(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2004 年9 月10 日 (10.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/076483 A1

(51) 国際特許分類[7]: C07K 14/47, C12N 15/12, A61K 38/00, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002238

(22) 国際出願日: 2004 年2 月25 日 (25.02.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-048658 2003 年2 月26 日 (26.02.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4-1-8 Saitama (JP). 国立がんセンター総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地5-1-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田矢 洋一 (TAYA, Yoichi) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター研究所 放射線研究部内 Tokyo (JP). 江成 政人 (ENARI, Masato) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター研究所 放射線研究部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 下田 昭 (SHIMODA, Akira); 〒1040031 東京都中央区京橋3-3-4京橋日英ビル4階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/076483 A1

(54) **Title:** TRANSCRIPTIONAL FACTOR INDUCING APOPTOSIS IN CANCER CELL

(54) 発明の名称: 癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

(57) **Abstract:** It is intended to provide a novel means of treating cancer whereby cancer cells are destroyed by inducing apoptosis exclusively therein. Namely, a transcriptional factor for inducing apoptosis in cancer cells which comprises p53 or a p53 mutant having deletion, substitution or addition of one to several amino aids in p53 and clathrin heavy chain. This transcriptional factor enhances the transcription ability of p53AIPI promoter and thus induces apoptosis in cancer cells.

(57) 要約: 癌細胞にのみアポトーシスを誘導して死滅させる新しい癌治療の手段を提供する。ｐ５３又は１個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異ｐ５３、及びクラスリン重鎖から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子である。この転写因子は、ｐ５３ＡＩＰ１プロモーターの転写能を高め、癌細胞のアポトーシスを誘導する。

明 細 書

癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

技術分野

この発明は、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子に関する。

従来技術

癌抑制遺伝子ｐ５３はｐ２１、ｐ５３Ｒ２又はｐ５３ＡＩＰ１等の標的遺伝子のＤＮＡ配列に特異的に結合して、その転写活性を制御する転写因子であり、近年ｐ５３の関与する細胞癌化のメカニズムは詳しく研究されてきている（細胞工学 vol. 22, No.1, 23-28 (2003)）。ｐ５３が制御する標的遺伝子の中で、ｐ５３ＡＩＰ１はミトコンドリアに局在するタンパク質で、ミトコンドリアの膜電位とシトクロムｃの放出を制御することで正のアポトーシス作用を有している（Oda K. et al., Cell, Vol.102, 849-862, 2000 ; Matsuda K. et al., Cancer Res., Vol. 62, 2883-2889, 2002）。このｐ５３ＡＩＰ１はｐ５３によるアポトーシス誘導に重要な役割を持つＳｅｒ４６のリン酸化（特願２００１－２９２９５３）に強い相関を示し、ｐ５３ＡＩＰ１遺伝子の発現により癌細胞のアポトーシスが誘導される。例えば、ＤＮＡが損傷される等の強いストレスを受けると、転写因子ｐ５３のＳｅｒ４６がｐ５３ＤＩＮＰ１等の働きによりリン酸化を受け、ｐ５３ＡＩＰ１の発現が誘発され、癌細胞のアポトーシスが誘導されると考えられている（細胞工学 vol. 22, No.1, 23-28 (2003)）。

一方、癌細胞のアポトーシスを誘導することを目的として、シスプラチンなどの抗癌剤が使用されているが、ほとんどがＤＮＡに傷をつけることによってアポトーシスを誘導するものである。そのため、正常細胞のＤＮＡにも傷がついて副作用が現れる。癌の放射線療法も同様に正常細胞のＤＮＡに傷がついて副作用が現れる。

この他にも、ｐ５３の遺伝子や、ｐ５３によって誘導されてアポトーシスを誘導するＢａｘやｐ５３Ａ１Ｐ１などの遺伝子をアデノウィルスベクターに組み込

んで癌細胞に感染させ、アポトーシスを誘導させて死滅させようという試みもなされてはいるが、よい結果が得られているとはいえない。

発明が解決しようとする課題

この発明は、癌細胞にのみアポトーシスを誘導して死滅させる新しい癌治療の手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、癌細胞からｐ５３の発現に伴ってクラスリン重鎖と見られる約１７０ｋＤａのタンパク質が共沈殿してくることを見出し、クラスリン重鎖のｃＤＮＡを発現ベクターに導入して癌細胞の核内へトランスフェクトすると、ｐ５３ＡＩＰ１プロモーターの転写能を高めることを見出した。このような結果から、このクラスリン重鎖とｐ５３とが結合して転写因子を構成し、ｐ５３ＡＩＰ１プロモーターの転写能を高め、癌細胞のアポトーシスを誘導すると結論された。

即ち、本発明は、ｐ５３（配列番号１）又はその１個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異ｐ５３、及びクラスリン重鎖（配列番号２）から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子である。これらは、ヒト等の組織や細胞から抽出・精製して取り出して用いてもよいし、これらをコードするＤＮＡを含む形質転換体を培養して得て用いてもよい。

また、前記変異ｐ５３は、少なくとも４６位のＳｅｒが置換されたｐ５３であってもよく、特にその４６位のＳｅｒがＰｈｅに置換されていることが好ましい。

また本発明は、この転写因子を有効成分とする癌の治療薬である。

図面の簡単な説明

第１図は、クラスリン重鎖によるｐ５３ＡＩＰ１の転写活性の制御の概念図を示す。

第２図は、ｐｃ－ｐ５３－ｆベクターの構造を示す。

第３図は、ｐ５３ＡＩＰ１．ｐｒｏ．ｒｅｐｏｒｔｅｒベクターの構造を示す。

第４図は、ｐｃ－ＣＨＣベクターの構造を示す。

第５図は、発現ベクター（pcDNA-p53-f）をヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、そのｐ５３Ａ１Ｐ１プロモーターからの転写能を示す。

第６図は、発現ベクター（pcDNA3.1、pcDNA-p53-f）をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞抽出物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（銀染色）を示す。

第７図は、発現ベクター（pcDNA-p53-f）をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞抽出物の抗クラスリン重鎖抗体及び抗ｐ５３抗体によるウエスタンブロットを示す。図中、WT は WT-p53、46A は S46A-p53、46D は S46D-p53、46F は S46F-p53、Δ44-63 は 44-63-p53 を用いたものを示す。

第８図は、発現ベクター（pcDNA3.1、pcDNA-p53-f）をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞の細胞質及び核抽出物に対し、抗クラスリン重鎖抗体を用いたウエスタンブロットを示す。図中、pcDNA は pcDNA3.1、WT は WT-p53、46F は S46F-p53、Δ44-63 は 44-63-p53 を用いたものを示す。

第９図は、クラスリン重鎖のｃＤＮＡを入れた発現ベクター（pc-CHC）とｐ５３発現ベクター（pcDNA-p53-f）を共にヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた結果を示す。図中、Clathrin HC は pc-CHC、WT は WT-p53、S46F は S46F-p53、Δ44-63 は 44-63-p53 を用いたものを示す。

発明の実施の形態

クラスリンには重鎖と軽鎖とがあり、普通は細胞表面から内部への物質の取り込みであるエンドサイトーシスに働く。しかし、本研究の結果、発明者らは、このクラスリン重鎖が、第１図に示すように、癌細胞の中で軽鎖とは結合せずにｐ５３と結合してｐ５３の転写活性化能を高め、アポトーシスを強く誘導することを見出した。特に、ｐ５３のセリン４６をフェニルアラニンに置換したｐ５３とは特に強く結合してアポトーシスも強く誘導する。

本発明の転写因子を何らかの方法で癌細胞に注入するか、又はクラスリン重鎖のみを何らかの方法で癌細胞に注入し癌細胞中に存在するｐ５３と結合させることにより、癌細胞にアポトーシスを誘導して死滅させることができる。

このような転写因子を利用すれば、正常細胞には傷をつけないで、癌細胞にのみ特異的に、従来の方法よりも効果的にアポトーシスを誘導させて死滅させることが可能になり、従来の方法よりも効率のよい癌治療法になる。

以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。

試験例１

この試験例では、以後の試験で用いる下記５種のベクター（これらを総称して「pcDNA-p53-f」という。）を作成した。

(i) 野生型ヒトｐ５３遺伝子をｐｃＤＮＡ３プラスミド（Invitrogen 社、第２図参照）に挿入した野生型ヒトｐ５３発現ベクター（以下「WT-p53」という。）

(ii) ４６位のＳｅｒをＡｌａに置き換えた変異型ヒトｐ５３遺伝子をｐｃＤＮＡ３プラスミドに挿入した変異ヒトｐ５３発現ベクター（以下「S46A-p53」という。）

(iii) ４６位のＳｅｒをＡｓｐに置き換えた変異型ヒトｐ５３遺伝子をｐｃＤＮＡ３プラスミドに挿入した変異ヒトｐ５３発現ベクター（以下「S46D-p53」という。）

(iv) ４６位のＳｅｒをＰｈｅに置き換えた変異型ヒトｐ５３遺伝子をｐｃＤＮＡ３プラスミドに挿入した変異ヒトｐ５３発現ベクター（以下「S46F-p53」という。）

(v) ４４～６３位を欠失させた変異型ヒトｐ５３遺伝子をｐｃＤＮＡ３プラスミドに挿入した変異ヒトｐ５３発現ベクター（以下「44-63-p53」という。）

以上のベクターを以下の手順で作成した。

各種pcDNA-p53-fは、まずpcDNA3プラスミド（Invitrogen社）を制限酵素 XhoI 部位及び XbaI 部位で切断し、9 アミノ酸残基からなる Flag 配列(GDYKDDDDK)をコードする二本鎖ＤＮＡ(配列番号８)を挿入した(pcDNA-f)。作製したpcDNA3-fプラスミドの制限酵素BamHI部位及びXhoI部位を切断し、

BamHI 部位及び XhoI 部位切断末端を持つ野生型ヒト p53 遺伝子（配列番号９）又は変異型ヒト p53 遺伝子を挿入した（pcDNA-p53-f)。これらベクターの地図を第２図に示す。

試験例２

この試験例では、p53AIP1 遺伝子イントロン１内にある p53 結合配列を含む約 500bp を pGL3-promoter ベクター（Promega 社）の luciferase 遺伝子の上流へ挿入したレポータープラスミドを作成した。

pGL3-promoter ベクター（Promega 社）を制限酵素 SacI 部位及び BglII 部位で切断し、制限酵素 SacI 部位及び BglII 部位切断末端を持つ p53 結合配列を含む p53AIP1 イントロン１（約 500bp、配列番号１０）を挿入した。このベクターの地図を第３図に示す。以下このレポーターを「p53AIP1pro.reporter」という。

試験例３

試験例１と同様の操作で、クラスリン重鎖遺伝子（かずさＤＮＡ研究所から分与、配列番号１１）を pcDNA3 プラスミド（Invitrogen 社、第２図参照）に挿入して、クラスリン重鎖発現ベクター（以下「pc-CHC」という。）を作成した。このベクターの地図を第４図に示す。

試験例４

この試験例では、試験例１で用意した５種の発現ベクターをヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた。

試験は以下の手順で行った。

１）7 X 10^4個のSaos-2細胞（骨肉腫由来）を24穴プレートに蒔き、一晩培養した。

２）トランスフェクションするためのDNAを、試験例１と試験例２で用意したpcDNA-p53-fとp53AIP1pro.reporterを用いて、表１のように調製した。加えた各pcDNA-p53-fは０～３０ｎｇ用い、pcDNA3.1と併せて総量30 ngとした。

なお、phRG-TKは、ウミシイタケluciferaseを発現するプラスミド（Promega社、内部コントロール）を示す。トランスフェクションの方法はInvitrogen社のキットに添付されているプロトコールに従った。

表1

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	30 ng
p53AIP1pro.reporter	100 ng
phRG-TK	10 ng
Total	140 ng
OPTI-MEM	25 µl

DNA溶液

OPTI-MEM	25 µl
Lipofectamine 2000	0.28 µl

Lipo溶液

3）DNA溶液とLipo溶液を混和し、室温で30分間インキュベーションした。

4）そのDNA-liposome複合体を1）で調製した細胞に滴下した。

5）4時間後、DNA-liposome複合体を除去し、細胞を1 X PBS-で洗浄した。

6）トランスフェクションしてから24時間後、細胞を1 X PBS-で洗浄し、Dual luciferase assay kit （Promega社）を用いて、細胞中のホタルluciferase活性及びウミシイタケluciferase活性（内部コントロール）をそれぞれルミノメーターで測定した。その測定方法は、Promega社のキットに添付されているプロトコールに従って行った。

7）pcDNA3.1を導入した細胞抽出液中のホタルluciferase活性をウミシイタケluciferase活性で割った値を1とした時の相対的な活性（Fold Activation）を算出した。

その結果を第５図に示す。ｐ５３のＳｅｒ４６Ｐｈｅ置換体はｐ５３Ａ１Ｐ１プロモーターからの転写を野生型よりもかなり強く誘導することがわかった。

実施例１

この実施例では、試験例１で用意した５種の発現ベクターをヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた。

試験は以下の手順で行った。

1）9×10^{6}の H1299 細胞（非小肺がん由来）を 15 cm ディッシュに蒔き、一晩培養した（10 枚）。

2）トランスフェクションするためのDNAを表2のように調製した。トランスフェクションの方法はRoche Applied Scienceのキットに添付されているプロトコールに従った。

表2

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	8 μg	
FuGENE 6	48 μl	
D-MEM	752 μl	ディッシュ1枚当たり

DNA-liposome溶液

3）そのDNA-liposomeを室温で30分間インキュベーションし、1）で調製した細胞に滴下した。

4）トランスフェクションしてから21時間後、細胞をスクレイパーで剥がし、600 x g、5分間低速遠心して細胞を回収した。

5）細胞を1度X PBS-で洗浄した後、10 mlの表3の下記細胞溶解緩衝液で細胞を溶解した。

表3

細胞溶解緩衝液＊

50 mM Tris-HCl (pH7.2)	10 μg/ml antipain
150 mM NaCl	10 μg/ml pepstatin
2 mM $MgCl_2$	10 μg/ml chymostatin
0.1 mM EDTA	10 μg/ml leupeptin
0.1 mM EGTA	10 μg/ml E64
0.5 mM DTT	10 μg/ml PMSF
1 mM Na_3VO_4	0.1 % NP-40
10 mM NaF	

6）細胞を超音波破砕後、不溶性画分を15krpm、15分間、4℃で除去した。

7）その上清を0.2 mlの抗FLAG抗体アガロースビーズ（Sigma）と一晩インキュベーションした。

8）インキュベーション後、ビーズを上記細胞溶解緩衝液で4回洗浄した。

9）その後、1.5 mg/ml FLAG ペプチドを含む上記細胞溶解緩衝液で競合的にビーズからp53タンパク質溶出した。

１０）その溶出画分をSDS-PAGE次いで銀染色した。

その結果を第６図に示す。その結果、Ｓ４６Ｆ置換体ではｐ５３と一緒に分子量１７０ｋＤａのタンパク質が強く共沈澱してくる。これをマススペクトロメトリーにかけてみたところ、ＬＨＩＩＥＶＧＴＰＰＴＧＮＱＰＦＰＫ、ＩＶＬＤＮＳＶＦＳＥＨＲ、ＶＡＮＶＥＬＹＹＲ、ＱＬＰＬＶＫＰＹＬＲ、及びＶＤＫＬＤＡＳＥＳＬＲ（配列番号３～７）のアミノ酸配列が得られた。これらは、それぞれクラスリン重鎖（配列番号２）の２２８－２４５、１０１１－１０２２、１３９８－１４０６、１４４４－１４５３、及び１６１０－１６２０位に相当する。これは、この１７０ｋＤａのタンパク質がクラスリンの重鎖であることを示す。

１１）170 kD のタンパク質の同定には銀染色で使われた量の約２０倍のタンパク質を濃縮し、SDS-PAGE次いでCBB染色、目的バンドの切り出し、トリプシン消化後、質量分析を用いて行った。

１２）１０）の実験手順で得られた溶出液の100分の１容をSDS-PAGE次いでPVDF膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体（Transduction Laboratories）あるいは抗p53抗体（Santa Cruz）を用いたウエスタンブロッティング法を行った。ここではAmersham社のhorseradish peroxidase-抗マウスIgG二次抗体とECLキットを用いてバンドを視覚化した。

その結果を第７図に示す。Ｓ４６Ｆ置換体にクラスリン重鎖が特に強く結合することがわかった。

試験例５

この試験例では、実施例１で用いたヒト非小肺がん由来細胞の核抽出物を調べた。試験は以下の手順で行った。

１）15 cmディッシュ一枚分を実施例１と同様の手順でトランスフェクションした。

２）細胞を回収後、1 ml の表４の低張緩衝液＊１で細胞を懸濁し、ホモジナイザーで細胞膜を破壊した。

表4

低張緩衝液＊1

10 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 μg/ml antipain
10 mM KCl	10 μg/ml pepstatin
1.5 mM $MgCl_2$	10 μg/ml chymostatin
0.5 mM DTT	10 μg/ml leupeptin
1 mM Na_3VO_4	10 μg/ml E64
50 mM NaF	10 μg/ml PMSF

高張緩衝液＊2

25 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 μg/ml antipain
420 mM KCl	10 μg/ml pepstatin
10 % glycerol	10 μg/ml chymostatin
0.1 mM DTT	10 μg/ml leupeptin
1 mM Na_3VO_4	10 μg/ml E64
50 mM NaF	10 μg/ml PMSF

3）それを 600 x g、5 分間、4℃で低速遠心し、細胞質画分と核画分に分離した。

4）核画分に関しては2)、3）の操作を2回繰り返し、核画分に細胞質由来のタンパク質の持ち込みをできる限り除去した。

5）核画分を 0.2 ml の表4の高張緩衝液＊2 で懸濁し 30 分間氷上に置き、核からタンパク質を溶出した。

6）10 k x g、5 分間、4 ℃で核画分から不溶性画分を除去した。

7)細胞質画分と核画分由来のタンパク質を SDS-PAGE 次いで PVDF 膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体を用いた実施例1と同様にウエスタンブロッティング法を行った。核画分は細胞質に比べ5倍量の細胞由来のタンパク質を用いた。

その結果を第8図に示す。この結果、クラスリンは細胞質でのみ働くと思われていたが、クラスリン重鎖の一部分は核内にも存在することを確認した。

実施例2

この実施例では、試験例４の手順のうち２）のトランスフェクションするためのDNAを、試験例３で用意したpc-CHCを用いて、表５のように調製した以外は、試験例４と同様の試験を行った。

表５

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	30 ng
p53AIP1pro.reporter	100 ng
pcDNA3.1あるいはpc-CHC	400 ng
phRG-TK	10 ng
Total	540 ng
OPTI-MEM	25 μl

DNA溶液

OPTI-MEM	25 μl
Lipofectamine 2000	0.28 μl

Lipo溶液

その結果を第９図に示す。上記ＤＮＡ溶液において、pc-CHC(400ng)を用いたものを Clathrin +、pcDNA3.1(400ng)を用いたものを Clathrin －と表記する。

クラスリン重鎖のｃＤＮＡを発現ベクターに入れてｐ５３と共にトランスフェクトすると、ｐ５３Ａ１Ｐ１プロモーターからの転写能を高めたことが認められた。特に、Ｓ４６Ｆ置換体では強く高められた。

請 求 の 範 囲

１．　ｐ５３又はその１個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異ｐ５３、及びクラスリン重鎖から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子。

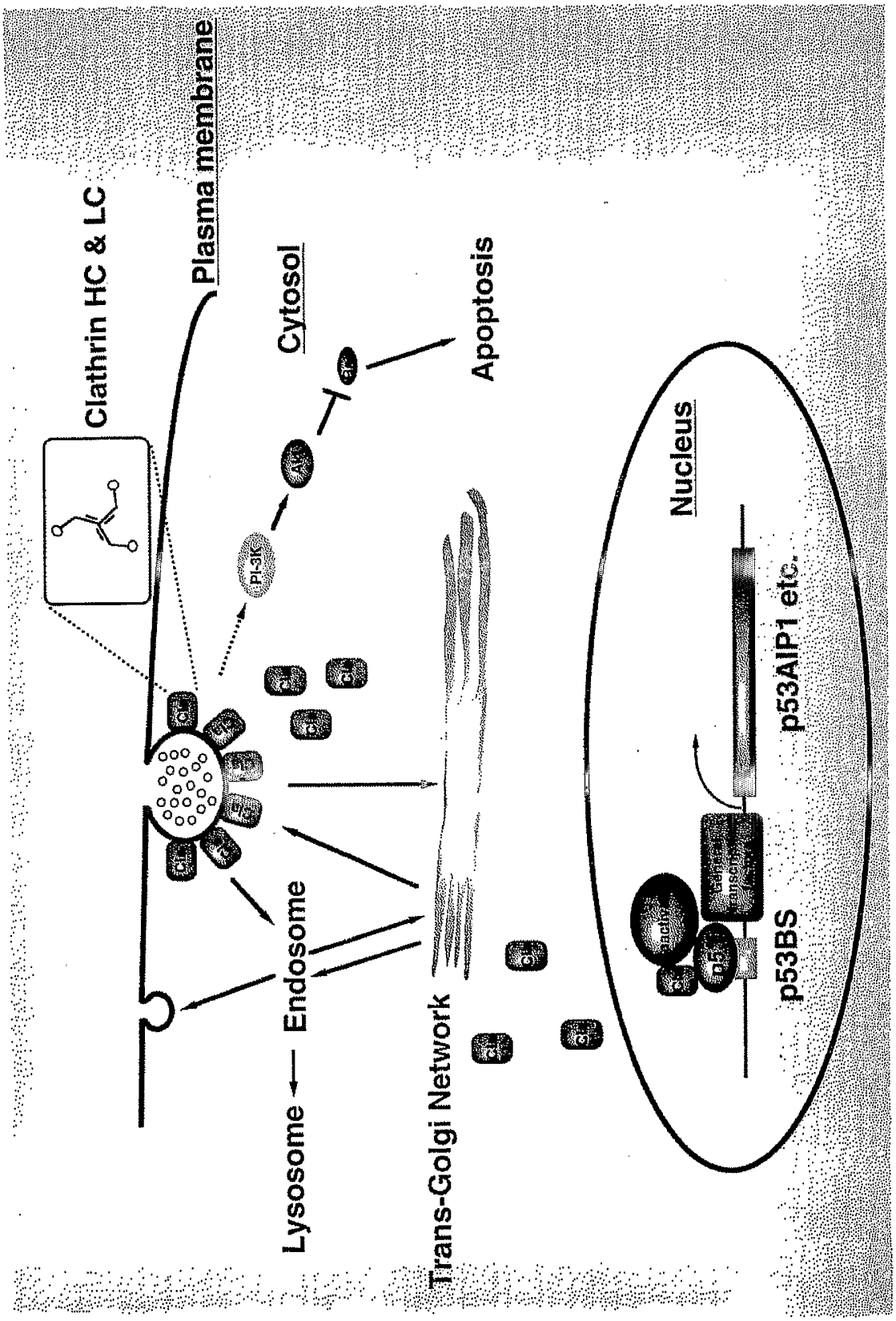
２．　前記変異ｐ５３が、少なくとも４６位のＳｅｒが置換されたｐ５３である請求項１又に記載の転写因子。

３．　前記変異ｐ５３が、その４６位のＳｅｒがＰｈｅに置換されている請求項２に記載の転写因子。

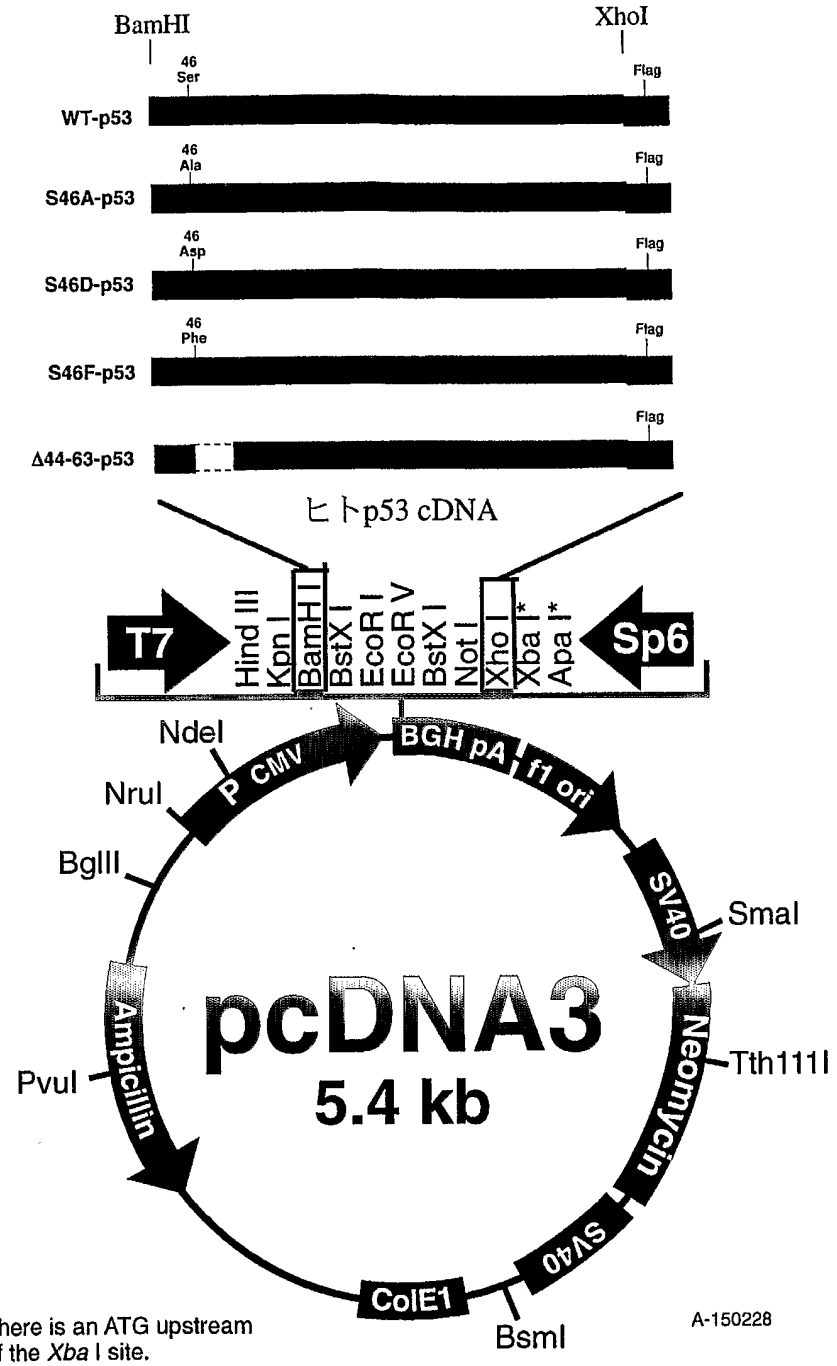
４．　請求項１～３のいずれか一項に記載の転写因子を有効成分とする癌の治療薬。

５．請求項１～３のいずれか一項に記載の転写因子又はクラスリン重鎖を癌細胞に注入することから成る癌治療法。

第 1 図


Plasma membrane
Clathrin HC & LC
Cytosol
PI-3K
Akt
Apoptosis
Nucleus
Endosome
Lysosome
Trans-Golgi Network
p53BS
p53AIP1 etc.

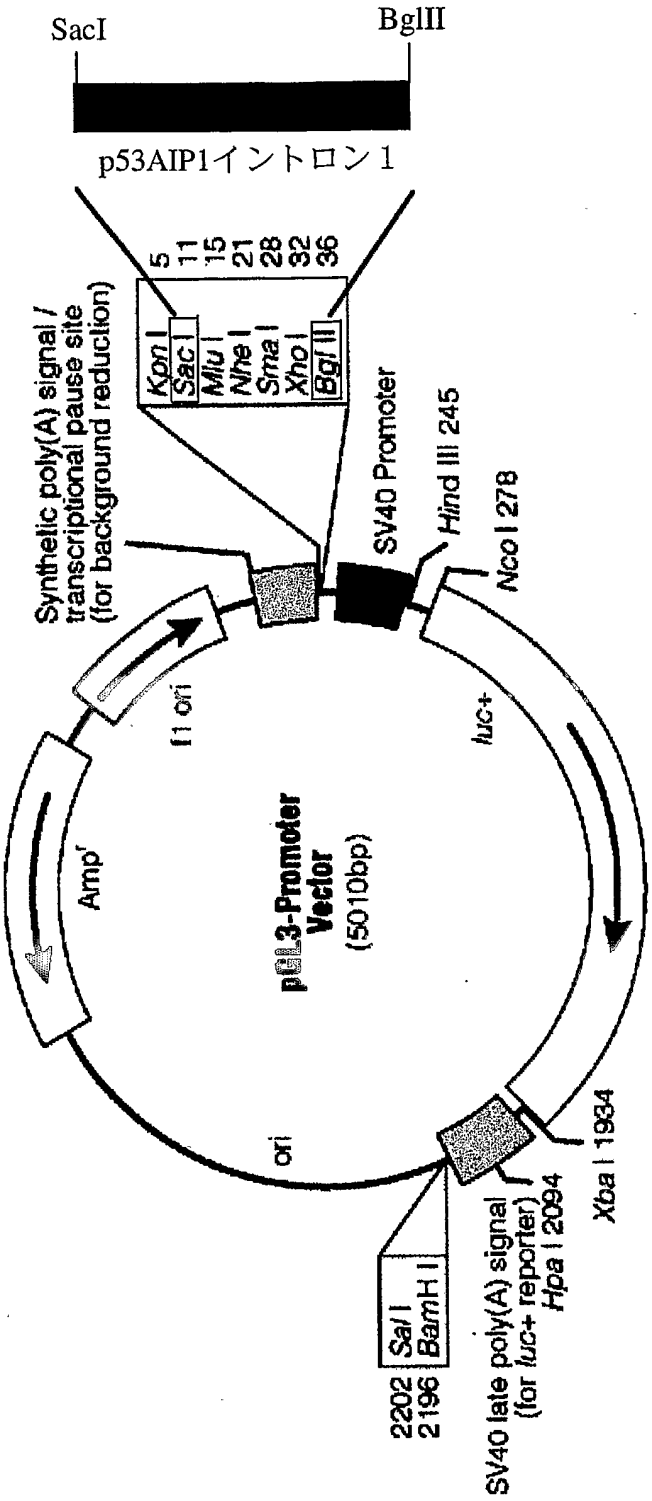
第２図



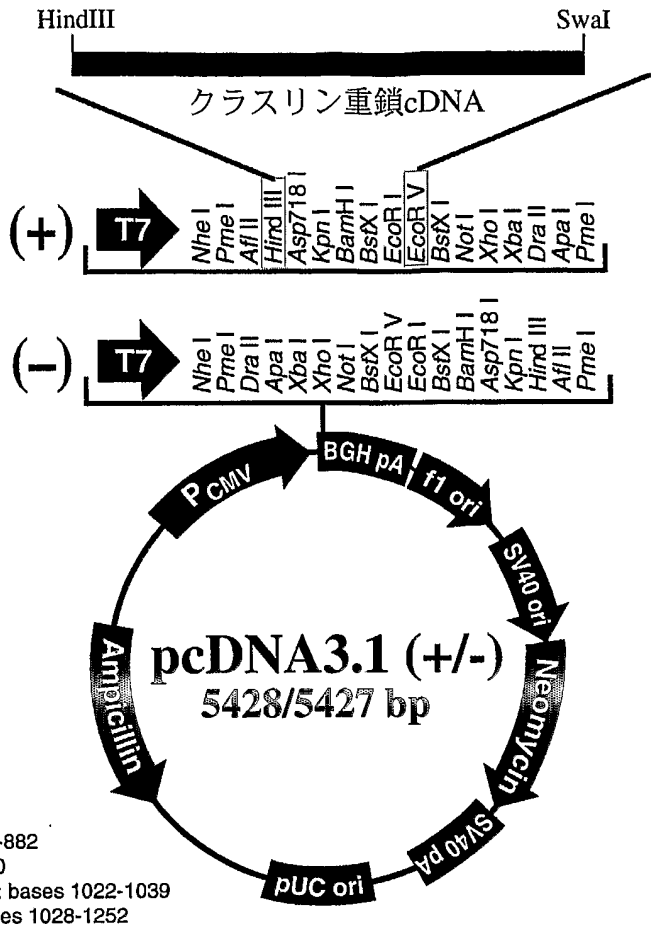
* There is an ATG upstream of the *Xba* I site.

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides
CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310

第３図


SacI
BglII
p53AIP1イントロン１
5
11
15
21
28
32
36
Kpn I
Sac I
Mlu I
Nhe I
Sma I
Xho I
Bgl II
Synthetic poly(A) signal / transcriptional pause site (for background reduction)
SV40 Promoter
Hind III 245
Nco I 278
f1 ori
luc+
Amp'
pGL3-Promoter Vector
(5010bp)
ori
Xba I 1934
SV40 late poly(A) signal (for luc+ reporter)
Hpa I 2094
Sal I
BamH I
2202
2196

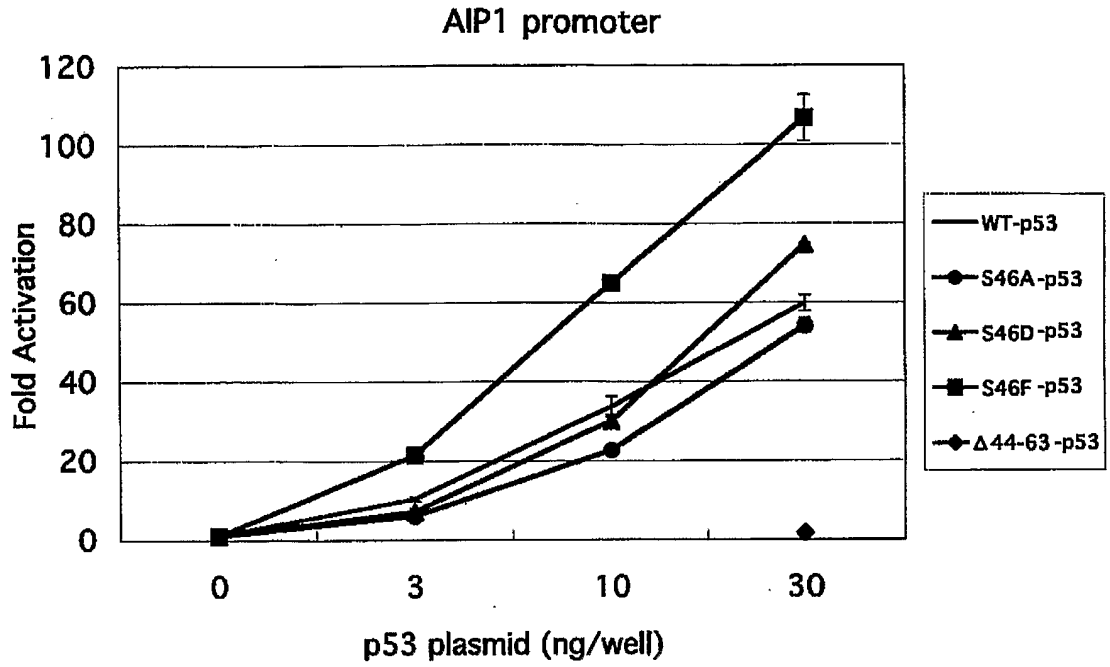
第４図



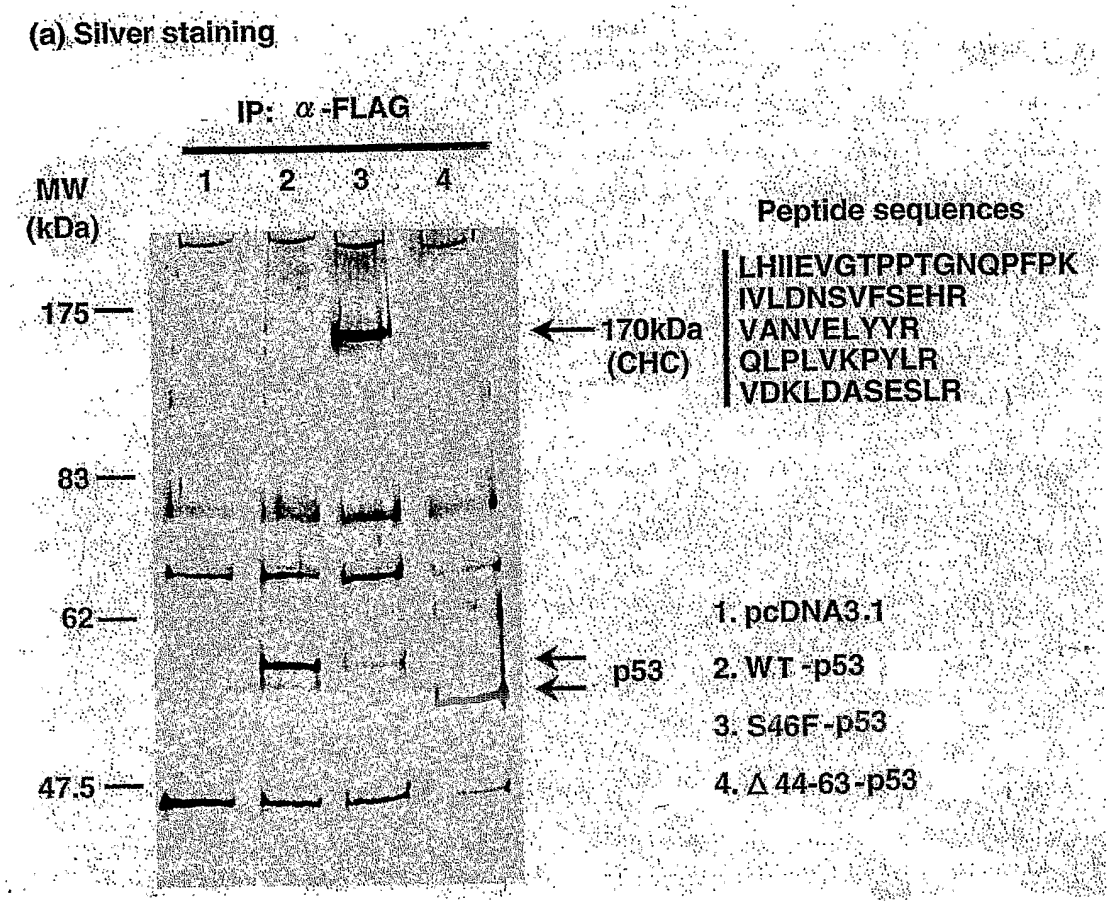
Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
T7 promoter/priming site: bases 863-882
Multiple cloning site: bases 895-1010
pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
f1 origin: bases 1298-1726
SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

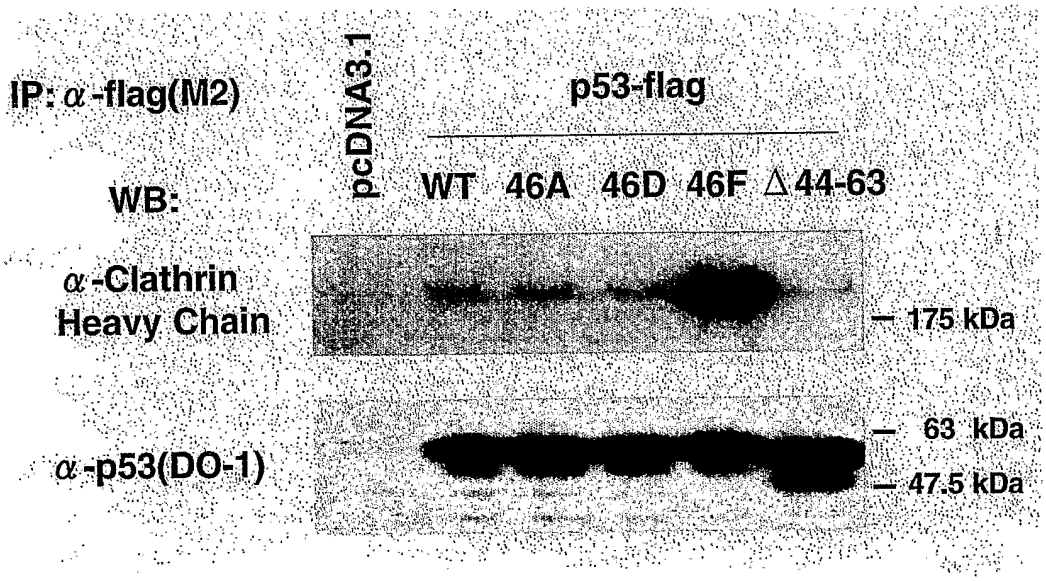
第５図


AIP1 promoter
120
100
80
60
40
20
0
Fold Activation
0
3
10
30
p53 plasmid (ng/well)
WT-p53
S46A-p53
S46D-p53
S46F -p53
Δ44-63 -p53

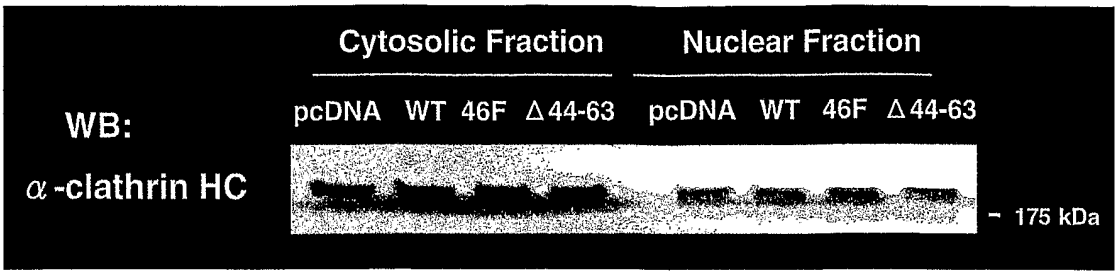
第 6 図


(a) Silver staining
IP: α-FLAG
1
2
3
4
MW
(kDa)
175
83
62
47.5
170kDa
(CHC)
p53
Peptide sequences
LHIIEVGTPPTGNQPFPK
IVLDNSVFSEHR
VANVELYYR
QLPLVKPYLR
VDKLDASESLR
1. pcDNA3.1
2. WT-p53
3. S46F-p53
4. Δ44-63-p53

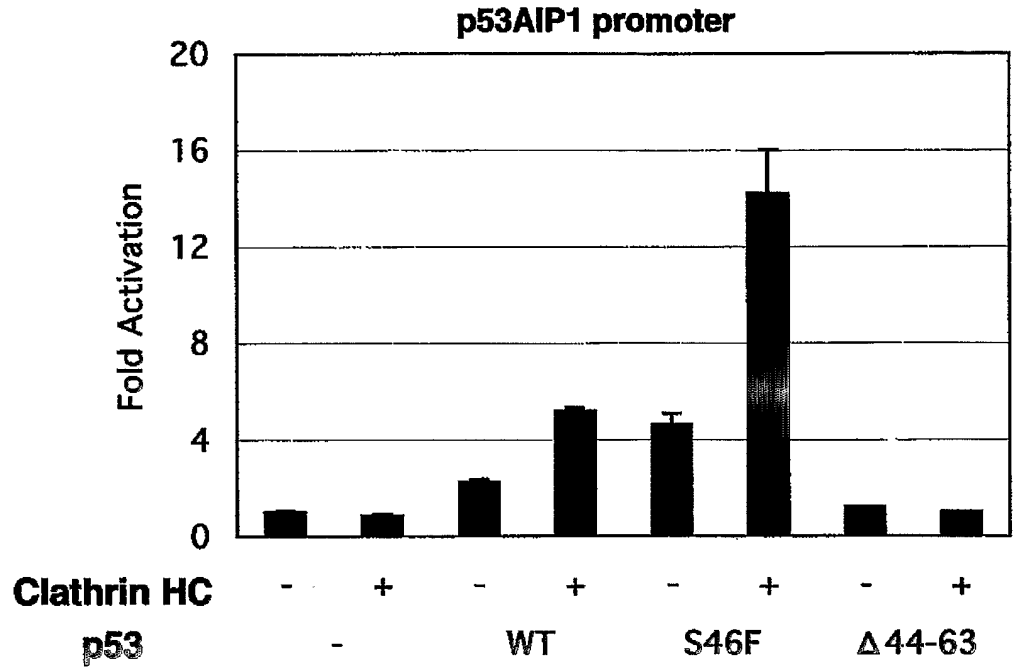
第 7 図


IP: α-flag(M2)
WB:
α-Clathrin
Heavy Chain
α-p53(DO-1)
pcDNA3.1
p53-flag
WT
46A
46D
46F
Δ44-63
175 kDa
63 kDa
47.5 kDa

第 8 図


Cytosolic Fraction
Nuclear Fraction
pcDNA WT 46F Δ44-63
pcDNA WT 46F Δ44-63
WB:
α-clathrin HC
175 kDa

第 9 図


p53AIP1 promoter
Fold Activation
20
16
12
8
4
0
Clathrin HC
- + - + - + - +
p53
-
WT
S46F
Δ44-63

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> 癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

<130> FS04-408PCT

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met

370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

385 390

<210> 2

<211> 1675

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gln Ile Leu Pro Ile Arg Phe Gln Glu His Leu Gln Leu Gln

1 5 10 15

Asn Leu Gly Ile Asn Pro Ala Asn Ile Gly Phe Ser Thr Leu Thr Met

20 25 30

Glu Ser Asp Lys Phe Ile Cys Ile Arg Glu Lys Val Gly Glu Gln Ala

35 40 45

Gln Val Val Ile Ile Asp Met Asn Asp Pro Ser Asn Pro Ile Arg Arg

50 55 60

Pro Ile Ser Ala Asp Ser Ala Ile Met Asn Pro Ala Ser Lys Val Ile

65 70 75 80

Ala Leu Lys Ala Gly Lys Thr Leu Gln Ile Phe Asn Ile Glu Met Lys

85 90 95

Ser Lys Met Lys Ala His Thr Met Thr Asp Asp Val Thr Phe Trp Lys

100 105 110

Trp Ile Ser Leu Asn Thr Val Ala Leu Val Thr Asp Asn Ala Val Tyr

115 120 125

His Trp Ser Met Glu Gly Glu Ser Gln Pro Val Lys Met Phe Asp Arg

130 135 140

His Ser Ser Leu Ala Gly Cys Gln Ile Ile Asn Tyr Arg Thr Asp Ala

145 150 155 160

Lys Gln Lys Trp Leu Leu Leu Thr Gly Ile Ser Ala Gln Gln Asn Arg

165 170 175

Val Val Gly Ala Met Gln Leu Tyr Ser Val Asp Arg Lys Val Ser Gln

180 185 190

Pro Ile Glu Gly His Ala Ala Ser Phe Ala Gln Phe Lys Met Glu Gly

195 200 205

Asn Ala Glu Glu Ser Thr Leu Phe Cys Phe Ala Val Arg Gly Gln Ala

210 215 220

Gly Gly Lys Leu His Ile Ile Glu Val Gly Thr Pro Pro Thr Gly Asn

225 230 235 240

Gln Pro Phe Pro Lys Lys Ala Val Asp Val Phe Phe Pro Pro Glu Ala

245 250 255

Gln Asn Asp Phe Pro Val Ala Met Gln Ile Ser Glu Lys His Asp Val

260 265 270

Val Phe Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Tyr Ile His Leu Tyr Asp Leu Glu

275 280 285

Thr Gly Thr Cys Ile Tyr Met Asn Arg Ile Ser Gly Glu Thr Ile Phe

290 295 300

Val Thr Ala Pro His Glu Ala Thr Ala Gly Ile Ile Gly Val Asn Arg

305 310 315 320

Lys Gly Gln Val Leu Ser Val Cys Val Glu Glu Glu Asn Ile Ile Pro

325 330 335

Tyr Ile Thr Asn Val Leu Gln Asn Pro Asp Leu Ala Leu Arg Met Ala

340 345 350

Val Arg Asn Asn Leu Ala Gly Ala Glu Glu Leu Phe Ala Arg Lys Phe

355 360 365

Asn Ala Leu Phe Ala Gln Gly Asn Tyr Ser Glu Ala Ala Lys Val Ala

370 375 380

Ala Asn Ala Pro Lys Gly Ile Leu Arg Thr Pro Asp Thr Ile Arg Arg

385 390 395 400

Phe Gln Ser Val Pro Ala Gln Pro Gly Gln Thr Ser Pro Leu Leu Gln
405 410 415
Tyr Phe Gly Ile Leu Leu Asp Gln Gly Gln Leu Asn Lys Tyr Glu Ser
420 425 430
Leu Glu Leu Cys Arg Pro Val Leu Gln Gln Gly Arg Lys Gln Leu Leu
435 440 445
Glu Lys Trp Leu Lys Glu Asp Lys Leu Glu Cys Ser Glu Glu Leu Gly
450 455 460
Asp Leu Val Lys Ser Val Asp Pro Thr Leu Ala Leu Ser Val Tyr Leu
465 470 475 480
Arg Ala Asn Val Pro Asn Lys Val Ile Gln Cys Phe Ala Glu Thr Gly
485 490 495
Gln Val Gln Lys Ile Val Leu Tyr Ala Lys Lys Val Gly Tyr Thr Pro
500 505 510
Asp Trp Ile Phe Leu Leu Arg Asn Val Met Arg Ile Ser Pro Asp Gln
515 520 525
Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Leu Val Gln Asp Glu Glu Pro Leu Ala
530 535 540
Asp Ile Thr Gln Ile Val Asp Val Phe Met Glu Tyr Asn Leu Ile Gln
545 550 555 560
Gln Cys Thr Ala Phe Leu Leu Asp Ala Leu Lys Asn Asn Arg Pro Ser
565 570 575
Glu Gly Pro Leu Gln Thr Arg Leu Leu Glu Met Asn Leu Met His Ala
580 585 590
Pro Gln Val Ala Asp Ala Ile Leu Gly Asn Gln Met Phe Thr His Tyr
595 600 605
Asp Arg Ala His Ile Ala Gln Leu Cys Glu Lys Ala Gly Leu Leu Gln
610 615 620
Arg Ala Leu Glu His Phe Thr Asp Leu Tyr Asp Ile Lys Arg Ala Val

625 630 635 640

Val His Thr His Leu Leu Asn Pro Glu Trp Leu Val Asn Tyr Phe Gly

645 650 655

Ser Leu Ser Val Glu Asp Ser Leu Glu Cys Leu Arg Ala Met Leu Ser

660 665 670

Ala Asn Ile Arg Gln Asn Leu Gln Ile Cys Val Gln Val Ala Ser Lys

675 680 685

Tyr His Glu Gln Leu Ser Thr Gln Ser Leu Ile Glu Leu Phe Glu Ser

690 695 700

Phe Lys Ser Phe Glu Gly Leu Phe Tyr Phe Leu Gly Ser Ile Val Asn

705 710 715 720

Phe Ser Gln Asp Pro Asp Val His Phe Lys Tyr Ile Gln Ala Ala Cys

725 730 735

Lys Thr Gly Gln Ile Lys Glu Val Glu Arg Ile Cys Arg Glu Ser Asn

740 745 750

Cys Tyr Asp Pro Glu Arg Val Lys Asn Phe Leu Lys Glu Ala Lys Leu

755 760 765

Thr Asp Gln Leu Pro Leu Ile Ile Val Cys Asp Arg Phe Asp Phe Val

770 775 780

His Asp Leu Val Leu Tyr Leu Tyr Arg Asn Asn Leu Gln Lys Tyr Ile

785 790 795 800

Glu Ile Tyr Val Gln Lys Val Asn Pro Ser Arg Leu Pro Val Val Ile

805 810 815

Gly Gly Leu Leu Asp Val Asp Cys Ser Glu Asp Val Ile Lys Asn Leu

820 825 830

Ile Leu Val Val Arg Gly Gln Phe Ser Thr Asp Glu Leu Val Ala Glu

835 840 845

Val Glu Lys Arg Asn Arg Leu Lys Leu Leu Leu Pro Trp Leu Glu Ala

850 855 860

Arg Ile His Glu Gly Cys Glu Glu Pro Ala Thr His Asn Ala Leu Ala
865 870 875 880

Lys Ile Tyr Ile Asp Ser Asn Asn Asn Pro Glu Arg Phe Leu Arg Glu
885 890 895

Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Arg Val Val Gly Lys Tyr Cys Glu Lys Arg
900 905 910

Asp Pro His Leu Ala Cys Val Ala Tyr Glu Arg Gly Gln Cys Asp Leu
915 920 925

Glu Leu Ile Asn Val Cys Asn Glu Asn Ser Leu Phe Lys Ser Leu Ser
930 935 940

Arg Tyr Leu Val Arg Arg Lys Asp Pro Glu Leu Trp Gly Ser Val Leu
945 950 955 960

Leu Glu Ser Asn Pro Tyr Arg Arg Pro Leu Ile Asp Gln Val Val Gln
965 970 975

Thr Ala Leu Ser Glu Thr Gln Asp Pro Glu Glu Val Ser Val Thr Val
980 985 990

Lys Ala Phe Met Thr Ala Asp Leu Pro Asn Glu Leu Ile Glu Leu Leu
995 1000 1005

Glu Lys Ile Val Leu Asp Asn Ser Val Phe Ser Glu His Arg Asn
1010 1015 1020

Leu Gln Asn Leu Leu Ile Leu Thr Ala Ile Lys Ala Asp Arg Thr
1025 1030 1035

Arg Val Met Glu Tyr Ile Asn Arg Leu Asp Asn Tyr Asp Ala Pro
1040 1045 1050

Asp Ile Ala Asn Ile Ala Ile Ser Asn Glu Leu Phe Glu Glu Ala
1055 1060 1065

Phe Ala Ile Phe Arg Lys Phe Asp Val Asn Thr Ser Ala Val Gln
1070 1075 1080

Val Leu Ile Glu His Ile Gly Asn Leu Asp Arg Ala Tyr Glu Phe

1085 1090 1095

Ala Glu Arg Cys Asn Glu Pro Ala Val Trp Ser Gln Leu Ala Lys

1100 1105 1110

Ala Gln Leu Gln Lys Gly Met Val Lys Glu Ala Ile Asp Ser Tyr

1115 1120 1125

Ile Lys Ala Asp Asp Pro Ser Ser Tyr Met Glu Val Val Gln Ala

1130 1135 1140

Ala Asn Thr Ser Gly Asn Trp Glu Glu Leu Val Lys Tyr Leu Gln

1145 1150 1155

Met Ala Arg Lys Lys Ala Arg Glu Ser Tyr Val Glu Thr Glu Leu

1160 1165 1170

Ile Phe Ala Leu Ala Lys Thr Asn Arg Leu Ala Glu Leu Glu Glu

1175 1180 1185

Phe Ile Asn Gly Pro Asn Asn Ala His Ile Gln Gln Val Gly Asp

1190 1195 1200

Arg Cys Tyr Asp Glu Lys Met Tyr Asp Ala Ala Lys Leu Leu Tyr

1205 1210 1215

Asn Asn Val Ser Asn Phe Gly Arg Leu Ala Ser Thr Leu Val His

1220 1225 1230

Leu Gly Glu Tyr Gln Ala Ala Val Asp Gly Ala Arg Lys Ala Asn

1235 1240 1245

Ser Thr Arg Thr Trp Lys Glu Val Cys Phe Ala Cys Val Asp Gly

1250 1255 1260

Lys Glu Phe Arg Leu Ala Gln Met Cys Gly Leu His Ile Val Val

1265 1270 1275

His Ala Asp Glu Leu Glu Glu Leu Ile Asn Tyr Tyr Gln Asp Arg

1280 1285 1290

Gly Tyr Phe Glu Glu Leu Ile Thr Met Leu Glu Ala Ala Leu Gly

1295 1300 1305

Leu Glu Arg Ala His Met Gly Met Phe Thr Glu Leu Ala Ile Leu
1310 1315 1320

Tyr Ser Lys Phe Lys Pro Gln Lys Met Arg Glu His Leu Glu Leu
1325 1330 1335

Phe Trp Ser Arg Val Asn Ile Pro Lys Val Leu Arg Ala Ala Glu
1340 1345 1350

Gln Ala His Leu Trp Ala Glu Leu Val Phe Leu Tyr Asp Lys Tyr
1355 1360 1365

Glu Glu Tyr Asp Asn Ala Ile Ile Thr Met Met Asn His Pro Thr
1370 1375 1380

Asp Ala Trp Lys Glu Gly Gln Phe Lys Asp Ile Ile Thr Lys Val
1385 1390 1395

Ala Asn Val Glu Leu Tyr Tyr Arg Ala Ile Gln Phe Tyr Leu Glu
1400 1405 1410

Phe Lys Pro Leu Leu Leu Asn Asp Leu Leu Met Val Leu Ser Pro
1415 1420 1425

Arg Leu Asp His Thr Arg Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Val Lys
1430 1435 1440

Gln Leu Pro Leu Val Lys Pro Tyr Leu Arg Ser Val Gln Asn His
1445 1450 1455

Asn Asn Lys Ser Val Asn Glu Ser Leu Asn Asn Leu Phe Ile Thr
1460 1465 1470

Glu Glu Asp Tyr Gln Ala Leu Arg Thr Ser Ile Asp Ala Tyr Asp
1475 1480 1485

Asn Phe Asp Asn Ile Ser Leu Ala Gln Arg Leu Glu Lys His Glu
1490 1495 1500

Leu Ile Glu Phe Arg Arg Ile Ala Ala Tyr Leu Phe Lys Gly Asn
1505 1510 1515

Asn Arg Trp Lys Gln Ser Val Glu Leu Cys Lys Lys Asp Ser Leu

1520 1525 1530

Tyr Lys Asp Ala Met Gln Tyr Ala Ser Glu Ser Lys Asp Thr Glu

1535 1540 1545

Leu Ala Glu Glu Leu Leu Gln Trp Phe Leu Gln Glu Glu Lys Arg

1550 1555 1560

Glu Cys Phe Gly Ala Cys Leu Phe Thr Cys Tyr Asp Leu Leu Arg

1565 1570 1575

Pro Asp Val Val Leu Glu Thr Ala Trp Arg His Asn Ile Met Asp

1580 1585 1590

Phe Ala Met Pro Tyr Phe Ile Gln Val Met Lys Glu Tyr Leu Thr

1595 1600 1605

Lys Val Asp Lys Leu Asp Ala Ser Glu Ser Leu Arg Lys Glu Glu

1610 1615 1620

Glu Gln Ala Thr Glu Thr Gln Pro Ile Val Tyr Gly Gln Pro Gln

1625 1630 1635

Leu Met Leu Thr Ala Gly Pro Ser Val Ala Val Pro Pro Gln Ala

1640 1645 1650

Pro Phe Gly Tyr Gly Tyr Thr Ala Pro Pro Tyr Gly Gln Pro Gln

1655 1660 1665

Pro Gly Phe Gly Tyr Ser Met

1670 1675

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu His Ile Ile Glu Val Gly Thr Pro Pro Thr Gly Asn Gln Pro Phe

1 5 10 15

Pro Lys

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Val Leu Asp Asn Ser Val Phe Ser Glu His Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Ala Asn Val Glu Leu Tyr Tyr Arg

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Leu Pro Leu Val Lys Pro Tyr Leu Arg

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Asp Lys Leu Asp Ala Ser Glu Ser Leu Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> flag

<400> 8

Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 9

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60

gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 120

gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcactgaaga cccaggtcca 180

gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgcgtgg cccctgcacc agcagctcct 240

acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt cccttcccag 300

aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360

tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc 420

tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgcccg gcacccgcgt ccgcgccatg 480

gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccaccatgag 540

cgctgctcag atagcgatgg tctggccect cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600

ttgcgtgtgg agtatttgga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat 660

gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720

tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc 780

agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcatg tttgtgcctg tcctgggaga 840

gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900

ccagggagca ctaagcgagc actgcccaac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 960

aaaccactgg atggagaata tttcaccctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1020

ttccgagagc tgaatgaggc cttggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg 1080

gggagcaggg ctcactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat 1140

aaaaaactca tgttcaagac agaagggcct gactcagact ga 1182

<210> 10

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccatttcctc agagaacacg gccccccttgg gccaaaagga catgaagaag ctcttgctaa 60

tgccagcctg gctctcctca tcccgccccc tgcacccctg cccttctggc tgccctccct 120

tctcctagct ctgtcccctc tcacttcagg agtctcaagt ccttcagact actccaaagt 180

cgggggatct ctggatgggt aggaggtgat ctcaccgcct cctctcttgc ccgggcttgt 240

cgagatgaac ttcctgatgc tggcggcgct gaagctgaca ctagcggggg cacctccctg 300

acatgaacgc ccctcgagac tgggccagtg ctcctgatgc ctgggcacct gcggaaaggc 360

acccagcgtg gccgccgtgg catgccttga gtgtgtgggt ggggactgtt gcaaactgac 420

attccagctg tcccagtcca ttttgtgctg ctctcacaca acccc 465

<210> 11

<211> 5028

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggcccaga ttctgccaat tcgttttcag gagcatctcc agctccagaa cctgggtatc 60

aacccagcaa acattggctt cagtaccctg actatggagt ctgacaaatt catctgcatt 120

agagaaaaag taggagagca ggcccaggtg gtaatcattg atatgaatga cccaagtaat 180

ccaattcgaa gaccaatttc agcagacagc gccatcatga atccagctag caaagtaatt 240

gcactgaaag ctgggaaaac tcttcagatt tttaacattg aaatgaaaag taaaatgaag 300

gctcatacca tgactgatga tgtcaccttt tggaaatgga tctctttgaa tacggttgct 360

cttgttacgg ataatgcagt ttatcactgg agtatggaag gagagtctca gccagtgaaa 420

atgtttgatc gccattctag ccttgcaggg tgccagatta tcaattaccg tacagatgca 480

aaacaaaagt ggttacttct gactggtata tctgcacagc aaaatcgtgt ggtgggagct 540

atgcagctat attctgtaga taggaaagtg tctcagccca ttgaaggaca tgcagctagc 600

tttgcacagt ttaagatgga aggaaatgca gaagaatcaa cgttattttg ttttgcagtt 660

cggggccaag ctggagggaa gttacatatt attgaagttg gcacaccacc tacagggaac 720

cagccctttc caaagaaggc agtggatgtc ttctttcctc cagaagcaca aaatgatttt 780

cctgttgcaa tgcagatcag tgaaaagcat gatgtggtgt tcttgataac caagtatggt 840

tatatccacc tctatgatct tgagactggt acctgcatct acatgaatag aatcagtgga 900

gaaacaattt ttgttactgc acctcatgaa gccacagctg gaataattgg agtaaacaga 960

aagggacaag ttctgtcagt gtgtgtggaa gaagaaaaca taattcctta catcaccaat 1020

gttctacaaa atcctgattt ggctctgaga atggctgtac gtaataactt agccggtgct 1080

gaagaactct ttgcccggaa atttaatgct ctttttgccc agggaaatta ctcggaggca 1140

gcaaaggtgg ctgctaatgc accaaaggga attcttcgta ctccagacac tatccgtcgg 1200

ttccagagtg tcccagccca gccaggtcaa acttctcctc tacttcagta ctttggtatc 1260

cttttggacc agggacagct caacaaatac gaatccttag agctttgtag gcctgtactt 1320

cagcaagggc gaaaacagct tttggagaaa tggttaaaag aagataagct ggaatgttct 1380

gaagaactgg gtgatcttgt gaaatctgtg gaccctacat tggcacttag tgtgtaccta 1440

agggctaacg tcccaaataa agtcattcag tgctttgcag aaacaggtca agtccaaaag 1500

attgttttat atgctaaaaa agttggatac actccagatt ggatatttct gctgagaaat 1560

gtaatgcgaa tcagtccaga tcagggacag cagtttgccc aaatgttagt tcaagatgaa 1620

gagcctcttg ctgacatcac acagattgta gatgtcttta tggaatacaa tctaattcag 1680

cagtgtactg cattcttgct tgatgctctg aagaataatc gcccatctga aggtccttta 1740

cagacgcggt tacttgagat gaaccttatg catgcgcctc aagttgcaga tgctattcta 1800

ggcaatcaga tgttcacaca ttatgaccgg gctcatattg ctcaactgtg tgaaaaggct 1860

ggcctactgc agcgtgcatt agaacatttc actgatttat atgatataaa acgtgcagtg 1920

gttcacaccc atcttcttaa ccctgagtgg ttagtcaact actttggttc cttatcagta 1980

gaagactccc tagaatgtct cagagccatg ctgtctgcca acatccgtca gaatctgcag 2040

atttgtgttc aggtggcttc taaatatcat gaacaactgt caactcagtc tctgattgaa 2100

cttttttgaat ctttcaagag ttttgaaggt ctcttttatt ttctgggatc cattgttaac 2160

tttagccagg acccagatgt gcactttaaa tatattcagg cagcttgcaa gactgggcaa 2220

atcaaagaag tagaaagaat ctgtagagaa agcaactgct acgatcctga gcgagtcaag 2280

aattttctta aggaagcaaa actaacagat cagctaccac ttatcattgt gtgtgatcga 2340

tttgactttg tccatgattt ggtgctctat ttatatagaa ataatcttca aaagtatata 2400

gagatatatg tacagaaggt gaatccaagt cgacttcctg tagttattgg aggattactt 2460

gatgttgact gttctgaaga tgtcataaaa aacttgattc ttgttgtaag aggtcaattc 2520

tctactgatg agcttgttgc tgaggttgaa aaaagaaaca gattgaaact gcttctgcct 2580

tggctagagg ccagaattca tgagggctgt gaggagcctg ctactcacaa tgccttagcc 2640

aaaatctaca tagacagtaa taacaacccg gagagatttc ttcgtgaaaa tccctactat 2700

gacagtcgcg ttgttggaaa gtattgtgag aagagagatc cacatctggc ctgtgttgct 2760

tatgaacgtg gccaatgtga tctggaactt attaatgttt gcaatgagaa ttccctcttc 2820

aaaagtcttt ctcgctacct ggtacgtcga aaggatccag aattgtgggg cagcgtgctg 2880

ctggaaagca atccttacag gagaccccta attgaccagg ttgtacaaac agctttgtct 2940

gagactcagg accctgaaga agtgtcagta actgtaaagg ctttcatgac tgcagacctt 3000

cctaatgaac tcattgaact gctggagaaa attgtccttg ataactctgt attcagtgaa 3060

cacaggaatc tgcaaaacct ccttatcctc actgcaatta aggctgaccg tacacgtgtt 3120

atggagtata ttaaccgcct ggataattat gatgccccag atattgccaa tatcgccatc 3180

agcaatgagc tgtttgaaga agcatttgcc attttccgga aatttgatgt caatacttca 3240

gcagttcagg tcttaattga gcatattgga aacttggatc gggcatatga gtttgctgaa 3300

cgttgcaatg aacctgcggt ctggagtcaa cttgcaaaag cccagttgca gaaaggaatg 3360

gtgaaagaag ccattgattc ttatatcaaa gcagatgatc cttcctccta catggaagtt 3420

gttcaggctg ccaatactag tggaaactgg gaagaactgg tgaagtactt gcagatggcc 3480

cgtaagaagg ctcgagagtc ctatgtggag acagaactga tattcgcact ggctaaaaca 3540

aaccgccttg cagagttaga agaatttatc aatggaccaa ataatgctca tatccaacaa 3600

gttggtgacc gttgttatga tgaaaaaatg tatgatgctg ctaagttgtt gtacaataat 3660

gtttccaatt ttggacgttt ggcatctacc ctggttcacc tgggtgaata tcaggcagct 3720

gttgatgggg ctaggaaagc taacagtact cgaacatgga aagaggtctg cttcgcctgt 3780

gtagatggga aagaattccg tcttgctcag atgtgtggac ttcatattgt tgtacatgca 3840

gatgaattag aagaacttat caactactat caggatcgtg gctattttga agagctgatc 3900

accatgttgg aagcagcact gggacttgag cgagctcaca tgggaatgtt tactgaatta 3960

gctattctat actctaaatt taagcctcag aaaatgaggg agcacctgga gctgttctgg 4020

tctagagtga atattcccaa ggtgctaaga gctgcagaac aagctcatct ttgggcagaa 4080

ctggtgtttt tgtatgacaa gtatgaagaa tatgataatg ccataattac catgatgaat 4140

catccaactg atgcctggaa agaagggcaa ttcaaagata tcattaccaa ggttgccaat 4200

gtggaactat actacagagc aatacagttc tacttagaat tcaagcctct gttgttaaat 4260

gatttgctga tggtgctgtc tccacggttg gatcacactc gtgcagtcaa ttatttcagc 4320

aaggttaaac agctaccact ggtgaaaccg tatttgcgtt cagttcagaa ccataacaac 4380

aaatctgtga atgaatcatt gaacaatctt tttattacag aagaagatta tcaggctctg 4440

cgaacatcaa tagatgctta tgacaacttt gacaatatct cgcttgctca gcgtttggaa 4500

aaacatgaac tcattgagtt caggagaatt gctgcttatc tcttcaaagg caacaatcgc 4560

tggaaacaga gtgtagagct gtgcaagaaa gacagccttt acaaggatgc aatgcagtat 4620

gcttctgaat ctaaagatac tgaattggct gaagaactcc tgcagtggtt tttgcaggaa 4680

gaaaaaagag agtgctttgg agcttgtctg tttacctgtt acgatctttt aaggccagat 4740

gtcgtcctag aaactgcatg gaggcacaat atcatggatt ttgccatgcc ctatttcatc 4800

caggtcatga aggagtactt gacaaaggtg gataaattag atgcttcaga atcactgaga 4860

aaagaagaag aacaagctac agagacacaa cccattgttt atggtcagcc ccagttgatg 4920

ctgacagcag gacccagtgt tgccgtccct ccccaggcac cttttggtta tggttatacc 4980

gcaccaccgt atggacagcc acagcctggc tttgggtaca gcatgtga 5028

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/002238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

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 practicable, search terms used)
MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), WPIDS(STN), JICST FILE(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hirofumi ARAKAWA et al., "Tensha Inshi p53 ni yotte Seigyo sareru Idenshigun", Cell Technology, 22 December, 2002 (22.12.02), Vol.22, No.1, 2003, pages 23 to 28	1-4
X A	Yoichi TAYA, "p53 no Rinsanka to Acetyl-ka ni yoru Saibo Kino no Seigyo", Cell Technology, 22 December, 2002 (22.12.02), Vol.22, No.1, 2003, pages 29 to 33	1,4 2,3
A	WO 00/31238 A2 (GENETICA, INC.), 02 June, 2000 (02.06.00), & JP 2002-530436 A & EP 1133552 A	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 March, 2004 (16.03.04)	30 March, 2004 (30.03.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/002238

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

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

1. [X] Claims Nos.: 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 5 relates to a method of treating cancer which pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy. Thus it relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) (continued to extra sheet)

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００４／００２２３８

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE(STN)　BIOSIS(STN)　WPIDS(STN)　JICSTファイル(JOIS)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	荒川博文　他，転写因子ｐ５３によって制御される遺伝子群，細胞工学，　2002.12.22，Vol.22,No.1,2003，p.23-28	１－４
X A	田矢洋一，ｐ５３のリン酸化とアセチル化による細胞機能の制御，細胞工学，　2002.12.22，Vol.22,No.1,2003，p.29-33	１，４ ２，３
A	WO 00/31238 A2 (GENETICA, INC.)2000.06.02 & JP 2002-530436 A & EP 1133552 A	１－４

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１６．０３．２００４	30.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	田中晴絵	４Ｎ　９７３９
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８	

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００４年１月）

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００４／００２２３８

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．[X] 請求の範囲 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲５は、癌治療法に関するものであって、人の身体の手術または治療による処置及び診断方法に該当し、ＰＣＴ１７条(2)(a)(i)及びＰＣＴ規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2．[ ] 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．[ ] 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．[ ] 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．[ ] 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．[ ] 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．[ ] 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
[ ] 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
[ ] 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。