの転写物に正確に一致している。

【0133】

GAP-1 cDNAによりコードされたアミノ酸配列を調べることににより、3つの主要なモチーフ、すなわち、以前に同定されたNLS候補とは別個のNLS候補(PRIKIF)(Fan 90 Baldwin)、以前に性質決定された2つのC2H2タイプのZnフィンガー(Fan 90、Gaynor 91、Baldwin 90)、及び未知の機能を有するPEST配列(Rechsteiner 96)に類似の酸性アミノ酸が豊富なドメインの存在が明らかになった(図3)。

【0134】

GAP-1の細胞内分布

GAP-1 cDNAは、PRDI-BF1(9kb)の4158に既に同定されていたNLS(Baldwin 90)を包含していなかったため、本発明者らは、GAP-1中のNLSの活性を調べた。

【0135】

GAP-1の細胞内分布を決定するために、本発明者らは、EGFP—GAP—

1 融合タンパク質をコードする様々なプラスミド構築物を使用して一過性トランスフェクション法を行った(図4A)。蛍光の局在の測定を容易にするために、本発明者らは、ヒト肝癌の単層細胞株HuH7を使用した(Bressac 90)。図4Bに示されているように、野生型EGFP-GAAP-1の蛍光は、核及び細胞質の両方に局在していた。この分布は、GAAP-1の区画化を制御することによって、GAAP-1の活性が調節され得ることを示唆している。NLSを欠失した変異体の蛍光が細胞質に限定されていることは、PRRIKIFモチーフが核内移行に実際に必要であることを実証している。さらに驚くべきことに、PEST様配列を欠失した融合タンパク質のトランスフェクションは核に限局して蛍光を発した。ヒト二倍体線維芽細胞の細胞株MRC5でも同様の結果が得られた(Maziere 00)(データは示さず)。これらの全データにより示唆されることは、細胞質中に転位するために、GAAP-1は、GAAP-1の転位に関与すると考えられる少なくとも2つのドメイン(以前に記載されたPRDII-BF1のNLSとは異なるNLS、及び核からタンパク質を搬出させ得るPEST用配列)を有することである。

10

【0136】

GAAP-1のDNA結合活性

これまで、PRDII-BF1は、そのDNA認識能が二対のZnフィンガー(そのうち1つは、GAAP-1の中に存在する)によって決定されるNF-κB部位に結合するタンパク質とされてきた(Fan 90、Gaynor、Baldwin)。しかし、GAAP-1のクローニングによって、NF-κB配列とは無関係な配列を使用していることが認められたので、この因子が少なくとも2つの非相同的なDNA配列と結合できることが示唆された。クローニングされたGAAP-1のIPCS標的配列に対する結合特性を確認するために、インビトロで翻訳されたGAAP-1を、標識したIPCS又はNF-κBオリゴヌクレオチドとともにインキュベートして、電気泳動移動度シフト分析(EMSA)によって分析した。図5Aに示されているように、GAAP-1は、IPCSとは1つの複合体(図5A、レーン1)、NF-κBオリゴヌクレオチドとは2つの複合体を形成することができ(図5、レーン1)、GAAP-1結合の二重特異性が立証された。さらに、NF-κBプローブに対するインビトロ翻訳されたGAAP-1の親和性は、IPCS-p53プローブに対する親和性よりも相当に強かった。NF-κB配列(図5B、レーン1)で観察された、やや遊走が遅い複合体が形成されることにより、GAAP-1のホモ二量体化が示唆された。GAAP-1は2つのZnフィンガーを有するので、各フィンガーが各タイプの配列の結合を担っていると本発明者らは仮定した。本発明者らは、2つのGAAP-1変異体(それぞれ、何れかのZnフィンガーを含有しており、他方のZnフィンガーは、フィンガーの三次構造に必要なシステイン又はヒスチジンをアルギニンで置換することによって破壊されている。)を構築した。EMSAでは、インビトロで翻訳された2つの変異体は、IPCS-p53(図5A、レーン3、レーン5)又はNF-κB(図5B、レーン3、レーン5)プローブのいずれとも複合体を形成できなかった。このように、GAAP-1がIPCSとNF-κBの両配列に結合するためには、両方のZnフィンガーが必要であった。

20

30

【0137】

GAAP-1のDNAとの結合の効率と特異性は、転写後メカニズムによって調節を受けている可能性もある。本発明者らは、GAAP-1が、インビボで、翻訳後修飾を受けるかどうかを明白にするために、様々なGAAP-1/EGFP融合タンパク質発現ベクター(図4A)及び抗GFP抗体を安定的にトランスフェクションされたK562細胞の核抽出物を用いて、ウェスタンブロット分析を行った。K562細胞株がGAAP-1の強い構成的発現を有することができるという事実に基づいて、K562細胞を選択した(下記参照)。図6のように、インビトロ翻訳されたGAAP-1/EGFPは、理論上の分子量である102kDに移動したが、K562細胞中で発現されたGAAP-1/EGFP及びEGFP/GAAP-1は、それぞれ約35kD及び95kDに移動した(図6、レーン2とレーン4)。抗EGFP抗体はこれらの融合タンパク質のN末端又はC

40

50

末端部分のみを検出したので、本発明者らは、K562細胞中でGAP-1がその末端から約100残基の箇所で切断されたと推論することができる。また、PEST配列を欠失したGAP-1/EGFPは、野生型タンパク質と同じ分子量の箇所に移動したので、このタンパク質分解は、PEST配列と無関係であった(図6、レーン3)。

【0138】

分子内切断がGAP-1のDNA結合特性に及ぼす効果を分析するために、本発明者らは、EGFP/GAP-1発現ベクターを安定的にトランスフェクションしたK562細胞の核抽出物でEMSAを行った。実際に、インビボで産生されたEGFP/GAP-1では、GAP-1/EGFPとは異なり、GAP-1のDNA結合部からEGFPは放出されなかったので、融合タンパク質を内因性GAP-1と区別することができた。図7のように、EGFPトランスフェクション細胞の核抽出物は、おそらくは内因性GAP-1を含有するIPCSプローブと共に2つの複合体を形成した(レーン1)。EGFP/GAP-1ベクターをトランスフェクトした細胞の核抽出物は、主としてバンドAの強度の増加を伴って、類似の移動パターンを生じた(図7、レーン6~9)。従って、EGFPタグをGAP-1に添加しても、DNAとタンパク質の複合体の電気泳動移動度を変えるようには見えなかった。IPCS-p53又はIPCS-IRF1オリゴヌクレオチドと競合することは、その相互作用が特異的であることを示し(図7、レーン7と8)、NF-κBオリゴヌクレオチドとの競合はインビボで産生されたEGFP/GAP-1が二重特異性の結合を有することを示した(図7、レーン9)。抗EGFP抗体により複合体Aの形成が阻害されたので、(レーン10)複合体AはEGFP/GAP-1を含有していることを証明している。残余の複合体は、恐らく内因性GAP-1によって形成されたものであろう。実際に、抗EGFP抗体を添加しても、内因性GAP-1のみを含有する複合体Aの形成には影響はなかった(レーン5)。これより早く移動する複合体B(レーン6)も、抗EGFP抗体により阻害されたが、複合体Aよりも低い特異性を示した(レーン7と8)。インビトロ翻訳されたEGFP/GAP-1及びIPCS-p53又はNF-κB-MHCプローブのいずれかを用いて行った対照EMSAにより、抗EGFP抗体がスーパーシフトされた複合体を形成せず、むしろEGFP/GAP-1のDNA結合活性を阻害することが示された(データは示さず)。図7は、MHCのNF-κBプローブを用いて行ったEMSAの結果も示している。インビトロの結果とは異なり、IPCSプローブで高い結合効果が検出されたが、GAP-1(レーン11~14)又は融合タンパク質EGFP/GAP-1(レーン16~19)のDNA結合特性が、IPCS及びNF-κBプローブの両方と質的に類似していることがこの実験で立証された。

【0139】

これらのデータは全て、K562細胞では、GAP-1は、少なくともC末端の近傍において、タンパク質分解性の切断により翻訳後修飾されることを強く示唆している。

【0140】

GAP-1の転写活性

転写活性に対するGAP-1のp53及びIRF1プロモーターの寄与を調べるために、本発明者らは、K562細胞で同時トランスフェクション分析を行った。本発明者らは、p53(p53-luc)又はIRF1(IRF1-luc)野生型プロモーター又は前述したようにIPCSが変異したプロモーターの制御下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子を含有するプラスミドを使用した(Lallemant 97)。別法として、本発明者らは、IPCSの最小結合部位からなるキメラプロモーター又はSV40プロモーターの上流でクローニングされたこの部位の変異型を使用した。GAP-1発現ベクターを同時トランスフェクションすることにより、p53-luc、IRF1-luc又はIPCS-SV40-lucレポーター活性は、同様のレポーターベクターを空の発現ベクターとともに使用して行った類似の実験と比較して、約2.5倍に上昇していた(図8)。対照的に、変異型IPCS配列を含む構築物により発現されたルシフェラーゼ活性は、GAP-1発現ベクターを同時トランスフェクトすることによって修飾されな

かったが、野生型レポーター及び空の発現ベクターの同時トランスフェクションによって得られた活性と同等であった。これらのデータは、G A A P - 1 が正の転写活性を有することを立証した。I P C S が変異された前記プロモーター構築物の中で変化を受けていない複数の機能的な N F - κ B 候補部位 (S i m s 96 W u 94) を、I R F 1 及び p 5 3 プロモーターは含有しているので、G A A P - 1 は N F - κ B 配列を結合できたが、G A A P - 1 による I R F 1 及び p 5 3 の転写制御には、この配列が関係しなかったことが本発明者らの結果で立証された。最後に、本発明者らは、N F - κ B 結合部位を含有する H I V - L T R / ルシフェラーゼレポーター構築物を用いて、同時トランスフェクション実験を行った。G A A P - 1 はこの構築物の遺伝子レポーター活性を増加させることができないので、G A A P - 1 が N F - κ B 配列に対してではなく、I P C S に対して転写活性があることが確認された。異なるスプライスを受けた P R D I I - B F 1 m R N A 前駆物質 (G A A P - 1 と同一) から得られる 2 . 5 k b の m R N A 産物が、L T R - H I V レポーター構築物をトランス活性化することができなかったことを示した G a y n o r らのデータとこの観察は一致している。これに反して、P R D I I - B F 1 発現ベクターを使用して同様の実験を行った結果、L T R - H I V 又は N F - κ B レポーター構築物活性は上昇した (データは示さず) 。

【 0 1 4 1 】

G A A P - 1 のアポトーシスへの関与

G A A P - 1 による I R F - 1 及び p 5 3 プロモーターの転写活性化は、この因子が増殖抑制及び / 又はアポトーシス特性を有する可能性があることを示唆した。この可能性を検査するために、I R F - 1 及び p 5 3 の両方を発現する U 9 3 7 と K 5 6 2 細胞株、並びにいずれの遺伝子も発現しない U 9 3 7 と K 5 6 2 細胞株を、G A A P - 1 又は E G F P / G A A P - 1 発現ベクターを用いてトランスフェクトして、そのコロニー形成能を検査した。G A A P - 1 又は E G F P / G A A P - 1 をトランスフェクトした U 9 3 7 細胞から得られたコロニーの数は、E G F P 対照プラスミドをトランスフェクトした細胞から得られたコロニーの数の 10 分の 1 であった (図 9) 。E G F P / G A A P - 1 をトランスフェクトしたクローンの蛍光レベルをフローサイトメトリーによって測定したが、U 9 3 7 / E G F P 細胞で得られた蛍光レベルよりも相当に低く (データは示さず) 、このことから G A A P - 1 の強力な過剰発現がこれらの細胞に致死的であったことが示唆された。細胞株を得るための続く継代培養ステップで、G A A P - 1 又は E G F P / G A A P - 1 をトランスフェクトした細胞クローンのほとんどが自発的にアポトーシスを引き起こした (図 10) 。前記クローンは蛍光レベルが非常に低く、親細胞株と同様の様式で増殖するようであったので、以下の実験に使用した。

【 0 1 4 2 】

U 9 3 7 対照細胞 (図 11) と比較して、p 5 3 及び I R F - 1 は、U 9 3 7 E G F P / G A A P - 1 細胞株中では 4 ~ 6 倍に誘導されることが核抽出物のウェスタンブロット分析によって明らかになり、G A A P - 1 が内因性の p 5 3 及び I R F 1 の発現に関係していることが立証された。p 5 3 及び I R F - 1 レベルの上昇は、細胞のアポトーシスに対する感受性の増大と相関していた。U 9 3 7 対照細胞ではアポトーシスを発生させるに至らなかった代謝拮抗剤 5 - フルオロウラシル (5 F U) を用いて、種々の用量で 3 日間処理することによって、U 9 3 7 E G F P / G A A P - 1 細胞株にアポトーシスが誘発されることが、T U N E L アッセイによって決定された (図 12) 。

【 0 1 4 3 】

K 5 6 2 細胞では、E G F P / G A A P - 1 及び G A A P - 1 ベクター、又は対照ベクター E G F P において得られたコロニー数は極めて似通っていた。フローサイトメトリーで測定された融合タンパク質 E G F P / G A A P - 1 の発現レベルは、クローンの中で不均一であった。ウェスタンブロット分析によって、p 5 3 及び I R F 1 は親細胞又はトランスフェクション細胞のいずれにおいても検出されなかった。G A A P - 1 、E G F P / G A A P - 1 又は E G F P のみを発現する細胞株を樹立して、アポトーシスに対するそれらの感受性を分析した。5 F U 又はシトシン β - D - アラビノフラノシド (A r a - C)

を使用した治療では、G A A P - 1 又は E G F P / G A A P - 1 トランスフェクション細胞及び対照細胞間のアポトーシス感受性に有意な差はなかった。このように、G A A P - 1 の過剰発現によりアポトーシスを誘発できなかったことと、K 5 6 2 細胞株に p 5 3 と I R F 1 遺伝子の発現が欠如していたことには相関があった。しかし、G A A P - 1 又は E G F P / G A A P - 1 のいずれかを発現する全ての K 5 6 2 細胞株では、本発明者らは、約 2 . 5 倍のヘモグロビンリン量が約 2 ~ 5 倍の増加することを観察したが (図 1 3) 、これは A r a - C 又はヘミンで処理した親クローンによって産生されるヘモグロビンレベルに匹敵していた。さらに、G A A P - 1 又は G A A P - 1 / E G F P の発現は、A r a - C 又はヘミンの活性を誘導する分化を強力に増強した。これらの結果は、G A A P - 1 の発現の増強によって、赤血球の分化が誘導され、A r a - C 又はヘミンにより誘導される分化に対して K 5 6 2 / G A A P - 1 細胞が感作されることを示している。 10

【 0 1 4 4 】

考察

I R F - 1 及び p 5 3 プロモーターを I P C S s により正に制御する D N A 結合因子をコードする c D N A が、酵母ワンハイブリッド系によってクローン化された。驚くべきことに、I P S C - B F 1 c D N A と名づけられたこの c D N A は、G a y n o r ら (9 1) が以前に記述した P R D I I - B F 1 遺伝子の 2 . 5 k b の選択的転写物と正確に一致した。P R D I I - B F 1 は、I F N β 、M H C I プロモーター、及び H I V - L T R の制御に関連する転写調節因子として、数グループ (F a n 9 0、B a l d w i n 9 0、M u c h a r d t 9 2) によって独自にクローン化されている。これらの制御配列における P R D I I - B F 1 の結合部位は、N F - κ B 認識エレメントである。P R D I I - B F 1 は 2 つの Z n フィンガーを有する Z n フィンガータンパク質であり、各々が N F - κ B 部位を単独で結合することができる (F a n 9 0 G a y n o r 9 1) 。本発明者らは、1 対フィンガーのみを有する G A A P - 1 が、少なくとも 2 種類の無関係な D N A 配列、すなわち I P C S と N F - κ B 部位に特異的に結合できることを示した。この結合の二重特異性を解明するために、本発明者らは、I P C S 又は N F - κ B プローブの何れかを使用し、インビトロ翻訳 G A A P - 1 又はこの因子の変異型を用いて E M S A を行った。前記 2 つの Z n フィンガーの何れかを破壊すると、I P C S 又は N F - κ B 配列との結合が失われるので、両方の Z n フィンガー構造が何れの結合活性にとっても必要であることが立証された。この結果から、Z n フィンガー形成 (ヒスチジン及びシステイン残基) に関与するアミノ酸以外のアミノ酸は、N F - κ B 又は I P C S モチーフとの特異的結合に関係することが示唆される。D N A 結合の多元的な特異性は、W T 1 タンパク質に関して既に報告されており、この多元的特異性は、2 つの Z n フィンガー間の選択的スプライシングによって修飾されたアミノ酸残基に依存する (H e w i t t 9 6) 。本発明者らが知る限りでは、二重特異的な結合のフィンガーを有する Z n フィンガータンパク質について記載するのは、G A A P - 1 が最初である。 20 30

【 0 1 4 5 】

インビトロ翻訳された G A A P - 1 は、N F - κ B プローブに対する親和性より、I P C S プローブに対する親和性が低い。しかし、インビボで産生された E G F P 標識 G A A P - 1 は逆の特性を有するので、I P C S に対する G A A P - 1 の親和性を特異的に上昇させる翻訳後修飾を G A A P - 1 が受けることが示唆される。インビボで産生された融合タンパク質 G A A P - 1 / E G F P - B F 1 及び E G F P / G A A P - 1 に対するウェスタンブロット分析によって、少なくとも 1 つのメカニズムが G A A P - 1 結合親和性の制御に関係している可能性があることが示唆される。実際に、インビボでは、前記タンパク質の結合特性の決定因子と考えられる G A A P - 1 の C 末端から約 1 0 0 残基の箇所ですタンパク質分解性の切断が生じることをこの実験は明白に立証している。従って、異なるスプライスを受けた 2 . 5 k b m R N A のインビトロ産物 (G A A P - 1 に相当する) が、N F - κ B 配列に対する強い結合活性を有することを示した G a y n o r らが得た結果を、本発明者らのデータは説明できるかもしれない。これらの観察は、G A A P - 1 の生理的な役割には、翻訳後修飾が必要であることを示唆する。 40 50

【0146】

G A A P - 1 の活性は、その細胞内分布によっても制御される。以前の研究 (F a n 90) では、 P R D I I - B F 1 は核の中にのみ局在するとされていたが、 G A A P - 1 は核と細胞質の両方に存在することを本発明者らは立証した。この違いは P R D I I - B F 1 遺伝子中に存在する 2 つの N L S の選択的な使用が原因であるとも考えられる。第一の N L S は、 F a n が、 P R D I I - B F 1 の中に同定し、 G A A P - 1 に包含されていない。この N L S が P R D I I - B F 1 の核への厳密な局在化の原因であるかもしれない。本発明者らは、第二の N L S を同定したが、この N L S がないと、 G A A P - 1 は核内に移行できない。この観察は、 G A A P - 1 が固有の N L S を有する転写調節因子であって、 P R D I I - B F 1 とは機能的に無関係である事実を明確に示している。全 G A A P - 1 が核及び細胞質の両方に局在しているが、 P E S T ドメインを除去したタンパク質は厳密に核に局在している。 P E S T 配列は、タンパク質をプロテアソーム中で分解させる経路の中で、ユビキチン結合酵素によって認識される (R e c h s t e i n e r 96) 。さらに、プロテアソーム中で分解を受けるには、核から細胞質まで転写調節因子を搬出するために、前記 P E S T ドメインも必要とである可能性がある (参考文献 J a b 1) 。従って、前記 P E S T ドメインは、タンパク質の搬出を止めることによって、核内に G A A P - 1 を保持するものと思われる。

10

【0147】

P R D I I - B F 1 は、 I F N β プロモーター (F a n 90) 及び M H C I と免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子 (B a l d w i n 90) のエンハンサーとの相互作用に基づいて同定されたが、その転写活性は H I V エンハンサーの場合のみに立証された (T s u j i m o t o 91、) 。さらに、異なるスプライシングを受けた P R D I I - B F 1 遺伝子の 2 つのメッセージによりコードされる 90 k D と 70 k D のタンパク質 (後者が G A A P - 1 に対応する) は、 H I V L T R 上に対する転写活性を全く欠いていることが立証された (G a y n o r) 。この観察は本発明者らのデータと一致しており、 P R D I I - B F 1 とは異なって、 G A A P - 1 は、 N F - κ B 結合部位が関与する生理的な転写に関係していないことを示唆する。実際に、本発明者らの結果は、 p 53 及び I R F 1 プロモーターに対する A A P - 1 の正の転写活性を明白に立証しており、この正の転写活性は、これらのプロモーター上に I P C S 結合部位が存在することと厳密に相関している。さらに、 G A A P - 1 発現ベクターをトランスフェクトされた U 937 細胞で示された p 53 及び I R F 1 内因性遺伝子産物の増強によって、この転写活性が確認される。従って、これらのデータは全て、少なくとも 2 つの癌抑制遺伝子 (I R F 1 及び p 53) の正の転写に関連した転写調節因子として G A A P - 1 を本発明者らが規定することを可能とする。この特性は、 G A A P - 1 が癌抑制遺伝子としても作用する可能性があることを示唆する。

20

30

【0148】

G A A P - 1 を過剰発現する U 937 細胞には、 p 53 及び I R F 1 のレベルと相関して影響を受けるアポトーシスが起こる。この結果から、細胞死の考えられる原因として、 p 53 及び I R F 1 の増加が示唆される。 U 937 細胞では、 p 53 遺伝子が点突然変異を含むことが指摘されねばならない (参考文献) 。しかし、これらの細胞のアポトーシスには、内因性 p 53 の発現の一過的な増加が伴い (G a b r i e l e 99) 、あるいは、必要とされる場合さえある (Y e u n g 98) ので、突然変異を受けているにもかかわらず、 p 53 はなお活性を有していることが示唆される。さらに、 I R F 1 発現の増加は、既に報告されているように (N g u y e n 97) 、アポトーシスによる死の一因にもなり得る。一方、細胞の増殖が可能なレベルの G A A P - 1 を発現する U 937 細胞株は、遺伝毒性剤に対する感受性が増加している。従って、中心的成分である p 53 のレベルを調節するゲノムの完全性を監視する上で、 G A A P - 1 は重要な役割を果たしているものと思われる。

40

【0149】

I R F 1 又は p 53 のいずれも発現していない K 562 細胞は、 G A A P - 1 の過剰発

50

現直後にはアポトーシスを起こさないが、赤血球分化を起こす。この結果は、G A A P - 1 が、他の細胞機能に関係した未知の遺伝子の発現も制御することを示唆する。

【 0 1 5 0 】

結論として、本発明者らのデータが示唆しているのは、転写調節因子である G A A P - 1 の標的は複数であり、細胞増殖制御、アポトーシス、及び分化に関連する過程に関与していることである。

【 0 1 5 1 】

G A A P - 2 の単離と性質決定

精巣、骨髄、肺、結腸、胎盤、及び末梢血リンパ球などの様々なヒトの臓器から得た m R N A に対して行った多重 R T - P C R 方法によって、G A A P - 2 に対応する転写が観察された。 10

【 0 1 5 2 】

得られた D N A を U 9 3 7 細胞及び K 5 6 2 細胞に同時トランスフェクションして、p 5 3 及び I R F 1 のプロモーター上で G A A P - 2 の特性をトランス活性化させたが、G A A P - 1 で観察されたものと同様であった。

【 0 1 5 3 】

融合タンパク質 E G F P / G A A P - 2 を用いて G A A P - 2 の細胞内分布を研究したが、G A A P - 1 の分布（すなわち核及び細胞質への分布）と同様である。

【 参考文献 】

【 0 1 5 4 】

参考文献

Nguyen, H., Lin, R., and Hiscott, J. (1997). Activation of multiple growth regulatory genes following inducible expression of IRF1 or IRF1/RelA fusion protein. *Oncogen* 15, 1425-1435.

Feunteun, E., Gale R.P., Reed, J., and Canaani, E. (1992). Expression of the normal p53 genes induces differentiation of k562 cells. *Oncogene* 7, 1853-1857

10

Chylicki, K., Ehinger, M., Svedberg, H., Bergh, G., Olsson, I., and Gullberg, U. (2000). P53-mediated differentiation of the erythroleukemia cell line K562. *Cell growth and differentiation*. 11, 315-324

Ray, S., Bullock, G., Nunez, G., Tang, C., Ibrado, A.N., Huang, Y., and Bhalla, K. (1996). Enforced expression of Bcl-Xs induces differentiation and sensitizes chronic myelogenous leukemia-blast crisis K562 cells to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine mediated differentiation and apoptosis. *Cell growth & differentiation* 7, 1617-1623

20

Fan, C.M., and Maniatis, T. (1990). A DNA-binding protein containing two widely separated zinc finger motifs that recognize the same DNA sequence. *Genes and Development* 4, 29-42.

Hewitt, S.M., Fraizer, G.C., Wu, Y.J., Rauscher III, F. J., and Saunders, G.F. (1996). Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 271, 8588-8592.

30

Hewitt SM, Saunders GF. Differentially spliced exon 5 of the Wilms' tumor gene WT1 modifies gene function.

Anticancer Res. 1996 16(2): 621-6.

Raman, V., Martensen, S.A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J., and Sukumar, S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* 405, 974-978.

Lallemand, C., Bayat-Sarmadi, M., Blanchard, B., and Tovey, M.G.(1997). Identification of a Novel Transcriptional Regulatory Element Common to the p53 and Interferon Regulatory Factor 1 Genes. *J. Biol. Chem.* 272, 29801-29809.

10

Baldwin jr., A.S., LeClair, K.P., Singh, H., and Sharp P.A. (1990). A Large protein containing zinc finger domains binds to related sequence element in the enhancer of the class I major histocompatibility complex and kappa immunoglobulin genes. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1406-1414.

Michael C. Yeung and Allan S. Lau Tumor Suppressor p53 as a Component of the Tumor Necrosis Factor-induced, Protein Kinase PKR-mediated Apoptotic Pathway in Human Promonocytic U937 Cells *J Biol Chem*, Vol. 273, Issue 39, 25198-25202, September 25, 1998

20

Gabriele, L., Phung, J., Fukumoto, J., Segal, D., Wang, I.M., Giannakakou, P., Giese, N.A., Ozato, K., and Morse III, H.C. (1999). Regulation of apoptosis in myeloid cells by interferon consensus sequence-binding protein. *J. Exp. Med.* 190, 411-421.

30

Fisher, R.C., Olson, M.C., Pongubala, J.M.R., Perkel, J.M., Atchison, M.L., Scott, E.W., and Simon, M.C. (1998). Normal myeloid development requires both the glutamine rich transactivation domain and the PEST region of transcription factor

40

50

PU.1 but not the potent acidic transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4347-4357.

Pongubabla, J.M., Van Bevere,n C., Nagulapalli, S., Klemsz, M., McKercher, S., Maki, R., and Atchison, M.L. (1993). Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science* 259, 1622-1625

Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., and Costa, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4495-4499

10

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991) *Nature* 352, 345-347 Wt-p53 action in human leukaemia cell lines corresponding to different stages of differentiation.

Rizzo MG, Zepparoni A, Cristofanelli B, Scardigli R, Crescenzi M, Blandino G, Giuliacci S, Ferrari S, Soddu S, and Sacchi, A. *Br J Cancer* 1998 May 77:9 1429-38

20

Soussi T The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* 2000 Jun;910:121-37; discussion 137-9

Xu G, Sze SH, Liu CP, Pevzner PA, Amheim N Gene hunting without sequencing genomic clones: finding exon boundaries in cDNAs. *Genomics* 1998 Jan 15;47(2): 171-9

30

Seeler JS, Muchardt C, Suessle A, Gaynor RB. Transcription factor PRDII-BF1 activates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol.* 1994 Feb;68(2):1002-9.

40

50

Muchardt C, Seeler JS, Nirula A, Shurland DL, Gaynor RB. Regulation of human immunodeficiency virus enhancer function by PRDII-BF1 and c-rel gene products. *J Virol.* 1992 Jan;66(1):244-50.

Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. Surfing the p53 network. 2000 *Nature* 408, 307-310

Iwase S., Furukawa Y, Kikuchi J, Saito S, Nakamura M, Nakayama R, Horiguchi-Yamada J, Yamada H. Defective binding of IRFs to the initiator element of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE) promoter in an interferon-resistant Daudi subline. *FEBS Lett.* 1999 May 7, 450(3): 263-7.

10

Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990 Mar; 87(5): 1973-7.

20

Rechsteiner M., and Rogers S.W. PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS.* 21, 267-271 (1996).

Maziere C., Meignotte A, Dantin F. Conte MA, Maziere JC. Oxidized LDL induces an oxidative stress and activates the tumor suppressor p53 in MRC5 human fibroblasts.

Biochem Biophys Res Commun. 2000 Sep 24; 276(2): 718-23.

30

Gaynor, R.B., Muchardt, C., Diep, A., Mohandas, T.K., Sparkes, R.S., & Lysis, A.J. *Genomics* 9, 758-761 (1991).

40

50

Sims, S.H., Cha, Y., Romine, M.F., Gao, P.Q., Gottlieb, K., Deisseroth, A.B. *Mol. Cell Biol.* 13, 690-702 (1993).

Wu, H. & Lozano, G. *J. Biol. Chem.* 269, 20067-20074 (1994).

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1A】IPCS—BF1のクローニングに使用したレポーターの構築物の模式図。p 10
53又はIRF1遺伝子由来のIPCS又は変異型IPCSが、His3最小プロモーターの上流にクローニングされている。

【図1B】IPCS—BF1結合特異性の確認。IPCS—BF1/Ga14AD (IPCS—BF1/Ga14) 融合タンパク質又は空の発現ベクター (対照) による形質転換後に、ヒスチジンを欠く選択培地上にIPCS酵母レポーター系を蒔いた。各レポーター系は、固有のHIS3の漏出发現を有するので、それぞれ、IPCS—p53、IPCS—IRF1及びIPCSM—p53に対して、3ATを15、25及び40mMに調整した。

【図2A】PRDII—BF1及びIPCS—BF1のエキソン構造の模式図。本データはGaynor (91) 及びXu (Xu 99) の研究から推定されたものである。ヌクレオチドの位置は、FanとManiatis (1990) と同様である。 20

【図3】IPCS—BF1の推定アミノ酸配列。NLS候補、2つのZnフィンガードメイン、及びPESTDメインが枠で囲まれている。

【図4A】一過性発現のためのEGFP/GAAP—1融合タンパク質をコードするプラスミド構築物。

【図4B】EGFP/GAAP—1変異体の細胞内分布。表記の発現ベクターを用いて、HuH7細胞を一過性トランスフェクションした。24時間後に、ヘキスト33342で核を染色し、共焦点光学顕微鏡によって検査した。

【図5】5a) IPCS—p53プローブ及びインビトロ翻訳されたGAAP—1 (レーン1)、GAAP—1 mtZ1 (レーン3)、GAAP—1 mtZ2 (レーン5) 30
、又は空の発現ベクターを有する網状赤血球ライセート (レーン7) を用いたEMSA。偶数列：50倍モル過剰のIPCS—p53オリゴヌクレオチドを前のレーンの反応物に添加した。矢印は特異的複合体を示す。

【0156】

5b) IPCS—p53プローブをNF—κBオリゴヌクレオチドと取り換えた以外はBと同様。

【0157】

5c) 2つのZnフィンガードメインのアミノ酸配列。GAAP—1 mtZ1又はGAAP—1 mtZ2において置換される残基に下線が付されている。

【図6】GAAP—1の翻訳後修飾の測定。EGFP、EGFP/GAAP—1、GAAP—1/EGFP、EGFP/GAAP—1 del PEST発現ベクターのいずれかで安定的にトランスフェクションし、抗EGFP抗体でプローブした、HeLa細胞から得た20μgの細胞抽出物のウェスタンブロット分析。 40

【図7】EGFP/GAAP—1発現ベクターで安定的にトランスフェクションしたK562細胞の核抽出物を用いたEMSAによる、分子内切断がGAAP—1のDNA結合特性に及ぼす効果の分析。

【図8】同時トランスフェクションアッセイにおける野生型並びに変異型p53、TRF1プロモーター、IPCS—SV40キメラプロモーター及びHIV—LTRの相対的活性。3μgのレポータープラスミド及び表記の7μgの発現ベクターで、U937細胞を一過性に同時トランスフェクションした。pcDNA3.1ベクターを対照として使用し 50

た。トランスフェクション効率を標準化するための内部標準として、pRL-SV40プラスミドを使用した。トランスフェクションした細胞をトランスフェクションから8時間後に収集して、ルシフェラーゼ活性を分析した。

【図9】GAAP-1又はEGFP発現ベクターを用いて、U937及びK562細胞を安定的にトランスフェクションし、半流動性のメチルセルロース培地中でG418を使用して選択した。クローン数は21日目に測定した。

【図10】GAAP-1のアポトーシスへの関与。EGFP又はEGFP/GAAP-1発現ベクターで安定的にトランスフェクションしたU937細胞の自発的なアポトーシスを、アネキシンV-PE/7-AAD二重標識によって分析した。

【図11】EGFP又はEGFP/GAAP-1発現ベクターのいずれかで安定的にトランスフェクションし、抗p53又は抗IRF1抗体でプローブした、U937細胞からの細胞抽出物20µgのウェスタンブロット分析。

【図12】EGFP又はEGFP/GAAP-1融合タンパク質発現ベクターのいずれかで安定的にトランスフェクションしたU937細胞を、1mM 5FUで処理するか、又は処理しなかった。処理から72時間後に、TUNELアッセイによってアポトーシスを分析した。

【図13】A2ra-c又はK562赤血球細胞のヘミンによる自発的又は誘導性の分化に対して、GAAP-1の発現が及ぼす影響。

【図14A(a)】GAAP-1及びPRDIIの配列。

【図14A(b)】GAAP-1及びPRDIIの配列。

【図14A(c)】GAAP-1及びPRDIIの配列。

【図14B(a)】GAAP-1ヌクレオチド及びアミノ酸配列のバリエーション。

【図14B(b)】GAAP-1ヌクレオチド及びアミノ酸配列のバリエーション。

【図14B(c)】GAAP-1ヌクレオチド及びアミノ酸配列のバリエーション。

【図14C(a)】GAAP-2の配列。

【図14C(b)】GAAP-2の配列。

【図14C(c)】GAAP-2の配列。

【図15A】GAAP-1及びPRDIIの配列。

【図15B】GAAP-1ヌクレオチド及びアミノ酸配列のバリエーション。

【図15C】GAAP-2の配列。

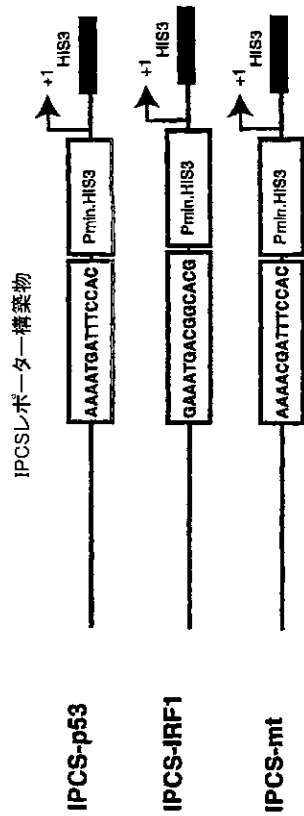
【図16】プラスミドpGAAP1(EGACC 01052921)のマップ。

10

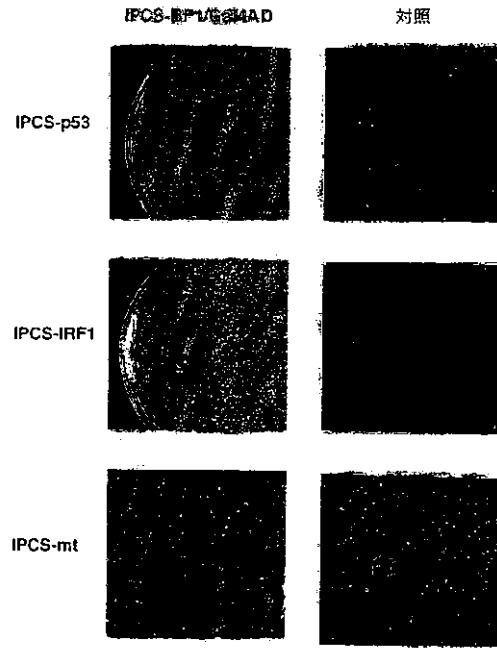
20

30

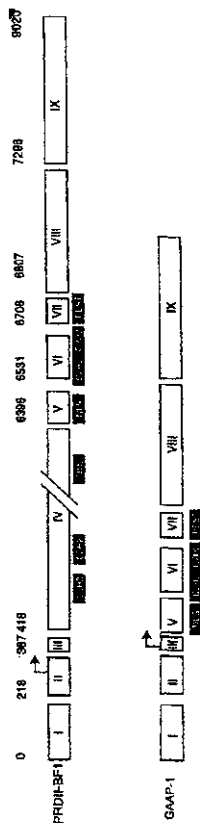
【図 1 A】



【図 1 B】



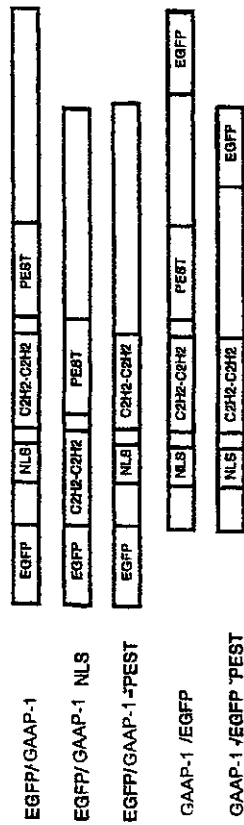
【図 2 A】



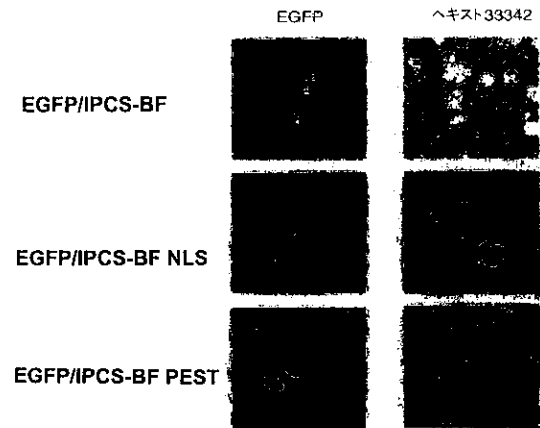
【図 3】

AA 1 M A L G N Q K S T W E F S N K D A S E I N S E Q D K E N S L I K S E P R I K I F
51 D G Y K S N E E V V Y I R G R G R K V D E E Q I R C K K S I M K K H I R T H T D V R P Y H
91 C Y C N E S E K L G N I L T R M K S K A H S K C Y D L G I S V Q L I D E Q D T E E S D E K O R
191 F S Y R S G Q Y D L E E S D P E D D N E N E D D E D S Q A E S V S A T P S V T A S P O H L P
201 S R S L Q D P V S T D E D V R I D C T F S G V H T D P M D V L P R A L T R M I A S T A O S D Y
251 N R K T L S P G K A H Q A A R D E N D T P S V D T S R S F C H Q N S Y D I P E S E E I R S S M
301 A G K A V A I T Q S P S S V R L P A A A E H S P Q I T A A G M P S V A S P T P D P Q E G K Q D L
351 Q P T P G L P S P H T H L F S H L P L H S Q Q B R T P Y N M V P Y G G I R V P A G L Y S T E V
401 P L C A G P V Q L I P A V S V W H R T L G T H R N T V T E V S G T T N P A G V A E L S V A T Q I
451 P I G Q I R Y P G L Q N L S T P G L O S L P S L S M E T Y N I V G L A N T I N M A F Q N H P T G L A L
501 N A V G L Q V L T A N P S S Q S S P A P Q A H I P G L Q I L N I A L P L I P S V S Q V A V D A G G
551 A P E M P A S Q S K A C E T Q P K Q T S V A S A N Q V B R T E S P Q G L P T V Q H E N A K Y L N P
601 P A P A G D H A R L D G L S K M D T E K A A S A N H V K P K P E L T S Q G Q P A S T S Q P L I K A
651 H S E V F T K P S G Q Q T L S P D R Q V P R I T G L P R R Q P T V H F S D V S S D D E D R L V A
701 T

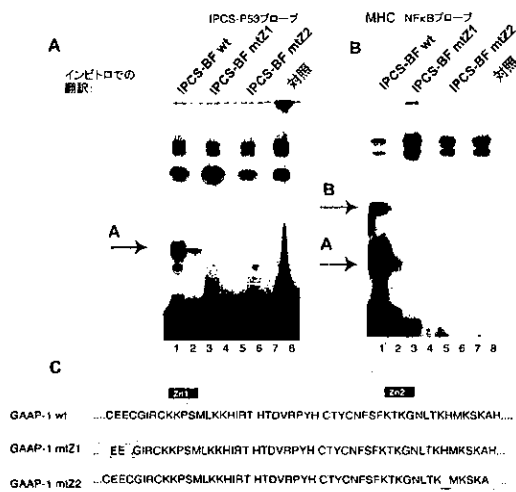
【 図 4 A 】



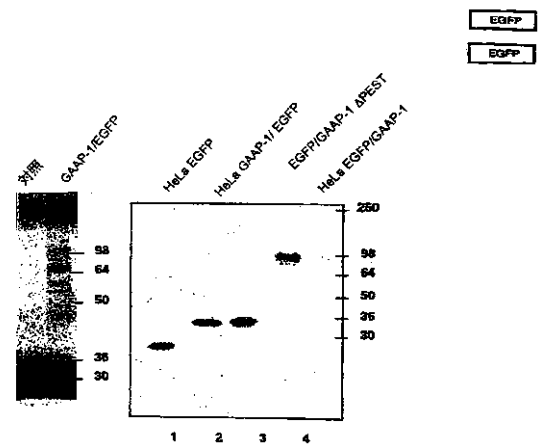
【 図 4 B 】



【 図 5 】



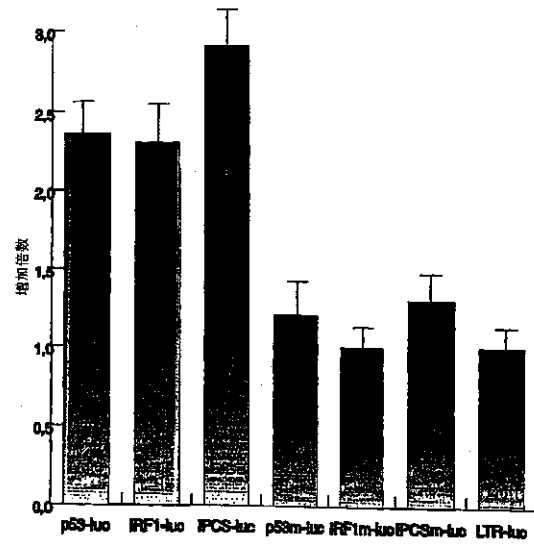
【 図 6 】



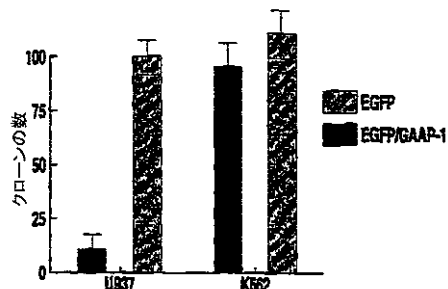
【 図 7 】



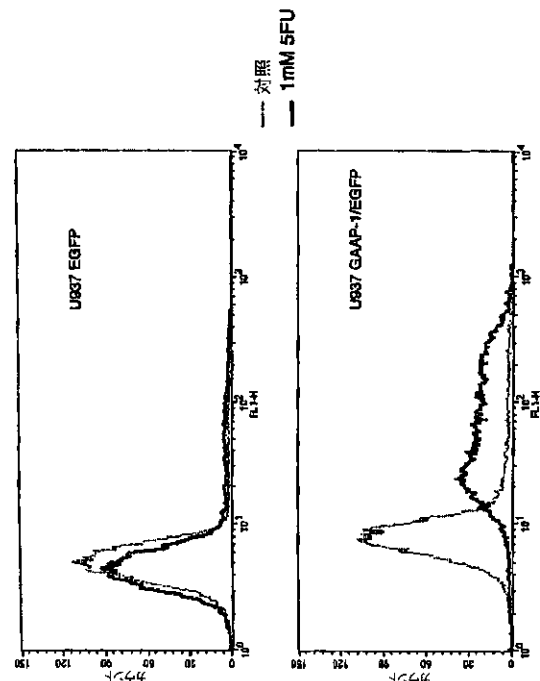
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 ㊦ 1 4 A (c) 】

[illegible]

【 ㊦ 1 4 B (b) 】

[illegible]

【 図 1 4 C (a) 】

1	ATGGGCGCAG TCCCGCGTCT	CTAATTCAAA ACGGTTTCTT	AAGAGATTA TTCTTTTAGA	TACAGCTGAT ATGTCGGCAG	TTGTAAAGAA ACGAATTCTC
51	ACTTCGGGAT TGAAGCGTTA	CCGTTAAGAA GGGAAATTC	GAGCATTAGG TCGTGATCC	TAAATCAAAAG ATATGATTTC	TCGACAGTAG AGGCTGTATC
101	TTGACATGAT ACCTTAAAGC	CAATTAAGAT TTATTTCTTA	GCCTCTGAAG GGAGAGCTTG	TTACAGCTAT AACTGCTGAT	GCAGATAGAA GCTGTCTATT
151	GAAATATCT CTATTAAAGG	TATTAAGAA ATTATCTTTC	TTGACAGAA ACTTGGTTTC	AGCAATTAAT TCCTTAATTT	TATTTATGAT ATTACTATCC
201	AGGATATAAG TCTATATATC	TCAAAATGAG ACTTTTACTC	AGTATGTATA TCATACATAT	TATCCGAGCG ATAGGCTCGC	AGGGGAGAGG TCCCTCTCTC
251	GAAATATCAT CTTTATATTA	CTTTGAGAA AAGACTATAT	TTGGGAATAC ACACCTCTAG	GTCTTAGAAG CACTATGATG	ACCTGATGAT TGGATCTGAT
301	TAATGAAGAA AATATCTTTC	AGNTAGAGCT TGATGCGGTC	ATCATACAT GGTATGATTA	CTGCGGCTCT CGAGCGGGGA	ACGATCTACT TGGTAGCTGT
351	TTACTGTAAAC AATGACATTC	TTCTCCCTTA AAGAGGAATAT	AGACTAAAGG TCTGATTCTC	AAATCTGACA TTTAGACTGT	AAACACATGA TTTGTGTACT
401	ATCGCGAGCG TACGCTTCGG	ACATATGAGC TTGATCGGTC	AAATGTGTGG TTTACAGAGC	TAAATAGCTT ATAATACGTA	CTCAGTATCT GAGTCAATCA
451	TTATAGATCT AATATCTAC	ACAGGATATA TTGCTGTATG	AGAGATAGAT TTCTCTTAGT	GATGAAGAAC CATCTTTTGG	AGAGTTTGAT TCTTCTAGTC
501	TTATAGAGCA AATACTCGCT	TCGTGATATG AGACTATAC	ACCTTGAAGA TAGAATCTCT	ATCTGATGCG TAGACTACCG	CCAGATAGGG GCTCTACTTC
551	ATGACATAT TACCTGTAT	TTATGAGAT AAATCTGAT	GAGATAGAGG CATCTATGAT	ACAGCCGAGC TGCTGGGCTC	TGATATCACT ACTATGATCA
601	CTGTACAGCA GACATCCGCT	CGGCGATCT GAGCGAGTCA	CACAGCTAGC GTCTGCGTAG	CCGCGACAGC TGGCTGCTGC	TTGCTCATAT AAGGTAGTAG
651	AAGTAGCCTT TTCATCGGAA	CAGAGCCTCT GTCTCTGGAC	TGAGTACTGA ACTCATGACT	CGAGAGATCT GCTCTACAG	AGGATCACGC TCTCTATGAT
701	ATGCTCTGAT TACAGCAAG	TGGGCTGAT ACCAAGGCTG	AGGCTACCA TGGTCTGAT	TGGAGCTCTT CTGCTACAGA	GGCCAGCGGCG TCTGCTGATG
751	CTGCTCACCA GAGAGGTATG	GATATGATCA TCTATGACCA	CTTGAGATGCT GNACTCTGCT	CGAGCTCTAT CGCTCTGACG	ATCATAGTAT TAGTGTATAC
801	GAGACACTCT CTTCTGTAG	TCTCCGGGGA AGAGGCGGCT	AGGCCAGGCA TCGGGTCCGT	GGGTCTGCTG CGACAGAGCG	AGAGATAGAA TCTCTACTTT
851	ACGAGATGAT TCTGTGTTG	TCGCTCTGTA TCTGCTGAT	GACATCTGCA CTCTGAGAG	GGTCCGGCTT CCGCGGCTCT	TCATGATCAT ATAGATCTAG
901	TCGTGGGACT ATGCTGAGCT	ACGCTTGACT TGGGCTGATC	AGAGACAGAT TCTTCTTTAA	CTGACAGATT GACTCTGATG	CTATGACGAGC GATAGCTCCG

【 図 1 4 C (c) 】

1901	AGAGGCGCTG TCTTCGCGGC	CTTGCGCAAT GAGCGCTTTA	CAGCTGAGAC ACTGCACTTG	CCAGCTGACG GGTTCGGA-TG	ACTCACTTGC TGAGTTGAGG
1951	ATRCAGGCGC TATGTTCGGG	AACCAGGCGT TTGGTGCAGC	CAGCTGCBCA GTGCACTGTT	CCTCTGCTGT GGAGACGA-T	AGGACATATC TCGGTGTAAG
2001	TGAAGATTTT ACTTCTAARA	ACAAAGCCCT TGTTTCGGSA	CAGCGCAGCA CTCGCGTCTG	GACTCTCTCT GAGACAGCA	CCAGCAGCAG GGATCTGTGC
2051	AGGTTCCGAC TCCAGGGGTC	GCCCCAGTCA CGGGTGTCTC	CTACGCCGAC GATGGCCGCT	GCGACGCCAC CGGTCTGGGT	TGTGCATCTC ACACGTGAGG
2101	AGCGACGTGA TCGCTGCAC	GCAGCGCATG GTGTCGTACT	TGAGGAGGAC AGGCTGTGTG	TCCGAGACAT TCGCGATGTC	TAGCAACTCG ATGTTGGAGC
2151	A				

【 図 1 5 A 】

2 GAP-1 ポリペプチド

[illegible]

【 ㊦ 1 5 B 】

2 GRAP-1 ポリペプチド

[illegible]

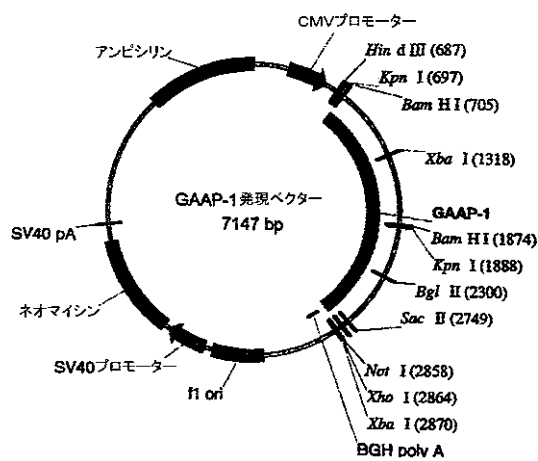
【 ㊦ 1 5 C 】

```

1  MSQKFKKKKS YRLVLKELRN PLKRALGNQK STVVEFSNRD ASEINSEQDK
51  ENSLIKSEPR RIKIFDGGYK SNEETVYIRG RGRGKYICEE CGIRCKCKPM
101 LKKHIRTETD VRPYHCTYCN PSFKTKGNLT KRMKSQRSK KCDVLGISVG
151 LIDEQDTEES DEKQFSYER SGYDLEESDG PDDEDNENDO DDEDSQAESV
201 LSATPSVIAS PQHLPSRSSL QDPYSTDEDV RITDCFSGVH TQPMDLVRA
251 LLTRMTVLST AQSDYNRRTL SPGKQRQAA RDENDTIPSV DTSSRSCQM
301 SVDYPESEEL LRSSMAGKAV AITQSPSSVR LPPAAAEKSP QTAAGMPSVA
351 SPRPDPQEQK QGITLQTPG LPSPHLHFS HLPLHSQQQS RTPTNMVPVG
401 GINVEAGLT YSTFVPLQAG PVOLTIPAVS VVHRTLGTHR NTVTEVSGTT
451 NPAGVAELSS VVFCTIPQI RVFGLQNLST PGLQSLPSIS METVINVGLA
501 NTNMAPOVHP PGLALNAVL QVLTAHPSSQ SSPAQAHIP GLQILNIALP
551 TLIPSVSQVA VDAQGAPEMP ASQSKACETQ PKQTSVASAN QVSRTESPG
601 LPTVQRENAK KVLNPPAPAG DBARLDGLSK MOTEKAASAN RVKPKPELTS
651 IQQPASTSQ PLLKAHSEVF TKPSGQQTLS PDQGVPRPTG LPRQPTVRF
701 SDVSSDDDED RLVIAT

```

【 1 6 】



【配列表】

2005508611000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/07064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) onto both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
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) BIOSIS, MEDLINE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUCHARDT C ET AL: "Regulation of human immunodeficiency virus enhancer function by PRDII - BF1 and c-rel gene products." JOURNAL OF VIROLOGY, (1992 JAN) 66 (1) 244-50., XP001037734 cited in the application the whole document	1-18, 20-45, 47-50
X	LALLEMAND C ET AL: "Identification of a novel transcriptional regulatory element common to the p53 and interferon regulatory factor 1 genes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 NOV 21) 272 (47) 29801-9., XP001026061 cited in the application the whole document	30,48
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ 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. *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 July 2003		Date of mailing of the international search report 05/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. S1 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hardon, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/07064

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FAN C M ET AL: "A DNA-binding protein containing two widely separated zinc finger motifs that recognize the same DNA sequence." GENES AND DEVELOPMENT, (1990 JAN) 4 (1) 29-42., XP001037718 cited in the application the whole document	1-18, 20-45, 47-50
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession no. Q32133, 1 November 1996 (1996-11-01) MAEKAWA, T. ET AL.: "HIV-1 enhancer binding protein" XP002246784 abstract	1-18, 20-45, 47-50
X	DATABASE EMBL 'Online! 1 November 1996 (1996-11-01) BALDWIN, A.S. ET AL.: "DNA-binding protein (Mbp-1)" Database accession no. Q14122 XP002246785 abstract	1-18, 20-45, 47-50

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/47	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100108855
弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 トベイ、マイケル
フランス国、エフ - 7 5 0 0 5 パリ、リュ・ラグラージュ 7

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA13 FB02 FB05
4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA04 CA09 DA03 EA02 EA04 GA13
HA11 HA13 HA14 HA20
4B063 QA01 QA05 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ42 QQ43
QQ48 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62
QR77 QR80 QS16 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA19 BA02 BA08 BA22 NA14 ZB26
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	参与调节细胞生长或细胞增殖的基因的转录调节因子。使用对照因子作为治疗或诊断剂		
公开(公告)号	JP2005508611A	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003502036	申请日	2002-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	Santoru-Nashiyonaru德拉Rusherushe谢伊洋科技		
[标]发明人	トベイマイケル		
发明人	トベイ、マイケル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/4702 A61K48/00 C12N2799/021		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C12Q1/02 C12Q1/68. A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QQ48 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	河野 哲 中村 誠		
优先权	2001401476 2001-06-07 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(P200X (43) 公表日 平成17年4月7日			
	(51) Int. Cl. ⁷			
肿瘤抑制基因的组成型表达p53和IRF1 (干扰素调节因子1) 是在遗传毒性损伤或异常增殖期间维持细胞增殖调节所必需的。GAAP-1或阳性转录因子的p53的两个基因的启动子区域中存在的转录因子结合 (剂结合共同序列IRF1和p53) 和IRF1 , 表示会计-2。本发明涉及GAAP-1或GAAP-2的用途鉴定和克隆cDNA以及鉴定对应于可变剪接的PRD II-BF 1 mRNA前体的75kDa产物的编码蛋白质。	F I		テーマコード (	
	C 1 2 N 15/09 A 6 1 K 31/7088 A 6 1 K 38/00 A 6 1 K 45/00 A 6 1 K 48/00	C 1 2 N 15/00 A 6 1 K 31/7088 A 6 1 K 45/00 A 6 1 K 48/00 A 6 1 P 35/00		Z N A A 2 G 0 4 5 4 B 0 2 4 4 B 0 6 3 4 B 0 6 5 4 C 0 8 4
	審査請求 未請求		予備審査請求 有 (全 45 頁) 最	
(21) 出願番号	特願2003-502036 (P2003-502036)		(71) 出願人	598125981
(86) (22) 出願日	平成14年6月6日 (2002.6.6)		サーントル・ナシヨナル・ドゥ・	
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月8日 (2003.12.8)		エルシェ・シヤンティフィック	
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/007064		Centre National	
(87) 国際公開番号	W02002/098916		la Recherche Sc	
(87) 国際公開日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		i f i q u e	
(31) 優先権主張番号	01401476.5		フランス国、7 5 7 9 4 パリ・	
(32) 優先日	平成13年6月7日 (2001.6.7)		1 6、リュ・ミシェル・ア	
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		3	
			(74) 代理人	100058479
				弁理士 鈴江 武彦
			(74) 代理人	100091351
				弁理士 河野 哲
			(74) 代理人	100088683
				弁理士 中村 誠
				最終頁