

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5961380号
(P5961380)

(45) 発行日 平成28年8月2日 (2016.8.2)

(24) 登録日 平成28年7月1日 (2016.7.1)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)
 A 6 1 K 47/42 (2006.01)
 A 6 1 K 47/48 (2006.01)
 C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 K 47/42
 A 6 1 K 47/48
 C 0 7 K 7/06

請求項の数 10 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-514288 (P2011-514288)
 (86) (22) 出願日 平成21年11月20日 (2009.11.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/070081
 (87) 国際公開番号 W02010/134226
 (87) 国際公開日 平成22年11月25日 (2010.11.25)
 審査請求日 平成24年11月15日 (2012.11.15)
 審判番号 不服2015-6468 (P2015-6468/J1)
 審判請求日 平成27年4月6日 (2015.4.6)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-122552 (P2009-122552)
 (32) 優先日 平成21年5月20日 (2009.5.20)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 899000057
 学校法人日本大学
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 (74) 代理人 100093861
 弁理士 大賀 真司
 (74) 代理人 100129218
 弁理士 百本 宏之
 (72) 発明者 花澤 重正
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 学校法人日本大学内
 (72) 発明者 舩廣 善和
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 学校法人日本大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド、融合タンパク質、核酸、発現ベクター、形質転換体、医薬組成物、抗体タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D P - 1 タンパク質の C 末端側の酸性アミノ酸領域の一部のアミノ酸配列

E D D E E

E : グルタミン酸

D : アスパラギン酸

からなるペプチドモチーフであって、

任意のタンパク質に融合し、任意のタンパク質の分解を阻害するためのペプチドモチーフ。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のペプチドモチーフを、任意のタンパク質の N 末端と、C 末端と、N 末端と C 末端との途中との少なくともいずれかに融合させ、タンパク質分解耐性を得た融合タンパク質。

【請求項 3】

前記タンパク質が、体細胞を誘導多能性幹細胞 (i P S 細胞) に誘導するための誘導因子である、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

S o x 2 の C 末端に請求項 1 に記載のペプチドモチーフが融合されたアミノ酸配列、O c t 4 の N 末端に請求項 1 に記載のペプチドモチーフが融合されたアミノ酸配列、及び、K l f 4 の N 末端に請求項 1 に記載のペプチドモチーフが融合されたアミノ酸配列の少な

10

20

くとも何れかからなる請求項 2 または請求項 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

細胞膜透過性タグがさらに融合された請求項 2 ないし請求項 4 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

請求項 2 に記載のペプチドモチーフのアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸を有する発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

10

【請求項 9】

請求項 2 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 2 又は請求項 5 に記載の融合タンパク質を含む抗体タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質療法や抗体療法に用いるタンパク質や抗体に融合することで、投与タンパク質を分解から防ぐことができる酸性アミノ酸からなるモチーフ等に関する。

【背景技術】

20

【0002】

近年、細胞膜透過性タンパク質を応用したタンパク質療法の開発が顕著である。タンパク質療法には、特定の遺伝子変異や組換えによるフレームシフト等により、アミノ酸配列に置換や変異等の異常を来し発病する疾病に対し、正常型のタンパク質を発現系により作製し投与する方法がある。また、極最近報告された *piPS* (*protein-induced pluripotent stem cell*) 細胞作製のように、既に分化した細胞から未分化細胞を誘導するのに、細胞膜透過性の機能性タンパク質 (4 種の転写因子 *Oct 4*, *Klf 4*, *Sox 2*, *cMy c*) を投与し、未分化を誘導する方法がある (例えば、非特許文献 1 を参照)。

また、再生医療では未分化細胞から特定の細胞を分化させる方法の確立が必要であるが、これにも細胞膜透過性タンパク質が応用される可能性が高い。また、特定タンパク質の機能を、抗体を用いて抑制する抗体療法の開発も急速に進んでいる。

30

従来、*iPS* 細胞は、体細胞に 4 因子 (*Oct 3/4*, *Sox 2*, *Klf 4*, *c-Myc*) の遺伝子を、それぞれレトロウイルスやレンチウイルスなどのウイルスベクターで体細胞に導入することによって確立されてきたが、ゲノムへのウイルスベクター挿入に起因する腫瘍形成が危惧されていた。また、ウイルスベクターは厳密に管理された環境で作成する必要があり、*iPS* 細胞技術の普及の障害となっていた。

そこで、4 因子に塩基性アミノ酸であるアルギニン 11 個を繋いで、これを、細胞膜を透過し易い性質を持つように改造し、ウイルスを使わずにマウスの胎児の細胞に入れることによって *piPS* 細胞を生成できることが発表された。

40

しかし、これらのタンパク質を用いた療法では、細胞や個体に投与後、タンパク質がプロテアソームやファゴソーム、オートファジーやタンパク質分解酵素等によって分解され、その結果、投与タンパク質があまり効力を発揮しなかったり、極めて頻繁に投与する必要を生じる場合が多い (例えば、非特許文献 1 を参照)。

これまでに、このような細胞膜透過性タンパク質の細胞内でのタンパク質分解からの抑制を行なえるモチーフとしては、ポリアルギニンタグ (*poly-arginine*) が知られている。これは 8 個のアルギニンから成る 8 R や主にアルギニンからなるモチーフがプロテアソーム等によるタンパク質分解を防ぐというものである (例えば、非特許文献 2、3 を参照)。

また、酸性アミノ酸から成るモチーフがタンパク質の安定性に重要である報告はあるも

50

のの（例えば、非特許文献4、5を参照）、酸性アミノ酸から成るモチーフがタンパク質分解からの抑制を行っているという報告はない。

p i P Sにアルギニンが繋がれた誘導因子を供給しても、誘導因子はタンパク質分解に晒さらされるために、誘導因子を長期間大量に細胞に供給しなければならずp i P Sの作成には数か月の期間を要するという課題がある。

【非特許文献1】Zhou H. et. al., Cell Stem Cell. 2009; 4 (5): 381-384

【非特許文献2】Kloss A. et al., Eur J Pharm Biopharm. 2009; 72 (1): 219-225.

【非特許文献3】Anbanandam A. et. al., J Mol Biol. 2008; 384 (1): 219-227. 10

【非特許文献4】Yi P. et. al., Mol Cell. 2008; 29 (4): 465-476.

【非特許文献5】Yen HC. et. al., Science. 2008; 322 (5903): 918-923.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

そこで、本発明は、細胞や個体に投与されたタンパク質がプロテアソームやオートファジー、その他タンパク質分解酵素などによって分解されることを防ぐモチーフを検索し、タンパク質分解に耐性を有するタンパク質設計・産生法を提供することを目的とする。 20

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは上記課題を解決するために研究を重ねた結果、細胞周期調節性の転写因子DP-1のC末端側酸性領域がDP-1の細胞内でのタンパク質分解に抵抗性を有し、そして、他分子のタンパク質分解をも強力に防ぐモチーフであることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、酸性アミノ酸から主としてなる配列を有するタンパク質分解阻害モチーフであり、好ましくは、DP-1タンパク質のC末端側の酸性アミノ酸領域の全部又は一部のアミノ酸配列からなるか、又はこれを含む、タンパク質分解阻害モチーフである。 30

本発明に係る分解阻害モチーフの形態は、前記DP-1タンパク質のC末端側395～410のアミノ酸領域から成る分解阻害モチーフであり、また、下記アミノ酸配列からなるタンパク質分解阻害モチーフである。

(1) EDDEEDDDFNENDEDD

(2) EDDEE

E: グルタミン酸

D: アスパラギン酸

N: アスパラギン

F: フェニルアラニン

さらに、本発明の他の形態は、前記酸性アミノ酸がグルタミン酸またはアスパラギン酸から主として成るタンパク質分解阻害モチーフである。 40

また、本発明は、既述のモチーフが任意のタンパク質のN末端に、C末端に、その途中に、の少なくともいずれかに融合され、タンパク質分解耐性を得た融合タンパク質である

このタンパク質としては、体細胞を誘導多能性幹細胞(iPS細胞)に誘導するための誘導因子がある。詳しくは、Sox2のC末端に前記モチーフが融合されたアミノ酸配列、Oct4のN末端に前記モチーフが融合されたアミノ酸配列、及び、Klf4のN末端に前記モチーフが融合されたアミノ酸配列である。

さらに本発明は前記モチーフのアミノ酸配列をコードする核酸であり、その核酸を有する発現ベクターであり、そして、この発現ベクターを含む形質転換体である。

さらにまた、本発明は、前記融合タンパク質を含む医薬組成物であり、そして、細胞膜 50

透過性タグがさらに融合された前記細胞膜透過性タンパク質であり、またさらに、前記融合タンパク質、又は、細胞膜透過性タンパク質を含む抗体タンパク質である。

【発明の効果】

【0005】

既述の酸性アミノ酸から成るモチーフは、融合したタンパク質をタンパク質分解から防ぐ。従って、タンパク質療法や抗体療法に用いられる細胞膜透過性タンパク質や抗体に、前記モチーフを融合することで、タンパク質分解耐性のタンパク質を提供することが可能となることから、これらの療法に顕著な効率化（投与回数の減少、効果の増大）をもたらすなどの有用が発揮される。

また、本発明に係る、酸性アミノ酸から成るモチーフは融合したタンパク質をタンパク質分解から防ぐことから、発現プラスミド等にこれをコードするオリゴヌクレオチドを導入し、目的タンパク質との融合タンパク質発現系を作製すれば、これまでタンパク質分解が激しく機能解析が不可能であったタンパク質も、分解耐性を獲得し機能解析が可能となり、分子生物学のツールとしても極めて有効である。

【図面の簡単な説明】

【0006】

図1は、本発明のきっかけとなったDP-1のC末端側がタンパク質分解を防ぐ機能を持つことを示した図である。

図2は、DP-1のC末端側396～410アミノ酸領域がDP-1のタンパク質分解を防ぐ領域であることを示した図である。

図3は、DP-1のC末端側396～410アミノ酸領域はDP-1（・）のタンパク質分解促進を防ぐことを示した図である。

図4は、DP-1の128～192アミノ酸領域にDP-1の分解促進領域が存在することを示した図である。

図5は、DP-1のC末端側396～410アミノ酸領域は他分子（GAL4DBD；GAL4 DNA結合領域）においてもタンパク質分解を防ぐことが可能であることを示した図である。

図6は、StabilonをiPS細胞誘導因子に導入した実施形態の結果を説明する第1の図である。

図7は、StabilonをiPS細胞誘導因子に導入した実施形態の結果を説明する第2の図である。

図8は、Stabilonの配列の変化がタンパク質分解阻害性に与える影響を説明する図である。

【発明を実施するための形態】

【0007】

DP-1タンパク質は、410アミノ酸から構成され、その配列は、次のとおりである。下線部が、タンパク質分解阻害モチーフを構成する、DP-1タンパク質のC末端側の酸性アミノ酸領域である。

makdagliea ngelkvfidq nlspgkgvvs lvavhpstvn plgkqlpkpt fgqsnvniaq qvvigtpqrp
aasntlvvgs phtpsthf as qnqpsdsspw sagkrnrkge kngkglrhfs mkvcekvrk gttsynevad
elvaefsaad nhilpnesay dqknirrrvy dalnvlmamn iiskekkeik wiglptnsaq ecqnleverq
rrlerikqkq sqlqelilqq iafknlvqrn rhaeqqasrp pppnsvihlp fiiivntskkt vidcsisndk

feylfnfdnt feihddievl krmgmacgle sgscsaedlk marslvpkal epyvtemaag tvggvfitta
gstsngrfs asdltngadg mlatssngsq ysgsrvetpv syvgeddeed ddfnendedd

10

20

30

40

50

上記の配列は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) アメリカ合衆国国立生物工学情報センターに登録されている (NM_007111)。

本発明に係る酸性アミノ酸から主として成るモチーフは、主にグルタミン酸 (Glu; E)、およびアスパラギン酸 (Asp; D) から成るモチーフであり、その構成比や長さは特に規定されず、全体として他のアミノ酸を含む場合もある。また、若干酸性であるグルタミン (Q; Gln)、アスパラギン (Asn; N)、システイン (Cys; C) も含んでもよい。また、リン酸化アミノ酸 (セリン [Ser; S]、スレオニン [Thr; T]、チロシン [Tyr; Y]) も酸性となることからこれらのリン酸化アミノ酸を含んでもよい。さらに、本発明に係わるモチーフの一例は、1～50個のアミノ酸からなり、そのうち、酸性アミノ酸数が20%以上であることが望ましい。本発明のモチーフには、プロテアソームに対する分解抵抗性を有する限り、フェニルアラニン [Phe; F] などの非酸性アミノ酸が含まれていてもよい。

10

本明細書において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸のみならずアミノ酸変異体及び誘導体といったような非天然アミノ酸を含む。好ましい状態において、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフに含まれるアミノ酸は、天然のアミノ酸のみから成る。

本明細書において、「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された」という場合、置換されるアミノ酸の個数は、結果として得られるタンパク質が融合したタンパク質の活性を保持する限り特に限定されないが、1～9個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個程度であるか、あるいは全体の長さの20%以内、好ましくは10%以内である。置換又は付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸又はアミノ酸アナログであり得、好ましくは天然のアミノ酸である。

20

本発明の酸性アミノ酸から成るか、酸性アミノ酸をからモチーフ (「安定化促進領域」「Stabilon」「CTAD; C-terminal acidic domain」「酸性アミノ酸領域」と表記することもある。) は、融合したタンパク質をタンパク質分解から防ぐことができる限り、構成アミノ酸やその長さ、融合の位置や方式等において特に限定されない。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフは融合タンパク質のどこに位置してもよく、融合タンパク質のN末端側、C末端側もしくは内部のいずれに連結してもよい。

30

本発明に係る分解阻害性モチーフが融合或いは付加されるタンパク質は、分解阻害モチーフの追加によって、タンパク質分解に抵抗性が発揮され、さらに、所定の生理活性を有するかこれを期待できるタンパク質であれば特に限定されない。例えば、既述のOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycは、当該タンパク質の好適な例である。

本発明に係る「本発明に係る融合タンパク質をコードする核酸」は本発明に係る融合タンパク質をコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよく、好ましくはDNAである。かかるDNAは、例えば、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、所定の細胞、組織に由来するcDNA及びcDNAライブラリーから得ることができ、合成したDNAであってもよい。所定の細胞・組織から全RNAまたはmRNA画分を調整し、RT-PCR法によって増幅して得ることもできる。

40

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフをコードする核酸は、アミノ酸配列に基づいて塩基配列を決定し、当該配列に基づいて合成したDNAからなる。また、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフに融合するタンパク質やペプチド等をコードする核酸は、例えば細胞から抽出したRNAを用い、RT-PCR法によって得たcDNAやcDNAライブラリーから得ることができ、合成したDNAであってもよい。それぞれの核酸は連結してから発現ベクターに挿入することもできるし、それぞれの核酸を発現ベクターのクローニングサイトに挿入することによって融合タンパク質が発現されるように連結してもよく、いずれの場合も本発明の「融合タンパク質をコードする核酸」に含まれる。

「融合タンパク質が発現されるように」連結するとは、目的タンパク質、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフの他、精製用タグ、核移行シグナル (NLS; nuclear

50

localization signal ; 以下NLSと表記することもある。)等の細胞内局在を誘導することが可能なモチーフ等をコードする核酸のフレームを合わせて (in frameで) 連結することを意味する。

本発明に関わる「発現ベクター」は、上述の本発明に関わる酸性アミノ酸から成るモチーフをコードする核酸が挿入されているベクターである。発現ベクターは、宿主中で自己複製能を有し、宿主細胞と容易に区別しうる表現系の遺伝子を有し、制限酵素切断部位を少なくとも一つ有し、宿主細胞外では生存できないという条件を満たす限り、どのようなものを用いてもよく、宿主との組み合わせで選択することができる。例えば、宿主を大腸菌とする場合には、pBR系ベクター、pUC系ベクター、pET系ベクター、pQE系ベクター等のプラスミドが好ましく用いられ、その他、動物細胞発現用プラスミド、大腸菌細胞発現用

10

プラスミド、酵母細胞発現用プラスミド、昆虫細胞発現用ウイルス (バキュロウイルス等)、ウイルスベクター、ファージベクター、コスミドベクター、酵母由来プラスミド、酵母人工染色体 (YAC) 等を用いることもできる。

発現ベクターには、宿主で機能するプロモーターが組み込まれ、プロモーターの制御下に本発明の核酸が挿入される。発現ベクターには、例えば、複製起点、ターミネーター領域、形質転換体を選択するための選択マーカー遺伝子等も挿入される場合がある。選択マーカー遺伝子としては、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ネオマイシン、ジェネティシン等の抗生物質耐性遺伝子が用いられる。

本発明に関わる「形質転換体」は、上述した本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフをコードする核酸が挿入されている発現ベクターを用いて形質転換した宿主をいう。宿主としては発現ベクターが大腸菌用の発現ベクターである場合、例えば、大腸菌、その他細菌類等を用いることができるが、大量生産にも適する大腸菌が好ましい。発現ベクターが動物細胞用の発現ベクターである場合、例えば、HEK293細胞、HeLa細胞、MCF-7細胞、Cos細胞等の培養細胞を用いることができる。

20

次に、本発明に係る融合タンパク質の製造方法について説明する。本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は上述した本発明の核酸を含む発現ベクターを用いて、宿主を形質転換し、当該宿主を培養して融合タンパク質を発現させ、当該融合タンパク質を精製して得ることができる。その他、動物培養細胞にトランスフェクション試薬やエレクトロポレーション等を用い発現ベクターを導入し、一過的に発現を調べたりすること

30

することも可能である。本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質の発現ベクターで宿主を形質転換させる方法には、公知の方法を用いることができ、例えば、宿主が大腸菌の場合、塩化マンガンや塩化カルシウムで処理してコンピテント細胞を作製し、懸濁液に発現ベクターを混ぜてヒートショックにより取り込ませる方法、エレクトロポレーション法、ファージベクターの場合には宿主にファージを感染させる方法等を挙げることができる。また、宿主が動物培養細胞の場合、市販のトランスフェクション試薬やエレクトロポレーション法、塩化カルシウム沈殿法等により取り込ませることができる。

こうして得られた形質転換体を適当な培地で培養することにより、目的とする融合タンパク質を発現させることができる。培地の組成、培養の温度、時間、誘導物質の添加等の条件は、形質転換体が生育し、融合タンパク質が効率よく産生されるよう、公知の方法に従って当業者が決定することができる。また、例えば、選択マーカーとして抗生物質抵抗性遺伝子を発現ベクターに組み込んだ場合、培地に抗生物質を加えることにより、形質転換体を選択することができる。

40

産生された融合タンパク質は、公知の方法に従って精製することができる。例えば、宿主を緩衝液に懸濁して超音波破碎等の方法で破壊する。続いて融合タンパク質に精製用タグが融合されている場合は、まず当該精製用タグに特異的な親和性を有するアフィニティークラムを通し、カラムに吸着された融合タンパク質を溶出用の緩衝液で溶出することによって精製することができる。また、得られた融合タンパク質溶液を、再度アフィニティークラムを通す工程を複数回繰り返すことによって、さらに純度を高めることが可能であ

50

る。

特に、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を医薬として用いる場合には、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましいところ、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合した精製用タグを含む場合、このような純度を容易に達成することができる。

大腸菌における発現系で、精製用タグにポリヒスチジン(His6)を用いる場合、発現タンパク質を封入体として発現させ、アフィニティーカラムに通す前に、尿素やグアニジン塩酸等のタンパク質変性剤や、界面活性剤で処理することも好ましい。変性して精製したタンパク質は、リフォールディングすることによって、適切に機能を発揮させることができる。リフォールディングは、例えば、過剰量のアルギニンを含む緩衝液で希釈することや同緩衝液での透析によって行なうことができる。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は、融合したタンパク質の機能によっては医薬組成物となる。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合するタンパク質としては、細胞膜透過性タンパク質、抗体、ペプチド、細胞内でタンパク質分解されるタンパク質等が挙げられる。

これらのタンパク質が、細胞内や個体内でタンパク質分解される様な状況の場合、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合していないタンパク質の分解は早い、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は、タンパク質分解耐性を発揮し難分解性であることが予想される。従って、タンパク質を長期間大量に投与しなくてはならない治療法や細胞分化法に対し、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合するタンパク質を使用した場合、短期間に少量の投与で極めて高い効果が得られると予想される。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質からなる医薬組成物は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、不湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いて、通常の医薬組成物の形態に製剤化される。このような医薬組成物としては、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射等が挙げられる。

医薬組成物中に含有される本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質の量は、特に限定されず広い範囲内から適宜選択することができるが、通常、医薬組成物に本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を1~70%重量%含有させるのが好ましい。本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を有効成分として含有する医薬組成物は、さらに他の有効成分を含有することもできるし、他の有効成分を含有する医薬組成物と組み合わせて用いることもできる。

本発明に係る医薬組成物の投与方法としては特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、疾患の状態、その他の条件に応じた方法で投与される。錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤の場合の投与方法としては、例えば、経口投与が挙げられる。また、注射剤の場合には、単独で、又はブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して、静脈内、筋肉内、皮内、皮下又は腹腔内に投与することができる。坐剤の場合には直腸内に投与される。

上記医薬組成物の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、経口投与する場合、通常、成人(60kg)に対し、1回あたり、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。また、注射剤として投与する場合、成人(60kg)に対し、1回あたり、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を約0.1mg~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mg投与する。

上記医薬組成物の投与回数は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、例えば、2週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回等の頻

10

20

30

40

50

度で投与することができる。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は、動物培養細胞内で発現させることで従来細胞内でタンパク質分解が早いために、発現が十分に見られず、機能解析が不可能であったタンパク質に対し有効であると考えられる。

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

図1について説明する。DP-1 (WT, ・, ・) を発現プラスミドによりHEK 293 F細胞に強制発現させた際のDP-1の分解度について、プロテアソーム阻害剤であるMG132の有無の条件下で調べた。

1. 1 発現プラスミドの作製および大量調整

Flagタグ融合DP-1 (WT, ・, ・) をは乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3発現プラスミド (Invitrogen社) にFlagタグとDP-1をコードするcDNAをLigationにより挿入した (図1-A、本発現プラスミドの構築についてはIshida H. ら、2005 J Biol Chem. 2005 vol. 280 No. 26:24642-8. に報告)。

FlagタグはAsp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lysからなるアミノ酸配列であり、この配列を融合することで、ウエスタンブロッティングによる検出が極めて容易になること (ウエスタンブロッティングに用いるHRP融合Flag抗体 [SIGMA社] は極めて高感度でFlagタグ融合タンパク質を検出可能である) から使用した。

各プラスミドを含む単一クローン化した大腸菌を、各々アンピシリン入りLB培地を用いて培養した。遠心分離により集菌後、Plasmid Purification MAXI Kit (QIAGEN社) を用い発現プラスミドを精製した。

1. 2 細胞培養

HEK 293 F細胞を10% FBS入りDMEM培地 (抗生物質としてペニシリンとストレプトマイシンを含む) により培養した。トランスフェクション用には、トランスフェクション時に50% コンフレントになるよう、前日6 cmディッシュにHEK 293 F細胞を撒いた。

1. 3 トランスフェクション

図1の1~7レーンの並びの通りの組み合わせで、HEK 293 F細胞にプラスミドをトランスフェクションした。発現プラスミドはFlag-DP-1 / pcDNA3 200 ng用い、補正用にcDNA3発現プラスミドを計2.6 mgとなるように加えTEバッファー (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) で100 mlになるように調整した。トランスフェクション試薬にはPolyfect transfection reagentを用いた。発現プラスミド溶液に30 ml Polyfect transfection reagent (QIAGEN社) を加えボルテックスし、攪拌混濁した。DNA、Polyfect transfection reagent複合体を形成するため5分間静置した。その間、細胞の培地を交換した。DNA、Polyfect transfection reagent複合体を培地に添加し、ゆっくり混ぜた。CO₂ インキュベーターに置き、5% CO₂ 濃度、37℃の条件下で培養を続けた。

1. 4 MG132の添加

MG132はDMSOに溶解したものをを用いた。レーン5~7にはMG132が最終濃度10 mMになるよう、細胞回収の6時間前に添加した。レーン2~6にはDMSO濃度がレーン5~7と同じ濃度になるようDMSOのみを加えた。

RT-PCR法によるmRNAの発現解析 (図1、パネルa, b)

1. 5. 1 Total RNAの抽出

トランスフェクション後24時間培養を続けた細胞から培地を捨てた。1 mlのPBSを加え、軽いピペッティングで細胞を剥がし、1.5 mlのエッペンチューブに移した。

1,500 rpmの遠心分離で細胞を回収し、上清を捨てた。沈殿した細胞に700 ml

10

20

30

40

50

のPBSを加え、更に700mlのIsogen（ニッポンジーン社）を加えた。Isogenのプロトコールに従い、total RNAを調整した。

1. 5. 2 RT-PCR法

RT-PCRによって強制発現させるFlag-DP-1/pCDNA3由来のFlag-DP-1 mRNAの量の定量化を試みた。RT-PCR用のプライマーはFlag-DP-1 mRNA用と補正用にハウスキーピング遺伝子であるGAPDHを用いることとし、以下のように設計した。

Flag-DP-1

Forward : AGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATAC

10

Reverse : CGAGCGGGTTGACGGTGGAGGGGTGAACGGCCACG

GAPDH

Forward : CCCAGAAGACTGTGGATGGCCCC

Reverse : CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTTGACAAAG

RT反応は、AccessQuick RT-PCR system（プロメガ社）を用いて以下の様に行った。

1. 5. 2. a. RT反応組成

20

RNA (1mg/ml)	1 ml
Master Mix (2x)	10 ml
3' primer (50 pmol/l)	0.4 ml
AMV Reverse Transcriptase	0.4 ml
Nuclease-free water	13 ml
Total	20 ml

1. 5. 2. b. RT-PCRプログラム

45℃ 45分
94℃ 2分
4℃ ∞

30

PCR反応はExTaq（タカラバイオ社）により以下の様に行った。

1. 5. 2. c. PCR反応組成

10X ExTaq Buffer	4 ml
dNTP Mixture	3.2 ml
5' primer	0.8 ml
3' primer	0.8 ml
TaKaRa ExTaq (5 unit/μl)	0.4 ml
H ₂ O	30.8 ml
Total	40.0 ml

1. 5. 2. d. PCR反応プログラム

40

Flag-pCDNA3-DP-1の増幅

96℃ 1分
96℃ 20秒
71℃ 45秒
4℃ ∞

（96℃；20秒、71℃；45秒の反応は35サイクル繰り返す。）

GAPDHの増幅

96℃ 1分
96℃ 20秒
71℃ 45秒

50

4℃ ∞

(この96℃; 20秒、71℃; 45秒の反応は30サイクル繰り返す。)

1. 5. 2. e. 電気泳動法による増幅の確認

PCR産物は2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い展開し、エチジウムブロマイドにより染色した後、Transilluminator (株式会社アドバンス) で確認しデジタルカメラFinePix F11 (FUJIFILM) によって記録した。

Western blotting解析によるタンパク質発現量解析 (図1、パネルc, d)

1. 6. 1 Total細胞抽出液

トランスフェクション後24時間培養を続けた細胞から培地を捨てた。1mlのPBSを加え、軽いピペティングで細胞を剥がし、1.5mlのエッペンチューブに移した。1,500rpmの遠心分離で細胞を回収し、上清を捨てた。沈殿した細胞に300mlのNET-N+バッファー (20mM Tris-HCl [pH7.9], 1mM EDTA [pH7.9], 150mM NaCl, 1% NP-40, プロテアーゼインヒターカクテルを使用直前に添加) を加え、数度のピペティングにより抽出し、13,500rpm、4℃の遠心分離をした。上清を別の新しい1.5mlのエッペンチューブに移し、300mlの2xSDS-PAGE sampleバッファーを加え攪拌した。98℃で1分間煮沸し、サンプル化した。

1. 6. 2 Western blotting法

12% SDS-PAGEゲルにより、各レーンの細胞抽出液サンプル10mlをロードし泳動した。泳動後、ゲル板からゲルを外し、トランスファーバッファーに浸した。ゲルをトランスファーブロット (BioRAD社) にセットし、分離したサンプルタンパク質をPVDFメンブレン (ミリポア社) に移した。サンプルタンパク質を移し取ったPVDFメンブレンをブロッキングバッファー (ナカライ社) に浸した。TBSTバッファー (20mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.1% Tween20) で4回洗浄後、一次抗体としてHRP (Horseradish peroxidase) 融合Flag抗体、またサンプルの抽出液の均一性を補正するためにハウスキーピング遺伝子であるb-アクチンを用いた。b-アクチンを使用した場合は、TBSTバッファーで4回洗浄後、二次抗体としてHRP融合anti-mouse IgG抗体を用いた。検出はケミルミワンをHRPの基質として用い、発色をハイパーフィルム (GEヘルスケア社) によって検出した。

図1、パネルa, bのレーン2~7において、Flag-DP-1 (WT, . . . , .) mRNAはほぼ等量の良い発現を示した。MG132添加によるmRNA量の変化はなかった。図1、パネルc, d、DMSOのみの添加群において (レーン2~4)、Flag-DP-1 (WT) タンパク質は通常の良い発現を示したが (パネルc、レーン2)、Flag-DP-1 (. . . , .) タンパク質は非常に低レベルの発現量であった (パネルc、レーン3, 4)。MG132添加群において (レーン5~7)、Flag-DP-1 (WT, . . . , .) タンパク質はほぼ等量の発現であった (パネルc、レーン5~7)。よって、Flag-DP-1 (. . . , .) タンパク質はMG132添加により、大幅に発現量が増加した (パネルc、レーン3, 4とレーン6, 7の比較)。よって、Flag-DP-1 (. . . , .) タンパク質はプロテアソームにより強力に分解されるタンパク質であることが判明した。また、Flag-DP-1 (. . . , .) が欠いているC末端側領域にDP-1の分解抑制に重要であるドメインかモチーフが存在することが考えられた。

次に、図2について説明する。DP-1 (WT, . . . , ΔC364, ΔC395) を発現プラスミドによりHEK293F細胞に強制発現させた際のDP-1の分解度について、プロテアソーム阻害剤であるMG132の有無の条件下で調べた。

2. 1 発現プラスミドの作製および大量調整

Flagタグ融合DP-1 (WT, . . . , ΔC364, ΔC395) をほ乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3発現プラスミド (Invitrogen社) にFlagタグとDP-1をコードするcDNAをLigationにより挿入した (図2-A

10

20

30

40

50

）。F l a g タグ融合 D P - 1 (W T , . . , .) に関しては、前記 1 . 1 に記載のものと
同じものを使用した。F l a g タグ融合 D P - 1 (Δ C 3 6 4 , Δ C 3 9 5) 発現プラ
スミドの構築については、D P - 1 欠失変異体フラグメントを以下のプライマーを用いた
P C R により増幅した。

F l a g D P - 1 (Δ C 3 6 4)

Forward; 5' -TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA-3'

Reverse; 5' -AATTCTAGATCACAGCTCACTGGCAGAGAACCTTGTG-3'

D P - 1 (Δ C 3 9 5)

10

Forward; 5' -TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA-3'

Reverse; 5' -AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC-3'

P C R 反応

50 pmol	5' primer	1 μl
50 pmol	3' primer	1 μl
template	DNA (10 ng / μl)	1 μl
5 × PS	Buffer	10 μl
dNTP		4 μl
H ₂ O		32.5 μl
PrimeStar	HS DNA polymerase	0.5 μl
Total		50 μl

20

以上の混合液を以下のサイクルで反応させた。

98℃ 1分
98℃ 10秒
71℃ 1分
4℃ ∞

(98℃; 10秒、71℃; 1分は28 cycle 繰り返す。)

増幅した産物を制限酵素処理し、同制限酵素で処理した p c D N A 3 - F l a g ベクタ
ーに L i g a t i o n し挿入した。挿入はミニブレップ後制限処理し確認した。また全配
列が正しいことをシーケンスにより確認した。

30

発現プラスミドの大量調整は〔0039〕で示した P l a s m i d P u r i f i c a t i o n M A X I K i t (Q I A G E N 社) を用い発現プラスミドを精製した。

2. 2 細胞培養については、前記 1. 2 と同様である、

2. 3 トランスフェクションについては、前記 1. 3 と同様である、

2. 4 M G 1 3 2 の添加については、前記 1. 4 と同様である、

2. 5 W e s t e r n b l o t t i n g 解析については、前記 1. 5 と同様である

。

M G 1 3 2 が不在条件において、D P - 1 (. , .) はほとんど発現が見られなかった
(図 2 - B パネル a , レーン 3 , 5) 。 M G 1 3 2 が不在条件において、D P - 1 (. , .) と同様に D P - 1 (Δ C 3 6 4 , Δ C 3 9 5) も発現がみられなかった (図 2 - B パ
ネル a , レーン 7 , 9) 。また、D P - 1 (Δ C 3 6 4 , Δ C 3 9 5) の分解は M G 1 3 2 の添加により抑制された (図 2 - B パネル a , レーン 8 , 10) 。よって、D P - 1 の
プロテアソームによる分解を抑制する領域は、D P - 1 の最も C 末端側の 395 - 410
アミノ酸 (E D D E E D D D F N E N D E D D) であることが判明した。この領域はグル
タミン酸 (E) とアスパラギン酸 (D) に富む酸性領域である。

40

次に、図 4 について説明する。D P - 1 (. , . + C T A D , Δ C 3 6 4 , Δ C 3 6 4 + C T A D) を発現プラスミドにより H E K 2 9 3 F 細胞に強制発現させた際の D P - 1
の分解度について調べた。

50

3. 1 発現プラスミドの作製および大量調整

Flagタグ融合DP-1 (・, ・+CTAD, ΔC364, ΔC364+CTAD) をは乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3発現プラスミド (Invitrogen社) にFlagタグとDP-1をコードするcDNAをLigationにより挿入した (図3-A)。Flagタグ融合DP-1 (・) の構築については、前記1. 1に記載のものと同一のものを使用した。Flagタグ融合DP-1 (ΔC364) の構築については、前記2. 1に記載のものと同一のものを使用した。Flagタグ融合DP-1 (・+CTAD, ΔC364+CTAD) の構築については発現プラスミドの構築については、DP-1 (・)、DP-1 (ΔC364) にそれぞれCTADをコードするフラグメントをLigationした。挿入はミニプレップ後制限処理し確認した。また全配列が正しいことをシーケンスにより確認した。

10

発現プラスミドの大量調整は前記1. 1で示したPlasmid Purification MAXI Kit (QIAGEN社) を用い発現プラスミドを精製した。

3. 2 細胞培養については、前記1. 2と同様であり、

3. 3 トランスフェクションについては、前記1. 3と同様であり、

3. 4 Western blotting解析については、前記1. 6同様である。

図3の実験は全てMG132がない条件において行われている。Flag-DP-1 (・) はほとんど発現が見られなかった (図3-Bパネルa, レーン1)。また、Flag-DP-1 (・+CTAD) は十分な発現が見られた (図3-Bパネルa, レーン2)。Flag-DP-1 (ΔC364) は弱い発現が見られた (図3-Bパネルa, レーン3)。Flag-DP-1 (ΔC364+CTAD) は十分な発現が見られた (図3-Bパネルa, レーン4)。よって、図2で決定したDP-1のプロテアソームによる分解を抑制する領域 (DP-1の最もC末端側の395-410アミノ酸、EDDEEDDDFNENDEDD; CTAD) はDP-1 (・) 領域内に存在するDP-1のタンパク質分解に係る領域の抑制を行うことが示された。

20

次に、図4について説明する。DP-1 (WT, ΔCTAD, ΔN102, ΔN102+CTAD, ΔN126, ΔN126+CTAD, ΔN191, ΔN191+CTAD, ・, ΔC191-410, ΔC127-410) を発現プラスミドによりHEK293F細胞に強制発現させた際のDP-1の分解度について調べた。

4. 1 発現プラスミドの作製および大量調整

30

Flagタグ融合DP-1 (WT, ΔCTAD, ΔN102, ΔN102+ΔCTAD, ΔN126, ΔN126+ΔCTAD, ΔN191, ΔN191+ΔCTAD, ・, ΔC191-410, ΔC127-410) をは乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3発現プラスミド (Invitrogen社) にFlagタグとDP-1をコードするcDNAをLigationにより挿入した (図4-A)。Flagタグ融合DP-1 (WT, ・) の構築については〔0039〕に記載のものと同一のものを使用した。Flagタグ融合DP-1 (ΔCTAD, ΔN102, ΔN102+ΔCTAD, ΔN126, ΔN126+ΔCTAD, ΔN191, ΔN191+ΔCTAD, ・, ΔC191-410, ΔC127-410) の構築については、DP-1欠失変異体フラグメントを以下のプライマーを用いたPCRにより増幅した。

40

FlagDP-1 (ΔCTAD)

Forward; 5' - TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA -3'

Reverse; 5' - AATTCTAGATCACCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

DP-1 (ΔN102)

Forward; 5' - AAGAATTCAAGCGCAACAGGAAAGGAGAGAAGAATG -3'

Reverse; 5' - AATTCTAGATCAGTCGTCCTCGTCATTCTCGTTG -3'

50

D P - 1 (Δ N 1 0 2 + Δ C T A D)

Forward;5' - AAGAATTCAAGCGCAACAGGAAAGGAGAG AAGAATG -3'

Reverse;5' - AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

D P - 1 (Δ N 1 2 6)

Forward;5' - AAGAATTCCAGAGGAAAGGGACCACTTCCTACAACG -3'

Reverse;5' - AATTCTAGATCAGTCGTCCTCGTCATTCTCGTTG -3'

10

D P - 1 (Δ N 1 2 6 + Δ C T A D)

Forward;5' - AAGAATTCCAGAGGAAAGGGACCACTTCCTACAACG -3'

Reverse;5' - AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

D P - 1 (Δ N 1 9 1)

Forward;5' - AAGAATTCGGTCTGCCCACCAACTCGGC -3'

Reverse;5' - AATTCTAGATCAGTCGTCCTCGTCATTCTCGTTG -3'

20

D P - 1 (Δ N 1 9 1 + Δ C T A D)

Forward;5' - AAGAATTCGGTCTGCCCACCAACTCGGC -3'

Reverse;5' - AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

D P - 1 (Δ C 1 9 1 - 4 1 0)

Forward;5' - TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA -3'

Reverse;5' - TTTCTAGATTAAATCCACTTGATCTCCTTCTTCTCCTTGGAG -3'

30

D P - 1 (Δ C 1 2 7 - 4 1 0)

Forward;5' - TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA -3'

Reverse;5' - TTTCTAGATTACACCTTCTCGCAGACCTTCATGGAGA -3'

40

P C R 反 応

5 0 p m o l	5 ' p r i m e r	1 μ l
5 0 p m o l	3 ' p r i m e r	1 μ l
t e m p l e t e	D N A (1 0 n g / μ l)	1 μ l
5 × P S	B u f f e r	1 0 μ l
d N T P		4 μ l
H ₂ O		3 2 . 5 μ l
P r i m e S t a r	H S D N A p o l y m e r a s e	0 . 5 μ l
T o t a l		5 0 μ l

以上の混合液を以下のサイクルで反応させた。

50

98℃ 1分
 98℃ 10秒
 71℃ 1分
 4℃ ∞

(98℃; 10秒、71℃; 1分は28cycle繰り返す。)

増幅した産物を制限酵素処理し、同制限酵素で処理したp cDNA3-FlagベクターにLigationし挿入した。挿入はミニブレップ後制限処理し確認した。また全配列が正しいことをシーケンスにより確認した。

発現プラスミドの大量調整は、前記1. 1で示したPlasmid Purification MAXI Kit (QIAGEN社)を用い発現プラスミドを精製した。

10

4. 2 細胞培養については、前記1. 2と、

4. 3 トランスフェクションについては、前記1. 3と、

4. 4 Western blotting解析については、前記1. 61, 1. 62と、同様に行なった。

図4の実験は全てMG132がない条件において行われている。Flag-DP-1 (各種欠失変異体; 前記4. 1に記載)を発現させたところ、Flag-DP-1 (ΔN191, ΔN191+ΔCTAD)に十分な発現が見られた(図4-Bパネルa, レーン7, 8)。また、Flag-DP-1 (ΔC191-410)はほとんど発現が見られなかったが(図4-Bパネルa, レーン10), Flag-DP-1 (ΔC127-410)は発現が見られた(図4-Bパネルa, レーン11)。よって、DP-1のタンパク質分解を促進する領域は128-192アミノ酸の領域であることが示された。

20

次に、図5について説明する。DP-1 (CTAD)が、タンパク質分解される他分子においてもタンパク質分解を阻害するように機能するかを確認するため、DP-1 (CTAD)を細胞内で分解されやすいタンパク質であるGAL4のDNA結合領域(DNA binding domain; DBDと略す場合もある)に融合し、HEK293F細胞に強制発現させた際の分解度について、プロテアソーム阻害剤であるMG132の有無の条件下で調べた。

5. 1 発現プラスミドの作製および大量調整

GAL4 DBD単体、GAL4 DBD融合DP-1 (Stabilon; CTAD, Degron)をほ乳動物培養細胞で発現させるため、p cDNA3発現プラスミド (Invitrogen社)にGAL4 DBDとDP-1をコードするcDNAをLigationにより挿入した(図5-A)。本発現プラスミドの構築については、GAL4 DBDはコードするDNAをpMプラスミド(クロンテック社)よりBglII-EcoRIで切り出し、BamHI-EcoRIで制限酵素消化したp cDNA3に挿入した。GAL4 DBD融合Stabilon; CTADはEcoRI-XbaIで前述のGAL4 DBD-p cDNA3に挿入した。GAL4 DBD融合DegronはEcoRI-XbaIで前述のGAL4 DBD-p cDNA3に挿入した。

30

発現プラスミドの大量調整は、前記1. 1で示したPlasmid Purification MAXI Kit (QIAGEN社)を用い発現プラスミドを精製した。

5. 2 細胞培養については、前記1. 2と、

40

5. 3 トランスフェクションについては、前記1. 3と、

5. 4 MG132の添加については、前記1. 4と、

5. 5 Western blotting解析については、前記1. 61, 1. 62と、同様に行なった。

ただし、Western blottingの抗体についてはGAL4検出にはGAL4 DBD抗体 (Santa cruz社; RK5C1; HRP融合; sc-501)を使用した。

MG132がない条件において、GAL4 DBDは極めて弱い発現が見られた(図5-Bパネルa, レーン1)。MG132がない条件において、GAL4 DBD+Degronは弱い発現が見られた(図5-Bパネルa, レーン3)。MG132がない条件におい

50

て、GAL4DBD+Stabilon (CTAD) は十分な発現が見られた (図5-B パネルa, レーン5)。また、GAL4DBD、GAL4DBD+Degron、GAL4DBD+Stabilon (CTAD) とともに、MG132の添加で発現は極めて改善された (図5-B パネルa, レーン2, 4, 6)。よって、DP-1のCTAD (DP-1のC末端側の395-410アミノ酸; EDDEEDDDFNENDEDD) はGAL4DBDのプロテアソームによる分解を阻害した。よって、DP-1のCTADはタンパク質分解されるタンパク質の一般的な阻害モチーフとなる可能性が高い。

次に、StabilonをiPS細胞誘導因子に導入した実施形態について説明する。
実験方法

10% FBS入りD-MEM培地で培養したHEK293細胞にpcDNA3ベクターに組み込んだFlagもしくはHAタグ融合Oct4, Sox2, Klf4をポリフェクトによりトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、各実験レーンのディッシュにプロテアソーム阻害剤MG132を最終濃度10 μ Mで添加した。トランスフェクション36時間培養後、PBSバッファーで細胞を洗浄後、TNE-N+バッファーでタンパク質を抽出した。抽出液を等量ずつSDS-PAGE電気泳動で展開した。泳動後、分離したタンパク質をPVDFメンブレンに移し、HRP融合Flag抗体と β -actin抗体を用いたウェスタンブロット解析を行なった。検出の基質にはケミルミワンL (ナカライ) を用い、ハイパーフィルム (GEヘルス) に感光させ検出した。検出したバンドはImageJ (NIH) で定量化を行った。StabilonをOct4とklf4のN末端に融合し、Sox2のC末端に融合した。結果を図6、図7に示す。

結果

HA-Oct4 (WT) はMG132により約1.7倍安定化したが、Stabilonタグ融合により約2.2倍安定化した。Flag-Oct4 (偽遺伝子) はMG132により約10倍安定化したが、Stabilonタグ融合により約2.7倍安定化した。Flag-Sox2はMG132により約2.3倍安定化したが、Stabilonタグ融合により約15倍安定化した。Flag-Klf4はMG132により約3倍安定化したが、Stabilonタグ融合により約2.7倍安定化した。以上の結果から、StabilonタグはMG132と同等もしくはそれ以上の分解耐性能を持つと考えられた。したがって、StabilonをiPS細胞誘導因子に融合することによって、iPS細胞を1週間程度で作成できる可能性がある。

次に、Stabilonの配列と細胞内でのタンパク質安定化の関係について検討した。

実験方法

10% FBS入りD-MEM培地で培養したHEK293細胞にpcDNA3ベクターに組み込んだFlagもしくはHAタグ融合Oct4, Sox2, Klf4をポリフェクトによりトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、各実験レーンのディッシュにプロテアソーム阻害剤MG132を最終濃度10 μ Mで添加した。トランスフェクション36時間培養後、PBSバッファーで細胞を洗浄後、TNE-N+バッファーでタンパク質を抽出した。抽出液を等量ずつSDS-PAGE電気泳動で展開した。泳動後、分離したタンパク質をPVDFメンブレンに移し、HRP融合Flag抗体と β -actin抗体を用いたウェスタンブロット解析を行なった。検出の基質にはケミルミワンL (ナカライ) を用い、ハイパーフィルム (GEヘルス) に感光させ検出した。検出したバンドはImageJ (NIH) で定量化を行った。結果を図8に示す。

結果

HA-Oct4 (WT) はMG132により約1.7倍安定化したが、Stabilonタグ融合により約2.2倍安定化した。Flag-Oct4 (偽遺伝子) はMG132により約10倍安定化したが、Stabilonタグ融合により約2.7倍安定化した。Flag-Sox2はMG132により約2.3倍安定化したが、Stabilonタグ融合により約15倍安定化した。Flag-Klf4はMG132により約3倍

安定化したが、Stabilonタグ融合により約2.7倍安定化した。以上の結果か

ら、StabilonタグはMG132と同等もしくはそれ以上の分解耐性能を持つと考えられる。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Shigemasa Hanazawa, Yoshikazu Masuhiro, Nihon University

<120> Establishment of a motif from acidic amino acid, capable of intercellular protein stabilization and applicable to protein therapeutics, cell differentiation/undifferentiation control, and antibody therapy

10

<130> N002P09005

<150> JP2009-122552

<151> 2009-5-20

<160> 28

20

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Human

<220>

<221> ACT_SITE

30

<400> 1

e d d e e d d d f n e n d e d d 16

1 5 10 15

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Human

40

<220>

<221> ACT_SITE

<400> 2
 e d d e e 5
 1 5

<210> 3
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Human

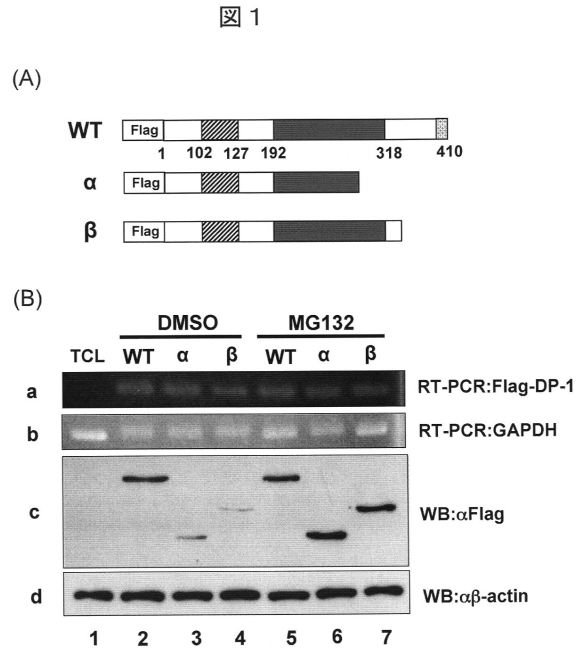
10

<220>
 <221> ACT_SITE

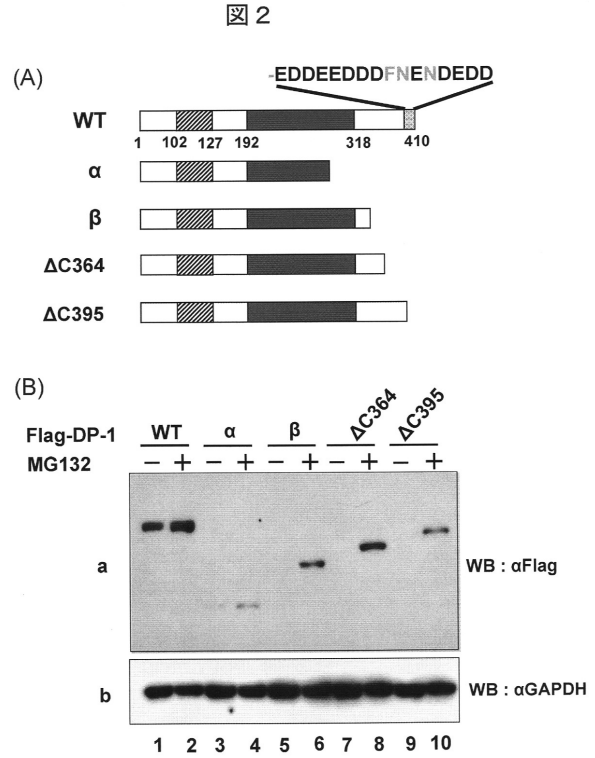
<400> 3
 makdagliea ngelkvfidq nlspgkgvvs lvavhpstvn plgkallpkt fgqsnvniaq 60
 qvvigtpqrp aasntlvvgs phtpsthfas qnqpsdsspw sagkrnrkge kngkglrhfs 120
 mkvcekvqrk gttsynevad elvaefsaad nhilpnesay dqknirrvy dalnvlmamn 180
 iiskekkeik wiglptnsaq ecqnleverq rrlerikqkq sqlqelilqq iafknlvqrn 240
 rhaeqqasrp pppnsvihlp fiiivntskkt videsisndk feylfnfdnt feihddievl 300
 krmgmacgle sgscsaedlk marslvpkal epyvtemaag tvggvfitta gstsngtrfs 360
 asdlitngadg mlatssngsq ysgsrvetpv syvgeddeed ddfnendedd 410
 1 10 20 30 40 50

20

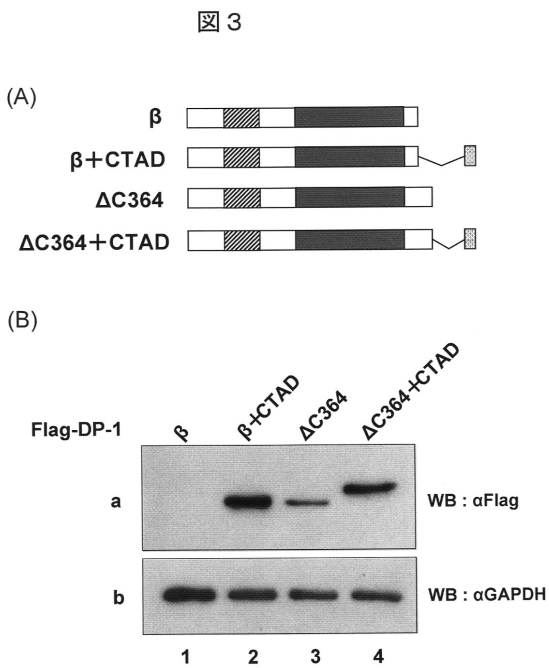
【図 1】



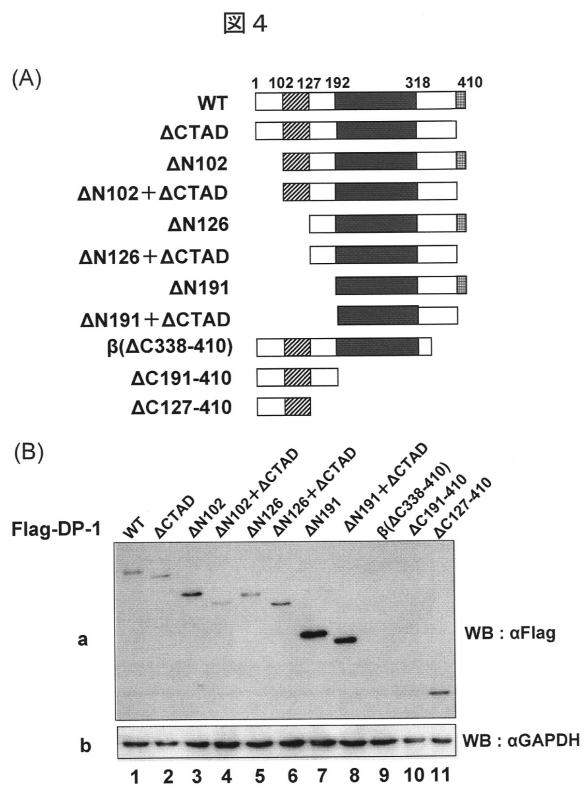
【図 2】



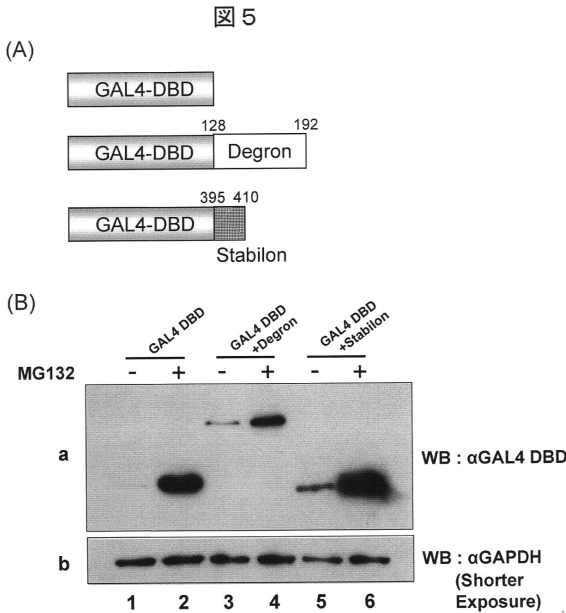
【図 3】



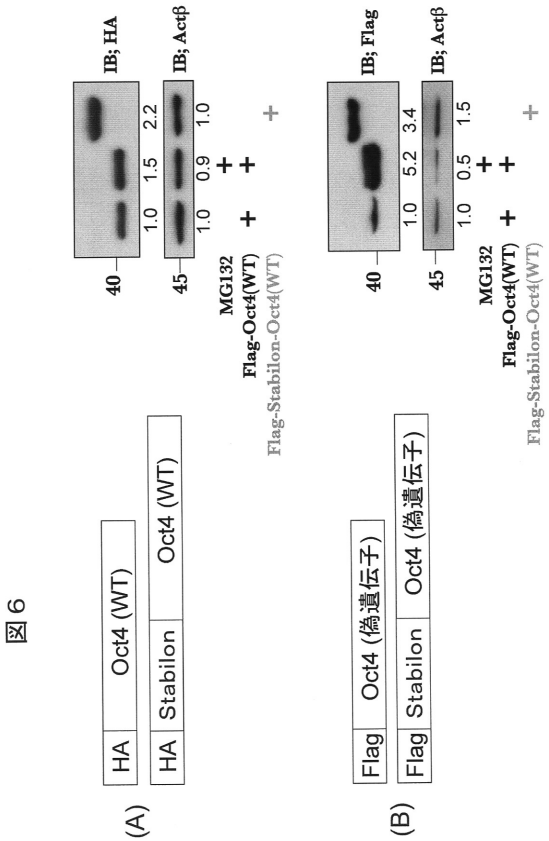
【図 4】



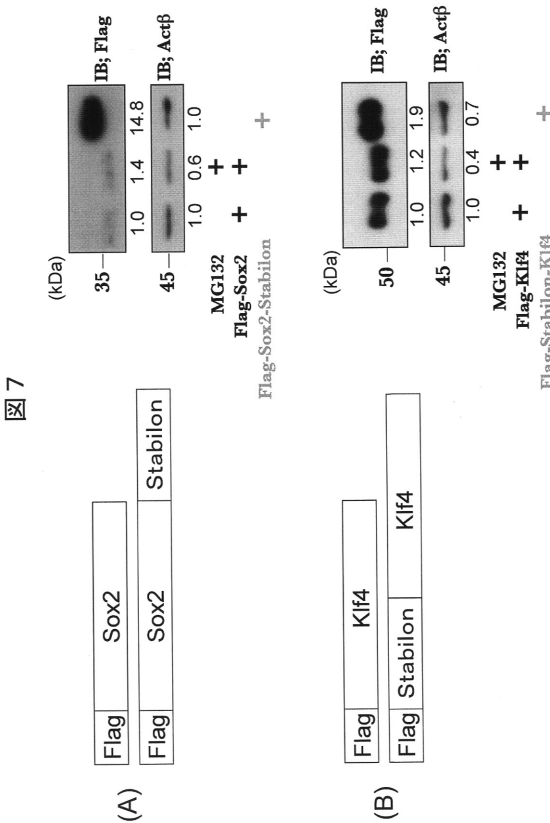
【図 5】



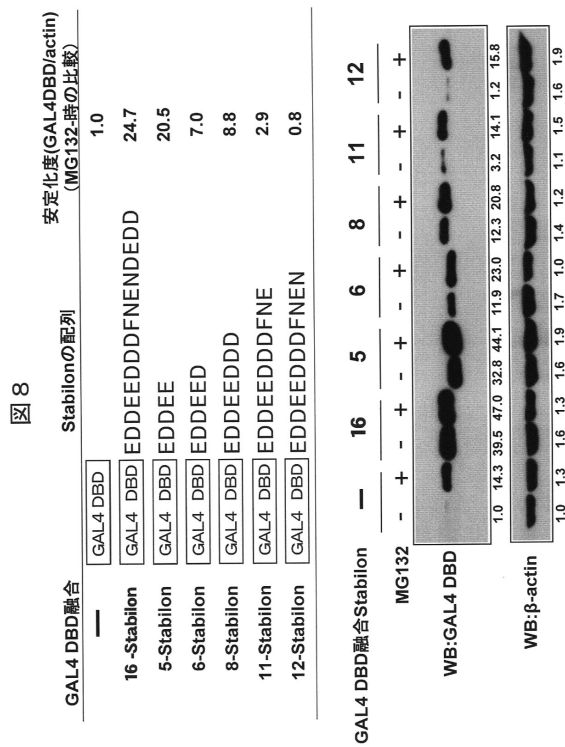
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

合議体

審判長 田村 明照

審判官 中島 庸子

審判官 松田 芳子

(56)参考文献 BMB 2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会) 講演要旨集, 2008, p. 737 4P-0404
 日本農芸化学会2009年度大会講演要旨集, 2009 Mar., p. 301 3P1086
 B
 Cell Stem Cell, 2009 May8, Vol. 4, p. 381-384
 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Available online 2008, Vol. 72, p. 219-225

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 1/00-15/90

C07K 1/00-19/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII)

UniProt/GeneSeq

PubMed