

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4353798号
(P4353798)

(45) 発行日 平成21年10月28日(2009.10.28)

(24) 登録日 平成21年8月7日(2009.8.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
A 61 K 31/7105	(2006.01)	A 61 K 31/7105	
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	
C 07 K 14/47	(2006.01)	C 07 K 14/47	
C 12 P 21/02	(2006.01)	C 12 P 21/02	C

請求項の数 8 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-530730 (P2003-530730)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月25日 (2002.9.25)
 (65) 公表番号 特表2005-511023 (P2005-511023A)
 (43) 公表日 平成17年4月28日 (2005.4.28)
 (86) 國際出願番号 PCT/JP2002/009876
 (87) 國際公開番号 WO2003/027143
 (87) 國際公開日 平成15年4月3日 (2003.4.3)
 審査請求日 平成17年7月5日 (2005.7.5)
 (31) 優先権主張番号 60/324,261
 (32) 優先日 平成13年9月25日 (2001.9.25)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/391,666
 (32) 優先日 平成14年6月26日 (2002.6.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502240113
 オンコセラピー・サイエンス株式会社
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (72) 発明者 中村 祐輔
 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17
 番33号
 (72) 発明者 古川 洋一
 神奈川県川崎市宮前区宮崎3丁目10番4
 O

審査官 横田 倫子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肝細胞癌に関連する遺伝子およびタンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)から(c)の任意の一つである単離されたDNAによってコードされ細胞増殖および標的遺伝子の転写活性化を促進する活性を有するタンパク質：

(a) 配列番号：2記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA；

(b) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列のコード領域を含むDNA；ならびに

(c) コードされるタンパク質が、配列番号：2のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等であるような、配列番号：1記載のヌクレオチド配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするDNA；

および少なくとも1つのその活性化補助因子を含む、転写活性化複合体であって、前記活性化補助因子がRNAヘリカーゼおよびRNAポリメラーゼIIからなる群より選択される転写活性化複合体。

【請求項2】

細胞増殖および標的遺伝子の転写活性化を促進する活性を有するタンパク質が配列番号：2記載のアミノ酸配列を含むタンパク質である請求項1に記載の転写活性化複合体。

【請求項3】

以下の段階を含む、抗癌活性に関して化合物をスクリーニングする方法：

(a) 少なくとも1つの被験化合物を含む対象試料を、以下の(i)から(iii)の任意の一つである単離されたDNAによってコードされ細胞増殖および標的遺伝子の転写活性化を促進する活性を有するタンパク質：

10

20

(i) 配列番号：2記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA；
 (ii) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列のコード領域を含むDNA；ならびに
 (iii) コードされるタンパク質が、配列番号：2のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等であるような、配列番号：1記載のヌクレオチド配列からなるDNAとストリングエントな条件下でハイブリダイズするDNA；、RNAヘリカーゼおよびRNAポリメラーゼIIからなる群より選択されるその活性化補助因子、および該タンパク質の標的配列CCCTCCを含むDNAに、該タンパク質と該DNAとの複合体の形成を可能にする適切な条件下で接触させる段階；ならびに
 (b) 複合体の形成を阻害する被験化合物を選択する段階。

【請求項4】

10

標的配列が、次の塩基配列から選択されるいづれかの塩基配列を含む、請求項3記載の方法；

EGFRの5'隣接領域の-213 bpから-207 bpの間/CCCTCC(CBS1)、
EGFRの5'隣接領域の-106 bpから-100 bpの間/CCCTCCT(CBS2)、
EGFRの5'隣接領域の-65 bpから-59 bpの間/CCCTCCT(CBS3)、ならびに
EGFRの5'隣接領域の-46 bpから-40 bpの間/CCCTCCT(CBS4)。

【請求項5】

以下の段階を含む、抗癌活性に関して化合物をスクリーニングする方法：

(a) 少なくとも1つの被験化合物を含む対象試料を、請求項1または請求項2記載の複合体および該複合体によって認識される標的配列CCCTCCを含む転写調節領域を有するレポーター遺伝子に接触させる段階；ならびに

20

(b) レポーター遺伝子の発現を阻害する被験化合物を選択する段階。

【請求項6】

転写調節領域がEGFRの転写調節領域である請求項5に記載の方法。

【請求項7】

配列番号：1の塩基配列からなるDNAに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドを活性成分として含む、抗癌組成物であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列が配列番号：3の塩基配列である抗癌組成物。

【請求項8】

配列番号：3の塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチド。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物科学の分野に関し、具体的には癌研究の分野に関する。特に本発明は、肝細胞癌細胞の増殖機構に関する新たなタンパク質ZNFN3A1に関する。本発明のタンパク質は、例えば肝癌に対する薬剤を開発するための標的分子として使用することができる。

【背景技術】

【0002】

肝細胞癌(HCC)は世界中で極めて一般的な癌の一つであり、その発生率は日本や米国で徐々に上昇しつつある(Akriviadis EAら、Br J Surg. 1998 Oct; 85(10): 1319-31)。診断分野における最近の医学の進歩は著しいものの、未だに多くのHCC患者が進行期で診断されており、このような患者が疾患から完全に治癒することは依然として困難である。さらに、肝硬変または慢性肝炎の患者ではHCCへのリスクが高いため、このような患者は、原腫瘍が完全に除去された後であっても複数の肝腫瘍または新規腫瘍を発症しうる。したがって、高度に有効な化学療法薬および予防戦略の開発は急務である。

40

【0003】

分子生物学の最近の進歩により、結腸腫瘍の発生および進行と同様に、多段階の過程が肝癌形成の基礎となることが示唆されている。このような過程は、様々な遺伝子産物の質および量の変化を伴う。遺伝的变化は、一部のHCCにおいてTP53やAXIN1などの腫瘍抑制遺伝子、ならびにc-myc、サイクリンD1、およびs-カテニンなどの癌遺伝子に認められてい

50

る (Tanaka Sら、Cancer Res. 1993 Jun 15 ; 53(12) : 2884-7 ; Satoh Sら、Nat Genet. 2000 Mar ; 24(3) : 245-50)。高頻度のヘテロ接合性喪失 (LOH) が、肝腫瘍細胞では染色体領域4q、6q、8p、8q、9p、9q、13q、16p、16q、および17pにおいて報告されている (Feltelson MAら、Oncogene 2002 Apr 11 ; 21(16) : 2593-604)。このような遺伝子変化に加えて、TGFなどいくつかの遺伝子の発現の変化が、肝癌形成に役割を果たす (Lee GHら、Cancer Res 1992 Oct 1 ; 52(19) : 5162-70)。

【発明の開示】

【 0 0 0 4 】

発明の概要

発明者らは、以前に肝細胞癌における遺伝子のゲノム全体にわたる発現解析を行い、肝癌形成に関与すると考えられるいくつかの遺伝子を同定した。本発明者らはまた、患者における肝炎ウイルスの型、腫瘍の組織学的分類、および腫瘍の血管侵入の状態に関連する遺伝子についても開示している (Okabe Hら、Cancer Res. 2001 Mar 1 ; 61(5) : 2129-37)。p53やp16INK4Aなどの一部の腫瘍抑制遺伝子が不活性化されることがわかっているが、肝細胞癌で一般に活性化されることがわかっている癌遺伝子はこれまで存在しない。

10

【 0 0 0 5 】

本出願は、肝細胞癌で過剰に発現されている単離された遺伝子ZNFN3A1、ならびにジンクフィンガードメインおよびSETドメインを有する、同定された癌タンパク質を提供する。この新たな遺伝子ZNFN3A1の発現はHCCで上昇が多く、RNAポリメラーゼII複合体をトランス活性化すること (EGFRを含む標的遺伝子の転写を促進する) で、癌細胞に発癌活性をもたらすと考えられる。したがってZNFN3A1はHCCの新たな分子標的として役立つ。

20

【 0 0 0 6 】

本発明の目的は、肝細胞癌細胞の増殖機構に関する新たなタンパク質およびこのタンパク質をコードする遺伝子、ならびにこれらを肝細胞癌 (HCC) の診断および治療用に作製および使用する方法を提供することである。

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、HCC治療用の薬剤開発の新たな標的の発見に着手した。そこで、ゲノム全体を対象としたcDNAマイクロアレイを用いて、HCCの発現プロファイルの解析を行った。本明細書では、対応する非癌性肝組織と比較して、大部分のHCCで発現が著しく上昇する新たなヒト遺伝子ZNFN3A1の同定について報告する。ZNFN3A1のcDNAは、ジンクフィンガーモチーフを有する推定428アミノ酸のタンパク質をコードする、1284ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む1622ヌクレオチドからなる。興味深いことにZNFN3A1タンパク質の細胞内局在は、細胞周期の進行中に、または培養細胞の密度によって変化する。すなわちこのタンパク質は、細胞がS期の中期～後期にある場合または低密度で培養されている場合は核に蓄積するが、他の期にある場合または高密度条件で成長している場合は細胞質および核に局在する。さらに、ZNFN3A1はRNAヘリカーゼKIAA0054と直接結合し、RNAポリメラーゼIIと複合体を形成する。この複合体は、上皮細胞成長因子受容体 (EGF R) を含む下流の遺伝子の転写を、その複合体と5'側の隣接領域のエレメント「(C)CCCTCC (T)」との直接結合によって活性化する。これと一致して、NIH3T3細胞でのZNFN3A1の外因性発現により、細胞成長が増進されたが、この発現をアンチセンスS-オリゴヌクレオチドで抑制すると、肝癌細胞の成長が有意に阻害された。これらの結果は、ZNFN3A1が、RNAヘリカーゼとRNAポリメラーゼIIとの複合体を介して、EGFRを含む標的遺伝子の転写を活性化することにより、癌細胞に発癌活性をもたらすこと、およびこの複合体の活性を阻害することがHCC治療の有望な戦略となりうることを示唆している。

30

【 0 0 0 8 】

したがって本発明は、細胞増殖に関する新たなZNFN3A1タンパク質およびこのタンパク質をコードする遺伝子、ならびにこれらの作製および用途に関する。具体的には本発明は以下を提供する。

【 0 0 0 9 】

40

50

本出願は、細胞増殖および標的遺伝子の転写活性化を促進する、新たなヒトタンパク質ZNFN3A1またはその機能的同等物を提供する。好ましい態様では、ZNFN3A1タンパク質は、配列番号：1のオープンリーディングフレームによってコードされるジンクフィンガーモチーフを有する推定428アミノ酸のタンパク質を含む。ジンクフィンガードメイン(MYND)はコドン49～87に位置し、SET(Su3-9、Enhancer-of-zeste、トリソラックス)ドメインはコドン117～246に位置する。ZNFN3A1タンパク質は、好ましくは配列番号：2に記載されたアミノ酸配列を含む。本出願は、ZNFN3A1のポリヌクレオチド配列の少なくとも一部、または配列番号：1に記載された配列と少なくとも15%、より好ましくは少なくとも25%相補的なポリヌクレオチド配列からコードされる、単離されたタンパク質も提供する。

【0010】

10

本発明はさらに、対応する非癌性肝組織と比較して、発現がHCCの大部分で著しく上昇している新たなヒト遺伝子ZNFN3A1を提供する。単離されたZNFN3A1遺伝子は、配列番号：1に記載されたポリヌクレオチド配列を含む。特に、ZNFN3A1のcDNAは、1284ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む1622ヌクレオチドを含む。本発明はさらに、配列番号：1に記載されたポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつこの配列と、ZNFN3A1タンパク質またはその機能的同等物をコードする程度に少なくとも15%、より好ましくは少なくとも25%相補的なポリヌクレオチドを含む。このようなポリヌクレオチドの例は、配列番号：1の縮重体である。

【0011】

20

本明細書で用いる「単離されたZNFN3A1遺伝子」という表現は、構造が任意の天然のポリヌクレオチドと同一ではない、または3つより多くの別個の遺伝子にわたる天然のゲノムポリヌクレオチドの任意の断片と同一ではない、ポリヌクレオチドである。したがって、この表現は例えば以下を含む：(a)生物のゲノムにおいて天然のゲノムDNA分子の一部の配列を有するDNA；(b)原核生物または真核生物のベクターまたはゲノムDNAに、結果として生じる分子が任意の天然のベクターまたはゲノムDNAと同一でないように組み入れられた、ポリヌクレオチド；(c)cDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって作製される断片、または制限酵素切断断片などの別個の分子；ならびに(d)ハイブリッド遺伝子(すなわち融合ポリペプチドをコードする遺伝子)の一部である組換えヌクレオチド配列。具体的には、この定義には、異なる(i)DNA分子、(ii)トランスフェクトされた細胞、または(iii)細胞クローンの混合物中に存在するDNA分子のポリヌクレオチド(例えばcDNAライブラリーやゲノムDNAライブラリーなどのDNAライブラリー中に存在するもの)は含まれない。

【0012】

30

したがって一つの局面では、本発明は、本明細書に記載されたポリペプチド、またはその断片をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、配列番号：1に記載されたヌクレオチド配列と少なくとも60%同一なヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、単離された核酸分子は、配列番号：1に記載されたヌクレオチド配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である。標準配列(例えば配列番号：1)より長いかまたは同じ長さの、単離されたポリヌクレオチドの場合、比較は標準配列の全長に対して行われる。単離されたポリヌクレオチドが標準配列より短い場合(例えば配列番号：1より短い場合)、比較は(相同性の計算に必要な任意のループを除いた)同じ長さの標準配列のセグメントに対して行われる。

40

【0013】

ZNFN3A1タンパク質およびその少なくとも1つの活性化補助因子を含む転写活性化複合体も提供する。一つの態様では、活性化補助因子はRNAヘリカーゼおよび/またはRNAポリメラーゼでありうる。RNAヘリカーゼはRNAヘリカーゼKIAA0054の場合がある。RNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼIIでありうる。ある形式では、この複合体は、ZNFN3A1タンパク質、RNAヘリカーゼ、およびRNAポリメラーゼIIを含む。このような転写活性化複合体は、上皮細胞成長因子受容体(EGFR)を含む遺伝子の転写を、複合体とEGFR遺伝子の5'側隣接領

50

域におけるエレメント「(C)CCCTCC(T)」との直接結合によって活性化することができる。

【0014】

本出願は、癌の治療に用いるための治療薬も提供する。この治療薬は、配列番号：3に記載されたポリヌクレオチド配列として表すことができる。この治療薬は、配列番号：1に記載されたZNFN3A1ポリヌクレオチド配列の、アンチセンスS-オリゴヌクレオチドの少なくとも一部として表される場合もある。適切なアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは5'-GCGGGAGGATGGAGCC-3'（配列番号：3）である。治療薬は肝癌細胞の治療に適切に使用することができる。治療薬の作用機序は望ましくは、肝癌細胞の成長の抑制である。治療薬は、ヒトおよび家畜哺乳類を含む哺乳類に適用することができる。

【0015】

ZNFN3A1タンパク質を認識する抗体もまた、本出願で提供される。部分的には、ZNFN3A1遺伝子のアンチセンスDNA、リボザイム、およびRNAi（RNA干渉）も提供される。

【0016】

さらに、抗癌剤の候補化合物をスクリーニングする方法も提供する。この方法は、ZNFN3A1ポリペプチドを候補化合物に接触させる段階、およびZNFN3A1ポリペプチドに結合する化合物を選択する段階を含む。

【0017】

ZNFN3A1ポリペプチドを、活性化補助因子の存在下で、ZNFN3A1ポリペプチドとその活性化補助因子との複合体の形成に適した条件下で候補化合物に接触させることもできる。次に、複合体の形成を阻害する化合物を選択することができる。活性化補助因子は、RNAヘリカーゼおよび/またはRNAポリメラーゼIIを含みうる。

【0018】

本発明はさらに、ZNFN3A1ポリペプチド、その活性化補助因子、およびこのポリペプチドの標的配列を含むDNAを、ZNFN3A1ポリペプチドとDNAとの複合体の形成に適した条件下で候補化合物に接触させる段階、ならびに複合体の形成を阻害する化合物を選択する段階を含む、抗癌剤の候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的配列は、望ましくはEGFRの5'領域に隣接するCBS配列である。

【0019】

ZNFN3A1ポリペプチド、その活性化補助因子、およびこのポリペプチドと活性化補助因子との複合体によって認識される転写調節領域を有するレポーター遺伝子を、レポーター遺伝子の発現に適した条件下で候補化合物に接触させる段階、ならびにレポーター遺伝子の発現を阻害する化合物を選択する段階を含む、抗癌剤の候補化合物をスクリーニングする方法も提供する。

【0020】

本発明はさらに、検体の生物試料中におけるZNFN3A1遺伝子の発現レベルを決定する段階、ZNFN3A1遺伝子の発現レベルを正常試料における発現レベルと比較する段階、ならびに癌を有する試料中におけるZNFN3A1遺伝子の高い発現レベルを規定する段階を含む、癌の診断方法を提供する。このような癌は、適切には肝細胞癌である。

【0021】

本発明は、ZNFN3A1タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を用いて宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換し、そのポリヌクレオチド配列を発現させることによってタンパク質を産生する方法も提供する。

【0022】

前述の発明の概要および以下の詳細な説明の両方が好ましい態様であり、本発明または本発明の他の代替的な態様を制限するものではないことが理解されるべきである。

【0023】

発明の詳細な説明

本明細書で用いる「一つの(a)、(an)」、および「その(the)」という表現は、特に明記しない限り、「少なくとも一つの」を意味する。

【0024】

10

20

30

40

50

本出願では、対応する非癌性肝組織と比較して、HCCにおいて発現が著しく上昇する新たなヒト遺伝子ZNFN3A1を同定する。ZNFN3A1のcDNAは、配列番号：1に記載された、1284ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む1622ヌクレオチドからなる。このオープンリーディングフレームは、ジンクフィンガーモチーフを有する推定428アミノ酸のタンパク質をコードする。このタンパク質は命名委員会によってZNFN3A1（ジンクフィンガータンパク質、サブファミリー3A（MYND含有）、1）と命名されている。さらにZNFN3A1はRNAヘリカーゼKIAA0054と直接結合し、RNAポリメラーゼIIと複合体を形成する。RNAポリメラーゼIIは、上皮細胞成長因子受容体（EGFR）を含む下流遺伝子の転写を、EGFR遺伝子の5'側隣接領域中のエレメント「(C)CCCTCC(T)」と複合体との直接結合を介して活性化する。これと一致して、NIH3T3細胞でのZNFN3A1の外因性発現により、細胞成長が増進されたが、この発現をアンチセンスS-オリゴヌクレオチドで抑制すると、肝癌細胞の成長が有意に阻害された。これらの知見は、ZNFN3A1が、RNAヘリカーゼおよびRNAポリメラーゼIIとの複合体を介して、EGFRを含む標的遺伝子の転写を活性化することによって、癌細胞に発癌活性をもたらすこと、および複合体の活性を阻害することがHCC治療の有望な戦略となりうることを示唆している。10

【0025】

本発明は、配列番号：1に記載されたポリヌクレオチド配列ならびにその縮重体および変異体を、これらが配列番号：2に記載されたアミノ酸配列またはその機能的同等物を含むZNFN3A1タンパク質をコードする程度に含む、新たなヒト遺伝子ZNFN3A1を含む。ZNFN3A1と機能的に同等なタンパク質の例には、例えば、ヒトZNFN3A1タンパク質に対応する他の生物の相同タンパク質、ならびにヒトZNFN3A1タンパク質の変異体などがある。20

【0026】

本発明では「機能的に同等な」という表現は、対象タンパク質が、ZNFN3A1タンパク質のような細胞増殖を促進する活性、およびRNAヘリカーゼもしくはRNAポリメラーゼまたはこれらの両方と、トランス活性化複合体（EGFRなどの標的遺伝子の転写を促進する）を形成することによって、癌細胞に発癌活性をもたらす活性を有することを意味する。対象タンパク質が細胞増殖活性を有するか否かは、対象タンパク質をコードするDNAをNIH3T3などの細胞に導入し、このタンパク質を発現させ、この細胞の増殖の促進またはコロニー形成活性の増大を検出することによって判断することができる。対象タンパク質が、RNAポリメラーゼもしくはRNAヘリカーゼのいずれか、またはこれらの両方と複合体を形成する能力は、以下の実施例に記載されているような免疫共沈降法でアッセイすることができる。EGFRの転写の促進はさらに、以下の実施例に記載されているようなレポータープラスミドを用いてアッセイすることができる。30

【0027】

所与のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製する方法は当業者に周知であり、タンパク質に変異を導入する公知の方法を含む。例えば当業者であれば、ヒトZNFN3A1タンパク質のアミノ酸配列に、部位特異的変異誘発法で適切な変異を導入することで、ヒトZNFN3A1タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる（Hashimoto-Gotoh, T.ら（1995）、Gene 152、271-275；Zoller, MJ、およびSmith, M.（1983）、Methods. Enzymol. 100、468-500；Kramer, W.ら（1984）、Nucleic Acids Res. 12、9441-9456；Kramer WおよびFritz HJ.（1987）Methods. Enzymol. 154、350-367；Kunkel, TA（1985）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82、488-492；Kunkel（1988）、Methods. Enzymol. 85、2763-2766）。アミノ酸の変異は天然の状態で生じる場合もある。本発明のタンパク質は、1つまたは複数のアミノ酸が変異したヒトZNFN3A1タンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む（結果として得られる変異タンパク質が、ヒトZNFN3A1タンパク質と機能的に同等な場合）。このような変異体で変異が導入されるアミノ酸の数は、一般に10アミノ酸またはそれ未満、好ましくは6アミノ酸またはそれ未満、またより好ましくは3アミノ酸またはそれ未満である。40

【0028】

あるアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、および/または置換によっ50

て修飾されたアミノ酸配列を有する、変異タンパク質または修飾タンパク質は、当初の生物学的活性を保持することがわかっている (Mark, D.F.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M.J. & Smith, M.、Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A.ら、Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

【0029】

変異が導入されるアミノ酸残基は、好ましくはアミノ酸側鎖の性質が保存される異なるアミノ酸へと変異される（保存的アミノ酸置換として知られる過程）。アミノ酸側鎖の性質の例には、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、および以下の官能基または特性を共通して有する側鎖などがある：脂肪族側鎖 (G, A, V, L, I, P)；ヒドロキシル基を含む側鎖 (S, T, Y)；硫黄原子を含む側鎖 (C, M)；カルボン酸およびアミドを含む側鎖 (D, N, E, Q)；塩基を含む側鎖 (R, K, H)；ならびに芳香族基を含む側鎖 (H, F, Y, W)。括弧内の文字が、アミノ酸の1文字コードを意味することに注意されたい。10

【0030】

1つまたは複数のアミノ酸残基が、ヒトZNFN3A1タンパク質（配列番号：2）のアミノ酸配列に付加されたタンパク質の例は、ヒトZNFN3A1タンパク質を含む融合タンパク質である。融合タンパク質は、ヒトZNFN3A1タンパク質と他のペプチドまたはタンパク質との融合体であり、本発明に含まれる。融合タンパク質は、本発明のヒトZNFN3A1タンパク質をコードするDNAを、他のペプチドもしくはタンパク質をコードするDNAとフレームが合うように連結し、融合DNAを発現ベクターに挿入し、宿主において発現させるような、当業者に周知の手法で作製することができる。本発明のタンパク質に融合させるペプチドまたはタンパク質に関する制限はない。20

【0031】

本発明のタンパク質に融合させるペプチドとして使用可能な、公知のペプチドには、例えばFLAG (Hopp, T.P.ら、Biotechnology、(1988)、6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基を含む6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-myc断片、VS-P-GP断片、p18HIV断片、T7タグ、HSVタグ、Eタグ、SV40T抗原断片、Ickタグ、-チューブリン断片、Bタグ、タンパク質C断片などがある。本発明のタンパク質に融合可能なタンパク質の例には、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、インフルエンザ凝集素 (HA)、免疫グロブリンの定常領域、-ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質)などがある。30

【0032】

融合タンパク質は、上述の融合ペプチドまたはタンパク質をコードする市販のDNAを、本発明のタンパク質をコードするDNAと融合し、調製した融合DNAを発現させることにより調製することができる。

【0033】

機能的に同等なタンパク質を単離するための、当技術分野で周知の別 の方法は、例えばハイブリダイゼーション法である (Sambrook, J.ら、Molecular Cloning、第2版、9.47-9.58、Cold Spring Harbor Lab. Press、1989)。当業者であれば、ヒトZNFN3A1タンパク質をコードするDNA配列（配列番号：1）の全体または一部と高い相同意を有するDNAを容易に単離し、単離されたDNAに由来するヒトZNFN3A1タンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することができる。本発明のタンパク質は、ヒトZNFN3A1タンパク質をコードするDNA配列の全体または一部にハイブリダイズするDNAにコードされるタンパク質、およびヒトZNFN3A1タンパク質と機能的に同等なタンパク質を含む。これらのタンパク質は、ヒトまたはマウスに由来するタンパク質に対応する哺乳類の相同物（例えば、サル、ラット、ウサギ、およびウシの遺伝子にコードされるタンパク質）を含む。動物に由来するヒトZNFN3A1タンパク質をコードするDNAと相同意の高いcDNAを単離する際は、卵巣または精巢由来の組織を使用することが特に好ましい。40

【0034】

ヒトZNFN3A1タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば通常の方法で選択することができる。例えばハイブリダイゼーションは、「Rapid-hyb バッファー」(Amersham LIFE SCIENCE)を用いて、68℃で30分間またはそれ以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、68℃で1時間またはそれ以上加温することにより行うことができる。以下の洗浄段階は、例えば低ストリンジエントな条件で行うことができる。低ストリンジエントな条件は、例えば42℃、2×SSC、0.1% SDS、または好ましくは50℃、2×SSC、0.1% SDSである。より好ましくは、高ストリンジエントな条件を用いる。高ストリンジエントな条件は、例えば2×SSC、0.01% SDSによる室温で20分間の3回の洗浄と、これに続く1×SSC、0.1% SDS中で37℃で20分間の3回の洗浄、および1×SSC、0.1% SDS中で50℃で20分間の2回の洗浄である。しかし、温度や塩濃度などのいくつかの要因が、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を及ぼす場合があり、当業者であれば、必要なストリンジエンシーを達成するための要因を適切に選択することができる。10

【0035】

ハイブリダイゼーションに代えて、遺伝子增幅法（例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法）により、ヒトZNFN3A1タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを、ヒトZNFN3A1タンパク質をコードするDNA（配列番号：1）の配列情報を基に合成されたプライマーを用いて単離することができる。

【0036】

上記のハイブリダイゼーション法または遺伝子增幅法で単離されたDNAにコードされるヒトZNFN3A1タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常ヒトZNFN3A1タンパク質のアミノ酸配列と高い相同意性を有する。「高い相同意性」という表現は、通常40%またはそれ以上の相同意性、好ましくは60%またはそれ以上の相同意性、より好ましくは80%またはそれ以上の相同意性、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同意性を意味する。タンパク質の相同意性は「Wilbur, W.J. および Lipman, D.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80(2), 726-730」に記載されたアルゴリズムで決定することができる。20

【0037】

本発明のタンパク質には、その產生に使用される細胞もしくは宿主または用いられる精製法に応じて、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、または形状に関して変異を有する場合がある。それにもかかわらず、本発明のヒトZNFN3A1タンパク質（配列番号：2）の機能と同等の機能を有する限りは、このようなタンパク質は本発明の範囲内に含まれる。30

【0038】

本発明のタンパク質は、当技術分野で周知の方法により、組換えタンパク質または天然タンパク質として調製することができる。組換えタンパク質は、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：1記載のヌクレオチド配列を含むDNA）を適切な発現ベクターに挿入し、このベクターを適切な宿主細胞に導入し、抽出物を得て、この抽出物に対して、クロマトグラフィー（例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過、または本発明のタンパク質に対する抗体を固定したカラムを用いるアフィニティクロマトグラフィー）を行うことにより、または前述のカラムを複数組み合わせることにより、タンパク質を精製することによって調製することができる。40

【0039】

また、本発明のタンパク質を宿主細胞（例えば動物細胞および大腸菌（E. coli））で、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、または複数のヒスチジンが付加された組換えタンパク質として発現させる場合、発現された組換えタンパク質は、グルタチオンカラムまたはニッケルカラムを用いて精製することができる。

【0040】

融合タンパク質の精製後に、トロンビンまたは第Xa因子で必要に応じて切断することにより、目的のタンパク質以外の領域を除くことができる。50

【 0 0 4 1 】

天然のタンパク質は、当業者に公知の方法、例えば後述するZNFN3A1タンパク質に結合する抗体が結合したアフィニティカラムに、本発明のタンパク質を発現する組織または細胞の抽出物を接触させることにより、単離することができる。これらの抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体でありうる。

【 0 0 4 2 】

本発明は、本発明のタンパク質の部分ペプチドも含む。部分ペプチドは、本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列を有し、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸またはそれ以上、より好ましくは9アミノ酸またはそれ以上を含む。部分ペプチドは、例えば本発明のタンパク質に対する抗体の調製、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング、ならびに本発明のタンパク質の促進物質または阻害物質のスクリーニングに使用することができる。10

【 0 0 4 3 】

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、ペプチド合成の既知の手法、または本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することにより、作製することができる。ペプチド合成には、例えば固相合成法または液相合成法を使用することができる。

【 0 0 4 4 】

単離されたZNFN3A1タンパク質は、ZNFN3A1ヌクレオチド配列のオープンリーディングフレームにコードされる、ジンクフィンガーモチーフを有する推定428アミノ酸のタンパク質を含む。ジンクフィンガードメイン(MYND)はコドン49~87に位置し、SET(Su-3-9、Enhancer-of-zeste、トリソラックス)ドメインはコドン117~246に位置する。以下に詳しく述べるように、ZNFN3A1結合領域はSETドメイン内に位置する。したがってZNFN3A1の部分ペプチドは、好ましくはSETドメインを含む。20

【 0 0 4 5 】

また本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAは、上述のように本発明のタンパク質のインビボまたはインビトロにおける產生に使用することができるか、または本発明のタンパク質をコードする遺伝子における異常に起因する疾患の遺伝子治療に応用することができる。本発明のタンパク質をコードする限り、本発明のDNAの任意の形状を使用することができる。具体的には、mRNAから合成されたcDNA、ゲノムDNA、および化学的に合成されたDNAを使用することができる。本発明のDNAは、結果として得られるDNAが本発明のタンパク質をコードする限り、所与のヌクレオチド配列ならびにその縮重配列を含むDNAを含む。30

【 0 0 4 6 】

本発明のDNAは当業者に公知の方法で調製することができる。例えば本発明のDNAは、本発明のタンパク質を発現する細胞からcDNAライブラリーを調製し、本発明のDNA(例えば配列番号:1)の部分配列をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うことにより、調製することができる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook J.ら、「Molecular Cloning」、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)に記載された方法により調製することができるほか、市販のcDNAライブラリーを使用することができる。cDNAライブラリーは、本発明のタンパク質を発現する細胞からRNAを抽出し、本発明のDNAの配列(例えば配列番号:1)を基にオリゴDNAを合成し、このオリゴをプライマーとして用いてPCRを行い、本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅することにより、調製することもできる。40

【 0 0 4 7 】

さらに、得られたcDNAのヌクレオチドの配列を決定することによって、cDNAにコードされる翻訳領域を通常の手段で決定することができ、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を容易に入手することができる。また、得られたcDNAをプローブとして用いて、ゲノムDNAライブラリーのスクリーニングを行うことにより、ゲノムDNAを単離することができる。

【 0 0 4 8 】

さらに具体的には、最初にmRNAを、本発明のタンパク質が発現している細胞、組織、ま50

たは器官（例えば卵巣、精巣、胎盤など）から調製する。mRNAの単離には公知の方法を用いることができる。例えば、全RNAをグアニジン超遠心法（Chirgwin J.M.ら、*Biochemistry* 18 : 5294-5299 (1979)）、またはAGPC法（Chomczynski P.およびSacchi N.、*Anal. Biochem.* 162 : 156-159 (1987)）により調製することができる。さらにmRNAを全RNAから、mRNA精製キット（Pharmacia）などを用いて精製することができるほか、mRNAをQuickPrep mRNA精製キット（Pharmacia）を用いて直接精製することができる。

【0049】

このようにして得られたmRNAを基に、逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAは、AMV逆転写酵素第一鎖cDNA合成キット（生化学工業）などの市販のキットにより合成することができる。またはcDNAを、本明細書に記載されたプライマーなどを用いる5'-RACE法（Frohman M.A.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 : 8998-9002 (1988)；Belyavsky A.ら、*Nucleic Acids Res.* 17 : 2919-2932 (1989)）、5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech）、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、合成および増幅することができる。10

【0050】

所望のDNA断片をPCR産物から調製し、ベクターDNAにライゲーションする。このような組換えベクターを用いて大腸菌（*E. coli*）などを形質転換し、所望の組換えベクターを、選択されたコロニーから調製する。所望のDNAのヌクレオチド配列は、ジデオキシヌクレオチド鎖停止法などの従来の方法で確認することができる。

【0051】

本発明のDNAのヌクレオチド配列は、発現に使用される宿主におけるコドンの使用頻度を考慮することで、より効率的に発現されるように設計することができる（Grantham R.ら、*Nucleic Acids Res.* 9 : 43-74 (1981)）。本発明のDNAは、市販のキットまたは従来の方法により変化させることができる。例えば本発明のDNAは、制限酵素による切断、合成オリゴヌクレオチドもしくは適切なDNA断片の挿入、リンカーの付加、または開始コドン（ATG）および/または停止コドン（TAA、TGA、またはTAG）の挿入によって変化させることができる。20

【0052】

具体的には本発明のDNAは、配列番号：2のコドン49～87に位置するジンクフィンガードメイン、および配列番号：2のコドン117～246に位置するDETドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、DNAを含む。30

【0053】

さらに本発明は、配列番号：1のヌクレオチド配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、上述の本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを提供する。当業者であれば、ストリンジェントな条件を適切に選択することができる。例えば低ストリンジェント条件を使用することができる。より好ましくは、高ストリンジェントな条件を使用することができる。これらの条件は上述の条件と同じである。上述のハイブリダイズするDNAは、好ましくはcDNAまたは染色体DNAである。

【0054】

本発明は、本発明のDNAを挿入するベクターも提供する。本発明のベクターは、本発明のDNAを宿主細胞内に維持するため、または本発明のタンパク質を発現させるために有用である。40

【0055】

大腸菌（*E. coli*）が宿主細胞であり、ベクターを大腸菌（*E. coli*）（例えばJM109、DH5⁺、HB101、またはXL1Blue）内で増幅して大量に作製する場合、ベクターは、大腸菌（*E. coli*）中で増幅するための「複製起点（ori）」、および形質転換された大腸菌（*E. coli*）を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの薬剤によって選択される薬剤耐性遺伝子）をもつ必要がある。例えばM13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどを使用することができる。さらに、pGEM-T、pDIRECT、およびpT7⁺、cDNAならびに上述のベクターのサブクローニングおよび抽出に使用することができる。ベクターを本發50

明のタンパク質の作製に使用する場合は、発現ベクターが特に有用である。例えば大腸菌 (*E. coli*) で発現させる発現ベクターは、大腸菌 (*E. coli*) で増幅するために上記の特徴を有する必要がある。JM109、DH5[®]、HB101、またはXL1Blueなどの大腸菌 (*E. coli*) を宿主細胞として使用する場合、ベクターは、大腸菌 (*E. coli*) で所望の遺伝子を効率的に発現することができるプロモーター（例えばlacZプロモーター（Wardら、Nature (1989)、341、544-546；FASEB J (1992) 6、2422-2427）、araBプロモーター（Betterら、Science (1988)、240、1041-1043）、またはT7プロモーターなど）を含む必要がある。この点に関して、例えばpGEX-5X-1 (Pharmacia)、「QIAexpressシステム」(Qiagen)、pEGFP、およびpET（この場合、宿主は好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21）を上記ベクターの代わりに使用することができる。

10

【0056】

さらにベクターは、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列を含む場合もある。タンパク質を大腸菌 (*E. coli*) の周辺質に分泌させる例示的なシグナル配列は、peIBシグナル配列 (Lei, S.P.ら、J. Bacteriol. (1987)、169、4379) である。このようなベクターを標的宿主細胞に導入する手法には、例えば塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法などがある。

【0057】

大腸菌 (*E. coli*) に加えて、例えば哺乳類由来の発現ベクター（例えばpcDNA3 (Invitrogen)、およびpEGF-BOS (Nucleic Acids Res. 1990、18 (17)、p5322)、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BACバキュロウイルス発現システム」(GIBCO BRL)、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1やpMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えばpHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えばpZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば「ピキア発現キット」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01）、ならびに枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の発現ベクター（例えばpPL608やpKTH50）を、本発明のタンパク質の産生に使用することができる。

20

【0058】

ベクターをCHO細胞、COS細胞、またはNIH3T3細胞などの動物細胞で発現させるためには、ベクターは、このような細胞における発現に必要なプロモーター（例えばSV40プロモーター (Mulliganら、Nature (1979)、277、108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 プロモーター (Mizushimaら、Nucleic Acids Res. (1990)、18、5322)、CMVプロモーターなど）、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子（例えば薬剤（例えばネオマイシンやG418）によって選択される薬剤耐性遺伝子）を有する必要がある。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えばpMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13などがある。

30

【0059】

さらに、細胞内で遺伝子を安定に発現させると同時に遺伝子のコピー数を増やすための方法を使用することができる。例えば、相補的なDHFR遺伝子を含むベクター（例えばpCHO-I）を、核酸合成経路が除去されたCHO細胞に導入し、メトトレキセート (MTX) により増幅することができる。また、遺伝子を一過的に発現させる場合は、SV40の複製起点を含むベクター (pcDなど) により、染色体上にSV40T抗原発現遺伝子を含むCOS細胞を形質転換する方法を使用することができる。

40

【0060】

上記で得られる本発明のタンパク質は、宿主細胞の内部または外部（培地など）から単離して、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。所与のポリペプチドについて、本明細書で用いる「実質的に純粋な」という表現は、ポリペプチドが他の生物学的高分子を実質的に含まないことを意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、乾燥重量で少なくとも75%（例えば少なくとも80%、85%、95%、または99%）純粋である。純度は、任意の適切な標準的な方法（例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC解析）により測定することができる。タンパク質を単離および精製する方法は、いかなる特定の方法にも制限されず、実際には任意の標準的な方

50

法を使用することができる。

【0061】

例えはカラムクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析法、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、および再結晶を適切に選択して組み合わせることで、対象タンパク質を単離および精製することができる。

【0062】

クロマトグラフィーの例には、例えはアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどがある (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLCなどの液体クロマトグラフィーによって実施することができる。したがって本発明は、上記の方法で調製された高度に精製されたタンパク質を提供する。

10

【0063】

本発明のタンパク質は、適切なタンパク質修飾酵素で精製前後に処理することにより、選択的に修飾するか、または部分的に欠失させることができる。有用なタンパク質修飾酵素には、トリプシン、キモトリプシン、リシリエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどがあるが、これらに限定されない。

【0064】

20

本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形状で使用することが可能であり、ウサギなどの動物を本発明のタンパク質を用いて免疫化することにより得られる、抗血清、全てのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えにより作製されたヒト化抗体を含む。

【0065】

抗体を得るために抗原として使用される本発明のタンパク質は、任意の動物種に由来しうるが、好ましくはヒト、マウス、またはラットなどの哺乳類に由来し、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から得られる。

30

【0066】

本発明によれば、免疫化抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質またはその部分ペプチドでありうる。部分ペプチドは、例えは本発明のタンパク質のアミノ(N)末端断片またはカルボキシ(C)末端断片を含みうる。本明細書では、抗体は、本発明のタンパク質の全長または断片のいずれかと反応するタンパク質と定義される。

【0067】

本発明のタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を、公知の発現ベクターに挿入した後に、宿主細胞を本明細書に記載のように形質転換するために使用することができる。所望のタンパク質、またはその断片は、宿主細胞の内外から任意の標準的な方法により回収することができ、またその後、抗原として使用することができる。または、タンパク質もしくはその溶解物、または化学的に合成されたタンパク質を発現する細胞全体を、抗原として使用することができる。

40

【0068】

任意の哺乳動物をこの抗原で免疫化することができるが、好ましくは、細胞融合に用いる親細胞との適合性を考慮に入れる。一般に、げっ歯類、ウサギ目、または靈長類の動物を使用する。

【0069】

げっ歯類の動物には、例えはマウス、ラット、およびハムスターなどが含まれる。ウサギ目の動物には、例えはウサギが含まれる。靈長類の動物には、例えはカニクイザル (Macaca fascicularis)、アカゲザル、マントヒヒ (sacred baboon)、およびチンパンジー

50

などの狭鼻猿類のサル（旧世界ザル）が含まれる。

【0070】

動物を抗原で免疫化する方法は当技術分野で公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳類を免疫化する標準的な方法である。具体的には、抗原は適量のリン酸緩衝食塩水（PBS）や生理食塩水などで希釈および懸濁することができる。所望ならば、抗原懸濁物を、フロイント完全アジュvantなどの適量の標準的なアジュvantと混合し、乳濁液にした後、哺乳動物に投与することができる。好ましくは、これに続いて、適量のフロイント不完全アジュvantと混合した抗原を、4～21日毎に複数回投与する。適切な抗体を免疫化に使用することもできる。上記のように免疫化を行った後に、所望の抗体量の増加に関して、標準的な方法で血清を調べる。

10

【0071】

本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、血清中の所望の抗体の増加を調べた免疫化した哺乳類から血液を回収することにより、および任意の従来の方法で血清を血液から分離することにより、調製することができる。ポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体を含む血清、ならびに血清から単離可能なポリクローナル抗体を含む画分を含む。免疫グロブリンGまたはMは、本発明のタンパク質のみを認識する画分から、例えば本発明のタンパク質を結合させたアフィニティカラムを用いて、この画分をプロテインAまたはプロテインGのカラムでさらに精製することにより、調製することができる。

【0072】

モノクローナル抗体を調製するため、抗原で免疫化した哺乳類から免疫細胞を回収し、上述のように血清中の所望の抗体レベルの増加を調べ、細胞融合に使用する。細胞融合に使用する免疫細胞は、好ましくは脾臓から得られる。上記の免疫細胞と融合される他の好ましい親細胞には、例えば哺乳類のミエローマ細胞、およびより好ましくは、薬剤によって融合細胞を選択するための性質を獲得したミエローマ細胞などが含まれる。

20

【0073】

上記の免疫細胞およびミエローマ細胞は、公知の方法、例えばMilsteinらの方法に従って融合することができる（Galfre, G. および Milstein, C., Methods. Enzymol. (1981) 73, 3-46）。

【0074】

細胞融合によって得られるハイブリドーマを、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジンを含む培地）などの標準的な選択培地で培養することにより、選択することができる。細胞培養は通常、HAT培地中で数日から数週間、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞（融合していない細胞）を死滅させるのに十分な期間、継続する。次に、標準的な限界希釈を行い、所望の抗体を產生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングおよびクローニングを行う。

30

【0075】

ハイブリドーマを調製するための抗原で非ヒト動物を免疫化する上記の方法に加えて、EBウイルスに感染させた細胞などのヒトリンパ球を、タンパク質、タンパク質発現細胞、またはこれらの溶解物を用いてインビトロで免疫化することができる。次に、免疫化されたリンパ球を、無制限に分裂可能なヒト由来のミエローマ細胞（U266など）と融合させることにより、タンパク質に結合可能な所望のヒト抗体を产生するハイブリドーマが得られる（特開昭63-17688号）。

40

【0076】

得られたハイブリドーマを、続いてマウスの腹腔に移植して腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のタンパク質を結合させたアフィニティカラムによって精製することができる。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製および検出だけでなく、本発明のタンパク質の作用物質および拮抗物質の候補として使用することもできる。また、この抗体を、本発明のタンパク質に関連する疾患の抗体療法に応用することができる。得られた抗体をヒトの身体に投与する場合（抗体療法

50

)は、ヒト抗体またはヒト化抗体は免疫原性を低下させるために好ましい。

【0077】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を、タンパク質、タンパク質発現細胞、またはこれらの溶解物から選択される抗原で免疫化することができる。次に抗体産生細胞を動物から回収し、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを得て、このハイブリドーマからタンパク質に対するヒト抗体を調製することができる（国際公開公報第92-03918号、国際公開公報第93-2227号、国際公開公報第94-02602号、国際公開公報第94-25585号、国際公開公報第96-33735号、および国際公開公報第96-34096号を参照）。

【0078】

または、抗体を產生する免疫化されたリンパ球などの免疫細胞を、癌遺伝子によって不死化して、モノクローナル抗体の調製に使用することができる。

【0079】

このようにして得られたモノクローナル抗体は、遺伝子工学的手法を用いて組換え的に調製することもできる（例えば、Borrebaeck, C.A.K. および Larrick, J.W.、*Therapeutic Monoclonal Antibodies*、MacMillan Publishers社（英国、1990）を参照）。例えば抗体をコードするDNAを、ハイブリドーマまたは抗体を产生する免疫化されたリンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入し、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。本発明は、上述のように調製された組換え抗体も提供する。

【0080】

さらに本発明の抗体は、本発明の1つもしくは複数のタンパク質に結合する限り、抗体または修飾抗体の断片でありうる。例えば、抗体断片はFab、F(ab')₂、Fv、または1本鎖Fv(scFv)であってよく、ここでscFvは、H鎖およびL鎖に由来するFv断片が適切なリンクでライゲーションされている（Huston, J.S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 5879-5883 (1988)）。具体的には、抗体断片は、抗体をパパインやペプシンなどの酵素で処理することにより作製することができる。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞内で発現させることができる（例えばCo, M.S.ら、J. Immunol. 152 : 2968-2976 (1994)；Better, M. および Horwitz, A.H.、Methods. Enzymol. 178 : 476-496 (1989)；Pluckthun, A. および Skerra, A.、Methods. Enzymol. 178 : 497-515 (1989)；Lamoyi, E.、Methods. Enzymol. 121 : 652-663 (1986)；Rousseaux, J.ら、Methods. Enzymol. 121 : 663-669 (1986)；Bird, R.E. および Walker, B.W.、Trends Biotechnol. 9 : 132-137 (1991) を参照）。

【0081】

抗体は、ポリエチレンギリコール(PEG)などの様々な分子との結合によって修飾することができる。本発明は、このような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することにより得られる。このような修飾法は当技術分野で常套的なものである。

【0082】

または本発明の抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とのキメラ抗体として、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)、および定常領域を含むヒト化抗体として得られる。このような抗体は、公知の手法で調製することができる。

【0083】

上述のように得られた抗体を均一になるまで精製することができる。例えば、抗体の分離および精製は、一般的なタンパク質に関して用いられる分離法および精製法に従って実施することができる。例えば抗体は、アフィニティクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動などを含むがこれらに限定されないカラムクロマトグラフィーを、適切に選択し組み合わせることによって、分離および単離することができる（「Antibodies : A Laboratory Manual」、HarlowおよびDavid Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory、1988）。

【0084】

10

20

30

40

50

プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティカラムとして使用することができる。使用される例示的なプロテインAカラムには、例えばHyper D、POROS、およびSephadex G-25 (Pharmacia) が含まれる。

【 0 0 8 5 】

例示的なクロマトグラフィー（アフィニティクロマトグラフィーを除く）には、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル滌過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどがある（「Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual」、Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1996）。クロマトグラフィーの手順は、HPLCやFPLCなどの液相クロマトグラフィーにより実施することができる。10

【 0 0 8 6 】

例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着アッセイ法（ELISA）、酵素免疫アッセイ法（EIA）、放射免疫アッセイ法（RIA）、および/または免疫蛍光法を用いて、本発明の抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISAでは、本発明の抗体をプレート上に固定し、本発明のタンパク質をプレート上に添加した後に、抗体産生細胞の培養上清または精製抗体などの所望の抗体を含む試料を添加する。次に、一次抗体を認識しアルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。続いて洗浄後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。タンパク質の断片（C末端またはN末端の断片など）をタンパク質として使用することができる。BIAcore (Pharmacia) を用いて、本発明に係る抗体の活性を評価することができる。20

【 0 0 8 7 】

上記の方法によって、本発明の抗体を本発明のタンパク質を含むと考えられる試料に曝し、この抗体とタンパク質により形成された免疫複合体を検出または測定することにより、本発明のタンパク質の検出または測定が可能となる。

【 0 0 8 8 】

本発明に係るタンパク質を検出または測定する方法は、タンパク質を特異的に検出または測定することができるため、この方法は、タンパク質を使用する様々な実験に有用でありうる。

【 0 0 8 9 】

本発明は、ヒトZNFN3A1タンパク質をコードするDNA（配列番号：1）またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも提供する。本発明のポリヌクレオチドは好ましくは、本発明のタンパク質をコードするDNAと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。本明細書で用いる「特異的にハイブリダイズする」という表現は、通常のハイブリダイゼーション条件下で、好ましくはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとの間に交差ハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなポリヌクレオチドには、本発明のタンパク質をコードするDNAまたはその相補鎖と特異的にハイブリダイズする、プローブ、プライマー、ヌクレオチド、およびヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイム）などがある。さらに、このようなポリヌクレオチドはDNAチップの作製に使用することができる。3040

【 0 0 9 0 】

本発明は、配列番号：1のヌクレオチド配列内の任意の部位とハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは好ましくは、配列番号：1記載のヌクレオチド配列の連続する少なくとも15のヌクレオチドに対するものである。上述の連続する少なくとも15のヌクレオチド中に開始コドンを含む、上述のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、さらにより好ましい。

【 0 0 9 1 】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体または修飾産物をアンチセンスオリゴヌクレオチドとして使用することができる。このような修飾産物の例には、メチルホスホネート50

型、またはエチルホスホネート型、ホスホロチオエート修飾、およびホスホロアミデート修飾などの低アルキルホスホネート修飾が含まれる。

【0092】

本明細書で用いる「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という表現は、DNAまたはmRNAの特定の領域を含むヌクレオチドに対応するヌクレオチドが、完全に相補的であるものだけでなく、DNAまたはmRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号：1記載のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズする限りは、1つまたは複数のヌクレオチドのミスマッチを有するものも意味する。

【0093】

このようなポリヌクレオチドは、「連続する少なくとも15のヌクレオチド配列領域」中に、少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは80%またはそれ以上、より好ましくは90%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同性を有するものとして含まれる。本明細書に記載されたアルゴリズムを用いて相同性を決定することができる。このようなポリヌクレオチドは、下記の実施例に記載されているように本発明のタンパク質をコードするDNAを単離または検出するためのプローブとして、または増幅用のプライマーとして有用である。

10

【0094】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のタンパク質をコードするDNAまたはmRNAに結合し、その転写または翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、かつ本発明のタンパク質の発現を阻害することにより、本発明のタンパク質を産生する細胞に作用し、結果としてタンパク質の機能を阻害する。

20

【0095】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、この誘導体に対して不活性な適切な基材と混合することにより、塗布剤またはパップ剤などの外用剤に使用することができる。

【0096】

また必要に応じて、このような誘導体を、賦形剤、等張剤、可溶化剤、安定剤、保存剤、鎮痛剤などを添加することにより、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻薬、および凍結乾燥剤に製剤化することができる。これらは以下の通常の方法で調製することができる。

30

【0097】

アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を、患部に直接塗布するか、または血管内に注射することにより、患部に到達するように患者に投与する。アンチセンスを含む溶媒を使用することで、持続性および膜透過性を高めることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リシン、脂質、コレステロール、リポフェクチン、またはこれらの誘導体などがある。

【0098】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の用量を、患者の状態にしたがって適切に調整し、所望の量で使用することができる。例えば0.1 mg/kg ~ 100 mg/kg、好ましくは0.1 mg/kg ~ 50 mg/kgの用量範囲で投与することができる。

40

【0099】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明のタンパク質の発現を阻害するため、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制するために有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む発現抑制物質は、本発明のタンパク質の生物学的活性を阻害できる点で有用である。

【0100】

さらに本発明は、本発明のタンパク質に結合する化合物を、本発明のタンパク質を用いてスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング法は以下の段階を含む：(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを対象試料に接触させる段階；(b) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドと対象試料との結合活性を検出する段階；および

50

(c) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する段階。

【0101】

スクリーニングに使用される本発明のタンパク質は、組換えタンパク質もしくは天然由来のタンパク質、またはこれらの部分ペプチドでありうる。任意の対象試料（例えば細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物の産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または未精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成微小分子化合物、および天然化合物）を使用することができる。対象試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製タンパク質、可溶性タンパク質、担体に結合した形状、または他のタンパク質と融合した融合タンパク質でありうる。

【0102】

例えば、本発明のタンパク質に結合するタンパク質を、本発明のタンパク質を用いてスクリーニングする方法として、当業者に周知の多くの方法を使用することができる。このようなスクリーニングは、例えば免疫沈降法によって、具体的には以下の手順で実施することができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子は、pSV2neo、pcDNA1、およびpCD8などの外来遺伝子用の発現ベクターに挿入することで、動物細胞などにおいて発現させる。発現に使用されるプロモーターは一般に使用可能な任意のプロモーターであってよく、例えばSV40の初期プロモーター（Rigby in Williamson編、「Genetic Engineering」、第3巻、Academic Press、London、p.83-141（1982））、EF-1 プロモーター（Kimら、Gene、91、p217-223（1990））、CAGプロモーター（Niwaら、Gene、108、p.193-200（1991））、RSV LTRプロモーター（Cullen Methods in Enzymology、152、p.684-704（1987））、SR プロモーター（Takebeら、Mol. Cell. Biol.、8、p.466（1988））、CMV最初期プロモーター（SeedおよびAruffo、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84、p.3365-3369（1987））、SV40後期プロモーター（GheysenおよびFiers、J. Mol. Appl. Genet.、1、p.385-394（1982））、アデノウイルス後期プロモーター（Kaufmanら、Mol. Cell. Biol.、9、p.946（1989））、HSV TKプロモーターなどが含まれる。外来遺伝子を発現させるための、動物細胞への遺伝子の導入は、任意の方法（例えばエレクトロポレーション法（Chu G.ら、Nucl. Acids Res.、15、1311-1326（1987））、リン酸カルシウム法（Chen, CおよびOkayama, H.、Mol. Cell. Biol.、7、2745-2752（1987））、DEAEデキストラン法（Lopata, M.A.ら、Nucl. Acids Res.、12、5707-5717（1984））、Sussman, D.J.およびMilman, G.、Mol. Cell. Biol.、4、1642-1643（1985））、リポフェクチン法（Derijard, B.、Cell、7、1025-1037（1994）；Lamb, B.T.ら、Nature Genetics、5、22-30（1993）；Rabindran, S.K.ら、Science、259、230～234（1993））など）に従って実施することができる。本発明のタンパク質は、特異性が判明しているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）を本発明のタンパク質のN末端またはC末端に挿入することによって、モノクローナル抗体のエピトープを含む融合タンパク質として発現させることができる。市販のエピトープ-抗体系を使用することができる（Experimental Medicine、13、85-90（1995））。マルチクローニングサイトを利用して、例えば -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）などとの融合タンパク質を発現可能なベクターが市販されている。

【0103】

融合によって本発明のタンパク質の性質が変化しないように、数個～12個のアミノ酸を含む低分子量エピトープのみを導入することにより調製された融合タンパク質についても報告されている。ポリヒスチジン（Hisタグ）、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質（VSV-GP）、T7遺伝子10タンパク質（T7タグ）、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質（HSVタグ）、Eタグ（モノクローナルファージ上のエピトープ）などのエピトープ、ならびにこれらを認識するモノクローナル抗体を、本発明のタンパク質に結合するタンパク質をスクリーニングするためのエピトープ-抗体系として使用することができる（Experimental Medicine 13、85-90（1995））。

【0104】

免疫沈降法では、これらの抗体を、適切な界面活性剤を用いて調製された細胞溶解物に

10

20

30

40

50

添加することによって免疫複合体が形成される。この免疫複合体は、本発明のタンパク質、このタンパク質との結合能力を含むタンパク質、ならびに抗体からなる。免疫沈降法は、上記エピトープに対する抗体を使用するほかに、本発明のタンパク質に対する抗体を用いて実施することもできる。本発明のタンパク質に対する抗体は例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を適切な大腸菌 (*E. coli*) 発現ベクターに導入し、遺伝子を大腸菌 (*E. coli*) で発現させ、発現タンパク質を精製し、このタンパク質に対してウサギ、マウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどを免疫化することによって調製することができる。このような抗体は、本発明のタンパク質の合成部分ペプチドに対して上記の動物を免疫化することで調製することもできる。

【0105】

10

免疫複合体は、抗体がマウス IgG 抗体の場合、例えばプロテインAセファロースまたはプロテインGセファロースによって沈殿させることができる。本発明のタンパク質を、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製する場合は、本発明のタンパク質に対する抗体を使用する場合と同様に、グルタチオン-セファロース4Bなどのエピトープに特異的に結合する物質を用いることにより、免疫複合体を形成することができる。

【0106】

免疫沈降法は、例えば文献に記載の方法 (Harlow, E. および Lane, D. 「Antibodies」、pp.511-552、Cold Spring Harbor Laboratory publications、New York (1988)) にしたがって実施することができる。

【0107】

20

SDS-PAGEは、免疫沈降したタンパク質の解析に通常使用されており、結合しているタンパク質を、適切な濃度のゲルを用いてタンパク質の分子量により解析することができる。本発明のタンパク質に結合しているタンパク質は、クーマシー染色または銀染色などの一般的な染色法では検出が難しいため、タンパク質の検出感度は、放射性同位元素 (³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システイン) を含む培地で細胞を培養し、細胞中のタンパク質を標識して、タンパク質を検出することにより改善することができる。タンパク質の分子量が明らかであれば、標的タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲルから直接精製することが可能であり、その配列を決定することができる。

【0108】

30

本発明のタンパク質に結合するタンパク質を、このタンパク質を用いて単離する方法として、例えばウェスト-ウェスタンプロットティング解析 (Skolnik, E.Y. ら、Cell (1991) 65、83-90) を使用することができる。具体的には、本発明のタンパク質に結合するタンパク質は、本発明のタンパク質に結合するタンパク質を発現すると予想される細胞、組織、器官 (例えば卵巣、精巣、および胎盤などの組織、または培養細胞) から、ファージベクター (例えばZAP) を用いてcDNAライブラリーを調製し、LBアガロース上でタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質をフィルター上に固定し、本発明の精製および標識したタンパク質を上記のフィルターと反応させ、本発明のタンパク質と結合しているタンパク質を発現するブラークを標識によって検出することで得られる。本発明のタンパク質は、ビオチンとアビジンとの結合を利用するか、または本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体、もしくは本発明のタンパク質に融合させたペプチドもしくはポリペプチド (例えばGST) を利用することにより、標識することができる。放射性同位元素または蛍光などを用いる方法を使用することもできる。

40

【0109】

または本発明のスクリーニング法の別の態様では、細胞を利用するツーハイブリッド系 (「MATCHMAKERツーハイブリッドシステム」、「哺乳類MATCHMAKERツーハイブリッドアッセイキット」、「MATCHMAKERワンハイブリッドシステム」(Clontech) ; 「HybriZAPツーハイブリッドベクターシステム」(Stratagene) を使用することができる (「Dalton, S. および Treisman, R. (1992) Cell 68, 597-612」、「Fields, S. および Sternglanz, R.、Trends Genet. (1994) 10 : 286-292」を参照)。

【0110】

50

ツーハイブリッド系では、本発明のタンパク質を、SRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて酵母細胞内で発現させる。本発明のタンパク質に結合するタンパク質を発現すると予想される細胞から、発現時にVP16またはGAL4転写活性化領域と融合するようなcDNAライブラリーを調製する。次にcDNAライブラリーを上記の酵母細胞に導入し、このライブラリーに由来するcDNAを、検出された陽性クローニングから単離する（本発明のタンパク質に結合するタンパク質は酵母細胞内で発現され、これら2つの分子の結合がレポーター遺伝子を活性化し、陽性クローニングが検出可能となる）。cDNAにコードされるタンパク質は、上記のように単離されたcDNAを大腸菌（*E. coli*）に導入し、このタンパク質を発現させることによって調製することができる。

【0111】

10

レポーター遺伝子として、HIS3遺伝子に加えて、例えばAde2遺伝子、lacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などを使用することができる。

【0112】

本発明のタンパク質に結合する化合物を、アフィニティクロマトグラフィーを用いてスクリーニングすることができる。例えば本発明のタンパク質は、アフィニティカラム上の担体に固定することができ、発現されると考えられる本発明のタンパク質に結合可能なタンパク質を含む被験試料をカラムに添加する。本明細書における被験試料は、例えば細胞抽出物や細胞溶解物などの場合がある。被験試料のローディング後にカラムを洗浄し、本発明のタンパク質に結合しているタンパク質を調製することができる。

【0113】

20

得られたタンパク質のアミノ酸配列を解析し、その配列を基にオリゴDNAを合成し、このオリゴDNAをプローブとして用いてcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、このタンパク質をコードするDNAを得る。

【0114】

表面プラズモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを、本発明における結合状態の化合物を検出または定量する手段として使用することができる。このようなバイオセンサーを使用する場合、本発明のタンパク質と被験化合物との相互作用を、標識せずに微量のタンパク質のみを用いて（例えばBIAcore、Pharmacia）、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムで観察することができる。したがって、BIAcoreなどのバイオセンサーを用いて、本発明のタンパク質と被験化合物との結合を評価することができる。

30

【0115】

本発明の固定化されたタンパク質を、合成化合物、もしくは天然物質バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーに曝露する場合に結合する分子をスクリーニングする方法、またはコンビナトリアル化学技術に基づくハイスループット（Wrighton Nc、Farrel FX、Chang R、Kashyap AK、Barbone FP、Mulcahy LS、Johnson DL、Barret RW、Jolliffe LK、Dower WJ、「Small peptide as potent mimetics of the protein in hormone erythropoietin」、Science（米国）Jul 26 1996、273 p458-64；Verdine GL、「The combinatorial chemistry of nature」、Nature（英国）Nov 7 1996、384、p11-13；Hogan JC Jr.、「Directed combinatorial chemistry」Nature（英国）Nov 7 1996、384 p17-9）を用いてスクリーニングする方法により、タンパク質だけでなく、当技術分野で周知の本発明のタンパク質に結合する化合物（作用物質および拮抗物質を含む）を単離することができる。

40

【0116】

スクリーニングで単離された化合物は、例えば癌などの細胞増殖性疾患に起因する疾患を治療または予防するため、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する薬剤の候補である。本発明のタンパク質への結合活性を有する、本発明のスクリーニング法で得られる化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換される化合物は、本発明のスクリーニング法で得られる化合物に含まれる。

【0117】

さらに本発明は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物をスクリー

50

ングする方法を提供する。本発明のZNFN3A1タンパク質は細胞増殖を促進する活性を有するため、本発明のZNFN3A1タンパク質のこの活性を促進または阻害する化合物は、この活性を指標としてスクリーニングすることができる。

【0118】

このスクリーニング法は以下の段階を含む：(a) 対象試料の存在下でZNFN3A1タンパク質を発現する細胞を培養する段階；(b) 細胞の増殖を検出する段階；および(c) 対象試料の非存在下で検出される増殖と比較して、増殖を促進または阻害する化合物を選択する段階。ZNFN3A1の発現および/または活性を阻害する化合物は抗癌剤として有用である。

【0119】

任意のZNFN3A1タンパク質を、これらが細胞増殖を阻害する活性を含む限りは、スクリーニングに使用することができる。例えば、ヒトのZNFN3A1タンパク質を用いることができ、これらのタンパク質と機能的に同等なタンパク質を使用することもできる。ZNFN3A1タンパク質は、細胞に内因的または外因的に発現させることができる。

【0120】

任意の対象試料（例えば細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物の産物、海洋生物の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質もしくは未精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成微小分子化合物、天然化合物）を使用することができる。本発明のタンパク質に結合する化合物についての上記のスクリーニングにより得られた化合物を、被験化合物として使用することもできる。

【0121】

このスクリーニングによって単離された化合物は、本発明のタンパク質の作用物質または拮抗物質の候補となる。「作用物質」という表現は、本発明のタンパク質に結合することで、このタンパク質の機能を活性化する分子を意味する。同様に「拮抗物質」という表現は、本発明のタンパク質に結合することで、このタンパク質の機能を阻害する分子を意味する。またスクリーニングで単離された化合物は、本発明のタンパク質と分子（DNAおよびタンパク質を含む）とのインビボにおける相互作用を阻害する化合物の候補となる。

【0122】

細胞増殖は、例えば細胞増殖の速度を決定することや、細胞周期を測定することなど、ならびに実施例に記載されているようにコロニー形成活性を測定することによって検出することができる。

【0123】

スクリーニングによって単離された化合物は、本発明のタンパク質の活性を阻害する薬剤の候補であり、本発明のタンパク質に関連する疾患（例えば癌、特に肝細胞癌）の治療に応用することができる。

【0124】

さらに、ZNFN3A1タンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換される化合物も、本発明のスクリーニング法で得られる化合物に含まれる。

【0125】

本発明の方法で単離された化合物を、ヒトおよび他の哺乳類（マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、チンパンジーなど）に対する薬剤として投与する際には、単離された化合物を直接投与することができるほか、公知の薬学的調製法を用いて投与剤型に製剤化することができる。例えば必要に応じて、このような薬剤を糖衣錠剤、カプセル剤、エリキシル、およびマイクロカプセル剤として経口摂取することができるほか、水または他の任意の薬学的に許容される液体との無菌性溶液もしくは懸濁液の注射液の形状で非経口的に摂取することができる。例えば、このような化合物は、薬学的に許容される担体または溶媒、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、溶剤、保存剤、結合剤などと共に、一般に容認された薬剤使用に必要な単位用量中に混合することができる。このような調製物中の活性成分の量は、獲得可能な所定の範囲内の適切な用量となる

10

20

30

40

50

。

【0126】

錠剤およびカプセル剤に混合可能な添加物の例は、結合剤（ゼラチン、コーンスターーチ、トラガカントガム、およびアラビアゴムなど）；賦形剤（結晶性セルロースなど）；膨張剤（コーンスターーチ、ゼラチン、およびアルギン酸など）；潤滑剤（ステアリン酸マグネシウムなど）；甘味剤（ショ糖、乳糖、またはサッカリン）；香味剤（ペパーミント、アカモノ（Gaultheria adenothrix）オイル、およびサクラなど）である。単位投与剤型がカプセルの場合、液状担体（オイルなど）も上記成分中にさらに含めることができる。注射用の無菌性成分を、通常の薬剤使用にしたがって、注射用滅菌水などの溶剤を用いて製剤化することができる。

10

【0127】

生理食塩水、グルコース、およびアジュvant（D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウムなど）を含む他の等張性溶液を、注射用水溶液として使用することができる。これらは、アルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール（例えばプロピレングリコールやポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート80（商標）やHCO-50）などの適切な可溶化剤とともに使用することができる。

【0128】

ゴマ油またはダイズ油を油性溶液として使用することができ、可溶化剤として安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールとともに使用することができ、また緩衝液（リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液など）；鎮痛薬（塩酸プロカインなど）；安定剤（ベンジルアルコール、フェノールなど）；ならびに抗酸化剤を用いて製剤化することができる。調製した注射液は適切なアンプルに充填することができる。

20

【0129】

当業者に周知の方法を用いて、本発明の薬学的化合物を、例えば動脈内注射、静脈内注射、経皮内注射として、また鼻腔内投与、経気管支投与、筋肉内投与、または経口投与として患者に投与することができる。用量および投与方法は、患者の体重および年齢ならびに投与方法に応じて変化するが、当業者であればこれらを慣例的に選択することができる。この化合物がDNAによってコード可能である場合、このDNAを遺伝子治療用のベクターに挿入し、ベクターを治療のために投与することができる。用量および投与方法は、患者の体重、年齢、および症状に応じて変化するが、当業者であればこれらを適切に選択することができる。

30

【0130】

例えば、症状によってある程度の差があるものの、本発明のタンパク質に結合し、この活性を調節する化合物の用量は、正常な成人（体重60 kg）に経口投与する場合、約0.1 mg～約100 mg/日、好ましくは約1.0 mg～約50 mg/日、より好ましくは約1.0 mg～約20 mg/日である。

【0131】

注射液の形状で正常な成人（体重60 kg）に非経口的に投与する場合は、患者、標的器官、症状、および投与方法によってある程度の差はあるものの、約0.01 mg～約30 mg/日、好ましくは約0.1 mg/日～約20 mg/日、またより好ましくは約0.1 mg/日～約10 mg/日の用量を静脈内に注射することが好都合である。また他の動物の場合でも、60 kgの体重に変換した量を投与することが可能である。

40

【0132】

また本発明は、ZNFN3A1遺伝子を診断マーカーとして用いて癌を診断する方法を提供する。この診断法は以下の段階を含む：

- (a) 検体の生物試料中におけるZNFN3A1遺伝子の発現レベルを決定する段階；
- (b) ZNFN3A1遺伝子の発現レベルを、正常試料における発現レベルと比較する段階；ならびに
- (c) 試料中におけるZNFN3A1遺伝子の高い発現レベルを癌の保有として規定する段階。

50

【 0 1 3 3 】

特定の検体中におけるZNFN3A1遺伝子の発現レベルは、ZNFN3A1遺伝子に対応するmRNA、またはこの遺伝子にコードされるタンパク質を定量することにより、推定することができる。mRNAの定量法は当業者に公知である。例えば、ZNFN3A1遺伝子に対応するmRNAのレベルは、ノーザンプロッティングまたはRT-PCRで推定することができる。ZNFN3A1遺伝子の全ヌクレオチド配列が配列番号：1に示されているため、当業者であればZNFN3A1遺伝子の定量に用いるプローブまたはプライマーのヌクレオチド配列を設計することができる。

【 0 1 3 4 】

ZNFN3A1遺伝子の発現レベルも、ZNFN3A1遺伝子にコードされるタンパク質の活性または量を基に解析することができる。ZNFN3A1タンパク質の量を決定する方法を以下に述べる。例えは免疫アッセイ法は、生物材料中のタンパク質の決定に有用である。任意の生物材料を用いて、タンパク質またはその活性を決定することができる。例えば血液試料を解析して、血清マーカーによってコードされるタンパク質の推定を行う。一方、解析する各タンパク質の活性にしたがって、ZNFN3A1遺伝子にコードされるタンパク質の活性を決定するための適切な方法を選択することができる。

10

【 0 1 3 5 】

検体（被験試料）中のZNFN3A1遺伝子の発現レベルを推定し、正常試料における発現レベルと比較する。このような比較によって、ZNFN3A1遺伝子の発現レベルが正常試料における発現レベルより高いことが示される場合、被験者は癌に罹患していると判定される。正常試料および被験者に由来する検体中のZNFN3A1遺伝子の発現レベルは、同時に決定することができる。または、発現レベルの正常範囲を、対照群から事前に回収した検体中のZNFN3A1遺伝子の発現レベルを解析することによって得られた結果に基づく、統計学的方法で決定することができる。被験者の試料を調べることで得られた結果を正常範囲と比較し、結果が正常範囲内にない場合は、被験者は癌に罹患していると判断される。本発明では、診断される癌は好ましくは肝細胞癌である。

20

【 0 1 3 6 】

本発明では、肝細胞癌の診断に用いる診断薬も提供する。本発明の診断薬は、本発明のDNAまたはタンパク質に結合する化合物を含む。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、または本発明のタンパク質に結合する抗体を、これらの化合物として使用することができる。

30

【 0 1 3 7 】

以下の実施例は、本発明を説明し、当業者が本発明を作製および使用することを支援するため提示する。これらの例は、本発明の範囲をどんな形にせよ制限することは意図されていない。

【 0 1 3 8 】

本明細書で引用されるあらゆる特許、特許出願、および刊行物は参照として組み入れられる。

【 0 1 3 9 】**実施例****本発明を実施するための最良の態様**

40

本発明を以下の実施例で詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されない。

【 0 1 4 0 】**材料および方法**

ヒト肝癌細胞系Huh7、およびAlexander、ヒト子宮頸部細胞系HeLa、およびマウス纖維芽細胞系NIH3T3を含む、様々な哺乳類の宿主細胞（いずれも米国菌株保存機関（ATCC）から入手可能）を用いて、ZNFN3A1を単離し、特徴づけを行った。ヒト肝癌細胞系であるSNU423およびSNU475も使用し、韓国細胞系バンクから入手した。すべての細胞系は10%ウシ胎児血清および1%抗生物質/抗真菌性溶液（Sigma）を添加した適切な培地（Huh7 AlexanderおよびNIH3T3用のダルベッコ改変イーグル培地；HeLa用のイーグル最小基本培地；SNU423およびSNU475用のRPM1640）中で単層で成長させ、37℃で5% CO₂を含む空気中で成長

50

させた。

【0141】

ZNFN3A1のクローニングは、通常、KOD-plus (TOYOB0) を用いてPCRで行った。大腸菌 (E. coli) で発現させる場合は、ZNFN3A1のコード領域をpET21aのEcoRI-KpnI部位にクローニングした。

【0142】

哺乳類細胞で発現させる場合は、ZNFN3A1コード領域をpcDNA3.1 (+) および (-) (Invitrogen) のEcoRI-KpnI部位、pFLAGのEcoRI-KpnI部位、およびpEGFP (Clontech) のEcoRI-KpnI部位にクローニングした。KIAA0054のコード領域は、pCMV-HA (Clontech) のEcoRI-XbaI部位にクローニングした。

10

【0143】

RNAは、以下の実験で、全RNAをQiagen RNeasyキット (Qiagen)、またはTrizol試薬 (Life Technologies) を用いて製造業者のプロトコルにしたがって抽出することで調製した。

【0144】

本明細書ではRNAをRT-PCRで増幅した。10 μgの全RNAを、ポリdT_{12,18}プライマー (Amersham Biosciences)、およびSuperscript II逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて逆転写して1本鎖のcDNAを得た。個々の1本鎖cDNAを希釈して、後のPCR増幅に用いた。標準的なRT-PCRを、20 μl容量のPCR緩衝液 (TAKARA) 中で行い、94 °で4分間の変性に続き、20サイクル (GAPDHの場合) または30サイクル (ZNFN3A1の場合) の94 °で30秒間、56 °で30秒間、72 °で30秒間の工程でGene Amp PCRシステム9700 (Perkin-Elmer) で増幅した。プライマーの配列は以下の通りであった：GAPDH用のフォワード；5'-ACACAGCCTCAAGATCATCAG (配列番号：4) およびリバース；5'-GGTCCACCACTGACACGTTG (配列番号：5)、ZNFN3A1フォワード；5'-TTCCCGATATCAACATCTACCAAG (配列番号：6) およびリバース；5'-AGTGTTGACCTCAATAAGGCAT (配列番号：7)。

20

【0145】

ZNFN3A1を検出するため、ウサギ抗ZNFN3Aポリクローナル抗体を作製した。ZNFN3A1の全コード配列を、精巣のcDNAをテンプレートとして用いてPCR反応で増幅し、pET21a (Novagen) にクローニングした。クローニングしたベクターで、BL21-CodonPlus (登録商標) コンピテント細胞 (Stratagene) をトランスフェクトした。組換えZNFN3A1タンパク質を、1.0 mMのIPTGを添加して30 °で6時間誘導した。His-ZNFN3A1融合タンパク質を、Pro Bond (商標) レジン (Invitrogen) を用いて精製した。精製したHis-ZNFN3A1を用いてウサギを10回免疫化した。このポリクローナル抗体による免疫プロッティングの結果、抗FLAGモノクローナル抗体 (Sigma) を用いて検出された場合と同じパターンである、FLAG標識ZNFN3A1の単一の50 kDのバンドが現れた (データは示していない)。

30

【0146】

細胞周期の進行におけるZNFN3A1の作用をフローサイトメトリーで判定した。細胞を1×10⁵細胞/100 mmディッシュの密度で播いた。これらの細胞を任意の時間経過後にトリプシン処理し、PBS中に回収し、70%の冷エタノールで固定した。RNA分解酵素処理の後、細胞をヨウ化プロピジウム (50 μg/ml) /PBSで染色した。フローサイトメトリーをBecton Dickinson FACScanで行い、CellQuestおよびModFitソフトウェア (Verity Software House) により解析を行った。細胞周期のG0/G1期、S期、およびG2/M期における核、および任意のサブG1集団の割合を、少なくとも20,000個の非同期細胞から決定した。

40

【0147】

免疫プロッティングおよび免疫組織化学法もまた、様々な実験で行った。免疫プロッティングでは、細胞をPBSで2回洗浄し、溶解緩衝液 (150 mM NaCl、1% トリトンX-100、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM DTT、および1×コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche)) 中に回収した。細胞をホモジナイズして10,000 × gで30分遠心した後に、上清をタンパク質濃度に関して、Bradfordアッセイ法 (Bio-Rad) によって標準化した。タンパク質を10% SDS-PAGEで分離し、マウス抗FLAG、ウサギ抗RNAポリメラーゼII、

50

ウサギ抗HA抗体、およびウサギ抗ZNFN3A1抗体で免疫プロットを行った。HRP結合ヤギ抗マウスIgGおよび抗ウサギIgGを、ECL検出システム（Amersham Biosciences）の二次抗体として用いた。

【0148】

免疫組織化学法では、免疫組織化学染色法を抗ZNFN3A1抗体を用いて行った。パラフィンに包埋した組織切片を、製造業者の推奨する方法にしたがって、SAB-P0ペルオキシダーゼ免疫染色系（ニチレイ、東京、日本）に供した。クエン酸緩衝液（pH 6）中のスライドガラスを電子レンジで10分間700 Wで前処理することで、脱パラフィン化して再水和した組織から抗原を回収した。

【0149】

実施例1：HCCにおいて高頻度で発現が上昇している新たな遺伝子の同定

10

23040の遺伝子を有するゲノム全体のcDNAマイクロアレイを用いて、B型肝炎陽性および/またはC型肝炎陽性のHCCにおいて、一般的に発現が上昇している発現配列タグ（EST）を同定した。なかでも、あるEST（Hs.8109）に対応する遺伝子A6681に注目した。それは、この発現が、12例の臨床HCC中11例（91.7%）において、対応する非癌性肝組織と比較して有意に上昇していたためである（図1A）。遺伝子A6681の発現の増加は、別の10例のHCCでもRT-PCRによって確認された（図1B）。半定量的RT-PCRで確認された相対的な発現は、cDNAマイクロアレイにより確認された発現と良好に相関した。

【0150】

実施例2A：新たなヒト遺伝子ZNFN3A1の単離および特徴づけ

20

多組織ノーザンプロット（Clontech）を用いて、³²Pで標識した部分A6681cDNAを、精巣および骨格筋で発現される約1.7 kbの転写物（Clontechから購入）とハイブリダイズさせた（図1C）。A6681プローブは、一組のプライマー、5'-TTCCCGATATCAACATCTACCAG-3'（配列番号：6）および5'-AGTGTGTGACCTCAATAAGGCAT-3'（配列番号：7）を用いてRT-PCRで調製した。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄は、業者の推奨にしたがって実施した。このプロットのオートラジオグラフを増感スクリーンを用いて-80 °で24時間かけて得た。約1.7 kbのポリヌクレオチド転写物を、ZNFN3A1遺伝子と命名した。

【0151】

この転写物の5'領域の配列を、Marathon cDNA增幅キット（Clontech）を用いて製造業者の指示書にしたがって行った5'RACE法（5'rapid amplification of cDNA ends）によって決定した。ZNFN3A1のcDNAの5'部分を増幅するため、遺伝子に特異的なリバースプライマー（5'-CTGCCAAGAACGTCGGAGTCTGGAG）[配列番号：8]を用いた。cDNAテンプレートは、ヒト精巣のmRNAからRT-PCRで合成した。PCR産物をTAクローニングキット（Invitrogen）を用いてクローニングし、配列をABI PRISM 377 DNAシークエンサー（Applied Biosystems）で決定した。この結果、428アミノ酸をコードする1284ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む配列番号：1に記載されるように、1622ヌクレオチドの配列がアセンブルして得られた。

30

【0152】

ZNFN3A1遺伝子の5'側部分を含むESTクローンは、ESTデータベース内に認められなかつたため、ZNFN3A1のcDNAに対応するゲノム配列をゲノムデータベース中で探索した。ゲノム配列の比較により、ZNFN3A1遺伝子も含まれる染色体バンド1q44に割り当てられる、コスミド配列が見出された。GENSCANおよびGene Recognition（MIT (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)) のGENSCAN、およびIMS (<http://www.genome.ad.jp>) のGRAIL 2、ならびにAssembly Internet Linkプログラム（AutoAssembler 2.1）（ABIより入手）を用いて、候補となるエキソン配列を推定し、エキソンの連結を行った。

40

【0153】

実施例2B：新たなヒトタンパク質ZNFN3A1の単離および特徴づけ

428アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを含む、1622ヌクレオチドの配列に関しては、ZNFN3A1タンパク質は、Simple Modular Architecture Research Tool (

50

SMART (EMBL (<http://smart.embl-heidelberg.de>)) を用いて同定された。SMARTにより、ZNFN3A1タンパク質がzf-MYND [ジンクフィンガータンパク質 (MYNDドメイン含有)] ドメイン (コドン49~87) 、ならびにSET [(Su(var)3~9、Enhancer-of-zeste、トリソラックス)] ドメイン (コドン117~246) を含むことが示唆された (図2A) 。ZNFN3A1タンパク質のアミノ酸配列は、マウス (*Mus musculus*) のES細胞のcDNA (GenBankアクセション番号 : AK010447) (図2B) のアミノ酸配列と、94%の同一性を有し、このタンパク質をコードする遺伝子は「ZNFN3A1」 (ジンクフィンガータンパク質、サブファミリー3A (MYNDドメイン含有) 、1) と命名委員会によって命名された。

【 0 1 5 4 】

実施例3：ZNFN3A1の細胞内局在

10

ZNFN3A1に対応するコード領域の全体をpEGFP-N1ベクターおよびpFLAG-CMV-5aベクターにクローニングし、これらのコンストラクトをSNU475細胞にトランスフェクトして発現させた。EGFP標識ZNFN3A1およびFLAG標識ZNFN3A1の発現をウェスタンプロットティングで確認した (データは示していない) 。ZNFN3A1-EGFP融合タンパク質とFLAG標識ZNFN3A1タンパク質の両方が、蛍光免疫細胞化学法によって細胞質および核で均一に検出された (図3A~F) 。内因性ZNFN3A1タンパク質の細胞内局在は、ZNFN3A1に対する特異的抗体を用いて観察した。

【 0 1 5 5 】

興味深いことに、ZNFN3A1タンパク質の細胞内局在は、細胞周期の進行中に、または培養細胞の密度によって変化する。内因性ZNFN3A1タンパク質について免疫細胞化学法を実施したところ、ある程度の量のタンパク質が、低い細胞密度での培養時には核に局在していた (図3G~Iおよび図3M~O) 。しかし高い細胞密度での培養時には、ZNFN3A1タンパク質の大部分は細胞質に局在していた (図3J~Lおよび図3P~R) 。これらの結果から、ZNFN3A1の細胞内局在が細胞密度に依存することが判明した。ZNFN3A1は、細胞がS期の中期~後期にある場合、または低密度条件での培養時には核に蓄積するが、細胞周期の他の期にある場合、または高密度条件で成長している場合は細胞質および核に局在する。

20

【 0 1 5 6 】

4%パラホルムアルデヒドを含むPBSを用いて15分間、培養細胞をチャンバースライド上で固定して、免疫細胞化学法を行い、室温で2.5分間かけて0.1% トリトンX-100を含むPBSを用いて透過性にした。この細胞を2% BSA/PBSで4℃で24時間覆って非特異的なハイブリダイゼーションをブラックし、次に一次抗体として2000倍希釈したマウス抗FLAG抗体と、3000倍希釈したウサギ抗ZNFN3A1抗体と共にインキュベートした。抗体を蛍光基質に結合した抗マウスIgGおよび抗ウサギIgGの二次抗体 (ICN/Cappel and Jackson Immuno Research) で染色した。核を4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドールジハイドロクロライド (DAPI) で対比染色した。蛍光像はECLIPSE E800顕微鏡で得た。

30

【 0 1 5 7 】

ZNFN3A1の局在は細胞周期に依存する可能性があり、様々な密度のSNU475細胞においてフローサイトメトリーで細胞周期を解析した。細胞を 1×10^5 細胞/100 mmディッシュの密度で播いた。この細胞を所与の時間にトリプシン処理し、PBS中に回収し、70%冷エタノールで固定した。RNA分解酵素処理後に、細胞をヨウ化プロピジウム (50 μg/ml) /PBSで染色した。フローサイトメトリーをBecton Dickinson FACScanで行い、CellQuestおよびModFitソフトウェア (Verity Software House) で解析を行った。細胞周期のG0/G1期、S期およびG2/M期の核、および任意のサブG1集団の割合を、少なくとも20,000個の非同期細胞から決定した。

40

【 0 1 5 8 】

低細胞密度および高細胞密度と比較して、G0/G1期の細胞集団は高細胞密度の場合に増加したが、S期およびG2/M期の細胞集団は劇的に減少した。ZNFN3A1の局在に対する細胞周期の作用を詳細に決定するため、Huh7細胞をアフィジコリンを用いて同調させ、ZNFN3A1の細胞内局在を観察した (図4a、b) 。Huh7細胞の大半は、アフィジコリン処理の36時間後にはG0/G1期に留まっており、ZNFN3A1は細胞質に局在していた。アフィジコリンを培地

50

から除去すると、細胞周期が進行してZNFN3A1タンパク質は細胞質から核へ移動した。これらのデータから、ZNFN3A1タンパク質の細胞内局在は、細胞周期の状態により調節され、ZNFN3A1タンパク質は増殖条件で核へ移行することが示された。

【 0 1 5 9 】

実施例4：ZNFN3A1による正常組織の細胞系NIH3T3細胞の成長促進

ZNFN3A1遺伝子移入が肝癌細胞系の成長に及ぼす作用を解析するために、正常組織の細胞系NIH3T3細胞を、センスのZNFN3A1およびアンチセンスのZNFN3A1を含む発現プラスミドpcDNA3.1でトランスフェクトした。

【 0 1 6 0 】

業者の推奨にしたがってFuGENE 6トランスフェクション試薬を用いて、ZNFN3A1のコード配列全体を含むpcDNA3.1ベクター（Invitrogen）により、NIH3T3細胞をトランスフェクトした。10% FBSおよび0.9 mg/mlのジェネティシンを含むDMEM中で細胞を維持し、単一コロニーを選択した。ZNFN3A1の構成的発現をRT-PCRで確認した。10

【 0 1 6 1 】

NIH3T3細胞では一般に、ZNFN3A1のmRNAの内因性発現はみられなかった。コロニー形成に関しては、図5Aおよび5Bに示すように、センスのZNFN3A1発現ベクターは、擬似ベクターと比較してNIH3T3細胞におけるコロニーの形成を促進し、およびアンチセンスZNFN3A1ベクターでは成長は認められなかった。

【 0 1 6 2 】

コロニー形成アッセイ法を、 1×10^5 細胞/100 mmディッシュの密度で播いた細胞について行った。24時間後、細胞をFuGENE 6トランスフェクション試薬（Roche）を用いてプラスミドベクターによりトランスフェクトし、適切な濃度のジェネティシンと共に2週間培養した。細胞を100%メタノールで固定し、ギムザ溶液で染色した。コロニー形成アッセイ法の結果は、3回の独立した実験で確認した。20

【 0 1 6 3 】

ZNFN3A1の成長促進作用をさらに調べるために、ZNFN3A1安定形質移入NIH3T3細胞をさらに検討した。センスのZNFN3A1安定形質移入細胞は、ZNFN3A1のmRNAを構成的に発現した（図5C、5D）。発現はRT-PCRで確認した。図5Cおよび5Dに示すように、ZNFN3A1を絶えず発現するクローニングは、アンチセンスZNFN3A1および対照ベクターの形質移入細胞と比較して、高い成長能力を示し、ZNFN3A1が肝細胞癌の細胞成長の促進に重要な役割を果たすことを示す。30

【 0 1 6 4 】

実施例5：アンチセンスオリゴヌクレオチドによるZNFN3A1の発現低下が肝癌細胞の成長を抑制する

ZNFN3A1の抑制が、HCC細胞の成長遅延および/または細胞死を誘導するか否かを調べるために、様々なアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成してZNFN3A1の発現を抑制した。開始コドンを含むZNFN3A1のセンスまたはアンチセンスのS-オリゴヌクレオチドを、リポフェクチン試薬（GIBCO-BRL）を用いてトランスフェクトした。ホスホロチオエートで修飾したODNの配列は以下の通りであった：アンチセンスS-オリゴヌクレオチド；5'-GCGG GAGGATGGAGCC（配列番号：3）。

【 0 1 6 5 】

この細胞をアンチセンスおよびセンスのS-オリゴヌクレオチドとともに24時間培養し、ZNFN3A1（遺伝子）やZNFN3A1（タンパク質）の発現を、RT-PCRと抗ZNFN3A1抗体を用いたウェスタンプロットティングにより解析した。

【 0 1 6 6 】

この細胞を、開始コドンを含むアンチセンスS-オリゴヌクレオチドでトランスフェクトしたところ、多量のZNFN3A1を構成的に発現するSNU475細胞およびHuh7細胞における、ZNFN3A1の内因性発現が有意に低下した（図6A、B）。アンチセンスS-オリゴヌクレオチドのトランスフェクションも、上述のコロニー形成アッセイ法で判定されるように、Huh7細胞およびSNU475細胞の細胞数を有意に抑制した。4050

【0167】

MTTアッセイ法を、細胞を 5×10^5 細胞/100 mmディッシュの密度で播くことにより実施した。翌日、細胞をZNFN3A1のセンスまたはアンチセンスのS-オリゴヌクレオチドにより3回トランスフェクトした。培養を開始してから72時間に、培地を臭化物中に5 mgの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムを含む10 mlの新鮮な培地(MTT)(SIGMA)と交換した。さらに37℃で4時間インキュベーションした後に、1 mlの0.01 N HCl/10% SDSを添加して細胞を溶解した。発色反応をELISAプレートリーダーで定量した(試験波長=570 nm、標準波長=630 nm)。細胞の生存率を、対照に対する吸光度で表した。

【0168】

アンチセンス-ZNFN3A1のトランスフェクションによる細胞成長の抑制は、Alexander細胞およびSNU423細胞を含む他のHCC細胞系でも認められ、図6C、6Dに示されるように、両細胞とも対照のS-オリゴヌクレオチドと比較して多量のZNFN3A1を構成的に発現する。コロニー形成アッセイ法の結果は、3回の独立した実験で確認した。またフローサイトメトリーの結果、ZNFN3A1の発現の抑制によりS期の集団の細胞数が有意に減少し、サブG1期の細胞数が増加することが判明した(図6E)。以上の結果から、ZNFN3A1の発現抑制が、HCCの成長の阻害およびアポトーシスの促進を誘導することがわかった。

【0169】

実施例6：ZNFN3A1とRNAヘリカーゼKIAA0054との相互作用

ZNFN3A1による発癌機構を調べるために、ZNFN3A1と相互作用するタンパク質を酵母ツーハイブリッドスクリーニング系を用いて探索した。酵母ツーハイブリッドアッセイ法は、MATCHMAKER GAL4ツーハイブリッドシステム2およびシステム3(Clontech)を用いて、製造業者のプロトコルにしたがって行った。ZNFN3A1の全コード配列をペイトベクターであるpAS2-1のEcoRI部位にクローニングした。ライブラリーをスクリーニングするため、ヒト精巣ライブラリーをpACT2(Clontech)にクローニングした。同時に、共形質転換したA H109酵母細胞(pAS2-1ペイトベクターおよび様々なpACT2プレイベクターを有する)を、25 mg/LのX-Gal(Clontech)および25 mMの3-アミノ-1,2,4-トリゾール(Sigma)を添加したSD最小培地(-Ade/-His/-Leu/-Trp)に播いた。ライブラリープラスミドを陽性コロニーから単離し、その配列およびフレームを確認した。

【0170】

同定されたクローン中で、pAS2.1-ZNFN3A1およびpACT2-KIAA0054を用いた共形質転換により、RNAヘリカーゼKIAA0054のC末端領域がZNFN3A1と相互作用した(図7A、7B)。RNAヘリカーゼは、ヌクレオシド三リン酸をエネルギー源として、2本鎖RNAを巻き戻すタンパク質のファミリーを構成している。RNAヘリカーゼは、ほぼすべての生物学的過程に見出される広範囲にわたるタンパク質群であることは明らかである。

【0171】

ZNFN3A1とKIAA0054との相互作用をさらに確認するために、FLAG標識ZNFN3A1タンパク質を調製した。HeLa細胞を、10 cmのディッシュあたり8 μgのpFLAG-CMV-ZNFN3A1およびpCMV-HA-KIAA0054のDNAでトランスフェクトし、48時間後に回収した。細胞を150 mM NaCl(PBS)を含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)で1回洗浄し、NET-N緩衝液(150 mM NaCl、0.5% NP-40、20 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、および1×コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル)中で溶解した。典型的な免疫沈降反応では、300 μgのHeLa全細胞可溶化抽出物を、1 μgの所望の抗体および20 μlのプロテインAまたはプロテインGセファロースビーズ(Zymed)と共に、4℃で1~2時間インキュベートした。ビーズを1 mlのNET-N緩衝液で4回洗浄した。ビーズに結合しているタンパク質を、SDS試料緩衝液中で煮沸して溶出し、SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転移させた。この膜を上述のように免疫プロッティングに使用した。溶解物を、抗FLAG抗体および抗HA抗体を対照として用いた免疫プロッティングで直接解析した。ZNFN3A1タンパク質は、HeLa哺乳類細胞で発現されるHA標識KIAA0054タンパク質に結合することが明らかになった(図7C)。

【0172】

10

20

30

40

50

KIAA0054との相互作用を担うZNFN3A1の領域を同定するために、ツーハイブリッドアッセイ法をZNFN3A1の欠失断片を用いて行った。アミノ酸1位～250位または100位～428位を欠く変異体は、KIAA0054のC末端領域との相互作用に関して陰性を示したが、アミノ酸100位～250位を含む断片は陽性を示した（図8）。これは、ZNFN3A1結合領域がSETドメイン領域中に存在することを示す。

【0173】

実施例7：ZNFN3A1、RNAヘリカーゼ、およびRNAポリメラーゼII間の相互作用

RNAヘリカーゼは、転写因子およびRNAポリメラーゼIIに結合することで転写に重要な役割を果たす。これらの結果から、ジンクフィンガータンパク質ZNFN3A1がRNAヘリカーゼKIAA0054だけでなくRNAポリメラーゼIIとの結合を介して、転写を調節する可能性があることが判明した。ZNFN3A1、RNAヘリカーゼKIAA0054、およびRNAポリメラーゼII間の結合を共免疫沈降法で試験した（図9）。HeLa細胞を、10 cmのディッシュあたり8 μgのpFLAG-CMV-ZNFN3A1およびpCMV-HA-KIAA0054のDNAでトランスフェクトし、48時間後に回収した。細胞を150 mM NaCl（PBS）を含む10 mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）で1回洗浄し、NET-N緩衝液（150 mM NaCl、0.5% NP-40、20 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、および1×コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル）中で溶解した。典型的な免疫沈降反応では、300 μgの全細胞抽出物を、1 μgの抗体および20 μlのプロテインAまたはプロテインGセファロースビーズ（Zymed）と共に、4℃で1～2時間インキュベートした。ビーズを1 mlのNET-N緩衝液で4回洗浄した。ビーズに結合しているタンパク質を、SDS試料緩衝液中で煮沸して溶出し、SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転移させた。この膜を上述のように免疫プロットティングに使用した。

【0174】

内因性RNAポリメラーゼIIとの結合は、抗FLAG抗体、抗HA抗体、および抗RNAポリメラーゼII抗体を用いて検出した。抗FLAG抗体を免疫沈降法に使用し、抗RNAポリメラーゼII抗体を免疫プロットティングに使用した際は、FLAG-ZNFN3A1タンパク質およびHA-KIAA0054タンパク質とともに発現する場合はRNAポリメラーゼIIに特異的なバンドが強く検出され、FLAG-ZNFN3A1タンパク質のみを発現する場合はわずかしか検出されなかった。一方、抗HA抗体を免疫沈降法に使用し、抗RNAポリメラーゼII抗体を免疫プロットティングに使用した際は、FLAG-ZNFN3A1タンパク質およびHA-KIAA0054タンパク質とともに発現する場合だけでなく、HA-KIAA0054のみを発現する場合においても、RNAポリメラーゼIIに特異的なバンドが強く検出された。さらに共免疫沈降法を、免疫沈降法および免疫プロットティングで用いる抗体を替えることで逆に実施した。結果は、反対の抗体を用いた場合と同等であった。以上の結果から、RNAヘリカーゼKIAA0054が、ZNFN3A1タンパク質とRNAポリメラーゼIIとの複合体形成を、各タンパク質との接触を介して媒介しうることが示される。したがって、ZNFN3A1、RNAヘリカーゼKIAA0054、およびRNAポリメラーゼIIによる転写の調節は、肝細胞発癌における細胞成長の促進に重要な役割を果たす可能性がある。図12に、遺伝子の転写を調節する、ZNFN3A1、RNAヘリカーゼ、およびRNAポリメラーゼIIにより形成される複合体を図示した。

【0175】

実施例8：ZNFN3A1タンパク質の配列特異的な結合

ZNFN3A1のコンセンサスDNA結合部位を、20のランダムヌクレオチドのコアを含むオリゴヌクレオチドコンストラクトを用いて決定した。インビトロでZNFN3A1タンパク質と結合可能な推定コンセンサス配列を、ランダムオリゴヌクレオチドを用いたDNA選択法で探索した。GST-ZNFN3A1融合タンパク質を調製し、セファロース4Bに固定して、このタンパク質と結合する2本鎖のランダムオリゴヌクレオチドDNAを選択した。10回選択を行い、繰り返し增幅した後に、増幅されたDNAをPCRベクター（Clontech）にクローニングし、92個のクローンの配列を決定した。92個のクローン中、32個（34.8%）は5'-CCCTCC-3'のコンセンサス配列を含んでおり、これは計算による確率より10²倍高い発生率である（図10A）。ZNFN3A1のジンクフィンガードメインを発現する組換えタンパク質を調製するために、全長のZNFN3A1に対応するcDNA断片を一連のプライマー、5'-CGGAATTCTGGAGCCGCTGAAGGTGGAAA

10

20

30

40

50

AG-3' [配列番号：9]および5'-CCGCTCGAGGGATGCTCTGATGTTGGCGTCG-3' [配列番号：10]を用いたRT-PCRで増幅し、pGEX-6Pプラスミドの適切なクローニング部位にサブクローニングした。組換え融合タンパク質を調製し、上述のようにセファロース46カラムで精製した。5'-GGGAGAAATTCCGACACCGT(N20)CTCGAGCGTCTACATGGATCCTCA-3' [配列番号：11]の配列をもつオリゴヌクレオチドを用いて、上述の選択および増幅を行った。

【0176】

真核生物プロモーターデータベース (<http://www.epd.isb-sib.ch/index.html>) を使用することで、候補となるZNFN3A1下流遺伝子群を探索し、5つの候補遺伝子を選択した。最初に各遺伝子の発現レベルを、ZNFN3A1を外因的に発現するCOS7安定形質転換体における半定量的RT-PCRにより決定した(図10B)。この結果から、EGFR、c-myc、およびBc12の発現がZNFN3A1によって上昇することがわかった。
10

【0177】

コンセンサス標的配列が5'-(C)CCCTCC(T)または(A)GGAGGG(G)-3'である、ZNFN3A1に対する4つの推定結合部位が、EGFRの5'隣接領域の-213 bpから-207 bpの間(CBS1)、-106 bpから-100 bpの間(CBS2)、-65 bpから-59 bpの間(CBS3)、ならびに-46 bpから-40 bpの間(CBS4)に同定された。CBS1、CBS2、CBS3、およびCBS4を含む野生型レポータープラスミド(P1)、ならびにこのプラスミドの4つの欠失コンストラクト(P2、P3、P4、およびP5)を、各配列をpGL3-Basicベクター(Promega)の適切な酵素切断部位にクローニングすることにより作製した。プラスミドP1、P2、P3、P4、およびP5は、

P1-F (5'-GGGGTACCCAGTGCTGGGAACGCCCTCTCG-3') [配列番号：12]、
20

P2-F (5'-GGGGTACCCACTCCCGCCGGAGACTAGGTCC-3') [配列番号：13]、

3-F (5'-GGGGTACCCCTCGCATTCTCCTCCTCCTGC-3') [配列番号：14]、

4-F (5'-GGGGTACCTGGTCCCTCCTCCGCCCTG-3') [配列番号：15] または
4-F (5'-GGGGTACCTCCC GCCCTGCCTCCGCCCTG-3') [配列番号：16]

を同じリバースプライマー(P1-R; 5'-GAAGATCTAG GTGGCCTGTC GTCCGGTCTG G-3') [配列番号：17]で増幅することにより構築した。部位特異的変異誘発を、両方の推定ZNFN3A1結合部位について、CCCTCCをCATTCCで置換し、QuickChange部位特異的変異誘発キットを業者(Stratagene)の推奨にしたがって用いて行った。

【0178】

各レポータープラスミド(2 μg)を、0.2 μgのpRL-TKプラスミド(Promega)とともに、FuGENE6試薬(Boehringer)を製造業者の指示書にしたがって使用して共トランسفエクトした。ルシフェラーゼアッセイ法を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)を製造業者のプロトコルにしたがって用いて実施した。
30

【0179】

実施例9：ZNFN3A1によるEGFRプロモーター活性の上昇

HCCではEGFRの発現が高まることが報告されていたため、本発明者らはこの受容体分子に注目し、そのプロモーターがZNFN3A1結合配列により調節を受けるか否かを試験した。本発明者らは、その5'隣接領域に4つの可能なZNFN3A1結合モチーフ(CBS1、2、3、および4)を同定し、4つのモチーフを含むレポータープラスミド(P1)、ならびに様々な欠失型(P2、P3、P4、およびP5)を作製した。これらのレポータープラスミドをSNU475細胞にトランسفエクトしたところ、P1の活性はP2、P3、P4、またはP5の活性より有意に高かった。P4の活性がP5の活性とほぼ同等であるというという事実から、本発明者らはCBS1、CBS2、およびCBS3を含む-261位から-50位の領域がEGFRの転写活性化に関連する可能性があると考えた。これらのドメインの役割を明らかにするために、本発明者らは、個々の候補結合モチーフを5'-CCCTCC-3'から5'-CATTCC-3'に代えた、変異型CBS1(P1m1)および変異型CBS2(P1m2)または変異型CBS3(P1m3)を含むレポータープラスミドを構築した(図11A)。レポーターアッセイにより、変異型モチーフ(P1m1、P1m2、およびP1m3)を含む断片が、EGFRの転写をP1よりかなり弱く活性化することが判明した(図11B)。これらの結果から、3つの推定ZNFN3A1結合モチーフがEGFRの転写活性化に関与することが示唆された。
40

【産業上の利用可能性】

【 0 1 8 0 】

新たなヒト遺伝子ZNFN3A1の発現は、非癌性肝組織と比較して肝細胞癌で著しく上昇する。したがってこの遺伝子はHCCの診断マーカーとして使用でき、そのため、この遺伝子にコードされるタンパク質を、診断アッセイ法に使用することができる。

【 0 1 8 1 】

発明者らは、新たなタンパク質ZNFN3A1の発現が細胞成長を促進する一方で、細胞成長がZNFN3A1に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドによって抑制されることも報告している。これらの知見は、ZNFN3A1が発癌活性を刺激することを示唆している。したがって、この新たな癌タンパク質は、抗癌性薬剤を開発するための有用な標的である。例えば、ZNFN3A1の発現を阻止するか、またはこの活性を妨げる薬剤は、抗癌剤（特にHCC治療用の抗癌剤）として治療的有用性がある可能性がある。このような薬剤の例には、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびZNFN3A1を認識する抗体などが含まれる。
10

【 0 1 8 2 】

また発明者らは、ZNFN3A1がRNAヘリカーゼと直接結合し、RNAポリメラーゼIIと複合体を形成することを示している。この複合体は、EGFRを含む下流の標的遺伝子の転写を、複合体と5'隣接領域中のエレメント「(C)CCCTCC(T)」との直接結合によって活性化する。したがって、この複合体の活性を阻害する薬剤は、HCCの治療および予防において有用である可能性もある。

【 0 1 8 3 】

本発明は、本発明の特定の態様に関して詳細に記載されているが、当業者には、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変が可能であることが理解される。
20

【 図面の簡単な説明 】**【 0 1 8 4 】**

【図1】HCCにおけるA6681およびZNFN3A1の発現を示す。図1Aは、cDNAマイクロアレイで調べた20の原発性HCCにおけるA6681の相対発現比を示す。この発現は、カットオフフィルターを通過した（Cy3およびCy5のシグナルがいずれも25,000を超える）、12例の臨床HCCのうち11例（91.7%）で有意に上昇した。図1Bは、RT-PCR産物の臭化工チジウム染色により示した、HCC候補遺伝子の発現を示す写真（T=腫瘍組織；N=正常組織）である。GAPDHの発現を内部対照として用いた。図1Cは、様々な成人ヒト組織におけるA6681の、複数の組織を対象としたノーザンプロット解析を示す写真である。
30

【図2】図2Aは、ZNFN3A1の推定タンパク質構造およびタンパク質モチーフを示す。ZNFN3A1のタンパク質モチーフは、Simple Modular Architecture Research Tool (SMART)により推定した。図2Bは、ZNFN3A1およびAK010447の推定アミノ酸配列間の相同性を示す。zf-MYND [ジンクフィンガータンパク質 (MYNDドメインを含む)] ドメイン (A)、およびSET [(Su (var) 3-9、Enhancer-of-zeste、トリソラックス)] ドメイン (B) はそれぞれ94%と95%の同一性を示した。

【図3】免疫細胞化学的手法（特に蛍光免疫組織化学染色）により観察した、ZNFN3A1の細胞内局在を示す写真である。図3A～3Cは、EGFP標識ZNFN3A1を発現するように設計したプラスミドDNA (pEGFP-ZNFN3A1) によりトランスフェクトしたSNU475細胞を示す。FITC (g, j, m, p)、DAPI (h, k, n, q)、統合 (i, l, o, r) の蛍光顕微鏡写真である。図3D～3Fは、FLAG標識ZNFN3A1を発現するように設計したプラスミドDNA (pFLAG-ZNFN3A1) によりトランスフェクトしたSNU475細胞を示す。抗FLAG (d)、DAPI (e)、統合 (f) の蛍光顕微鏡写真である。図3G～3Rは、SNU475細胞 (g～l) およびSNU423細胞 (m～r) における、ZNFN3A1の内因性発現を示す。抗ZNFN3A1 (g, j, m, p)、DAPI (h, k, n, q)、統合 (i, l, o, r) の蛍光顕微鏡写真である。細胞は、低密度 (1.25×10^4 細胞/ウェル) (g～i, m～o)、および高密度 (1.0×10^5 細胞/ウェル) (j～l, p～r) で播種した。
40

【図4】細胞周期の進行がZNFN3A1の細胞内局在に及ぼす作用を示す。図4Aは、アフィジコリンで同調させたHuh7細胞のFACS解析を示す。7.5 μg/mlのアフィジコリンと共に36時間インキュベートすることにより、細胞の成長をG₁期で停止させ、アフィジコリンを除去
50

してG₁期から開放した。FACSを0時間後、4時間後、8時間後、および12時間後に行った。図4Bは、アフィジコリンで同調させたHuh7における内因性ZNFN3A1タンパク質の蛍光免疫細胞化学染色を示す写真である。

【図5】NIH3T3におけるZNFN3A1の成長促進作用を示す。図5Aは、MOCK、NIH3T3アンチセンスZNFN3A1、およびNIH3T3センスZNFN3A1におけるZNFN3A1の発現を比較しているNIH3T3細胞におけるZNFN3A1のコロニー形成アッセイ法の結果を示す写真である。図5Bは、電子密度測定法でカウントしたコロニー数を示す。コロニーは電子密度測定法でカウントした。コロニー数は3枚のプレートの平均±SDで表す。（*）は、フィッシュヤーの最小有意差法により判定した有意差（p<0.05）を意味する。図5Cは、ZNFN3A1の安定発現によるNIH3T3細胞の成長誘導を示す写真である。安定な形質移入体（NIH3T3-ZNFN3A1）細胞におけるZNFN3A1のmRNA発現を、RT-PCRで判定した。図5Dは、トリパンブルー染色法で測定した細胞数の経時的变化を示す。10

【図6】ZNFN3A1を抑制するように設計したアンチセンスS-オリゴヌクレオチドの成長抑制作用を示す。図6Aは、ZNFN3A1を抑制するように設計したセンス（Se）またはアンチセンス（As）オリゴヌクレオチドのコンストラクトを示す。図6Bは、センス（Se）またはアンチセンス（As）オリゴヌクレオチドのいずれかで24時間処理し、RT-PCRおよび抗ZNFN3A1抗体を用いたウェスタンプロットティングで調べた、SNU475細胞におけるZNFN3A1の発現を示す写真である。図6Cは、Huh7細胞、Alexander細胞、SNU423細胞、およびSNU475細胞における、ZNFN3A1のmRNAに対するセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、コロニー形成アッセイ法の結果を示す写真である。アンチセンスオリゴヌクレオチド（As）は成長を抑制した。図6Dは、Huh7細胞、Alexander細胞、SNU423細胞、およびSNU475細胞におけるセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理の72時間後に、細胞の生存を評価したMITアッセイ法の結果を示す。図6Eは、センス（Se）またはアンチセンス（As）オリゴヌクレオチドによる処理の72時間後に、Huh7細胞の細胞周期を評価したFACS解析の結果を示す。20

【図7】ZNFN3A1とRNAヘリカーゼKIAA0054との相互作用を示す。図7Aにおいて、KIAA0054の保存されたドメインおよびZNFN3A1への結合領域をマッピングした。図7Bは、ZNFN3A1を含むpAS2-1を、2つの異なる長さのKIAA0054を含むライプラリーベクターとともに酵母株A H109に共トランスクレプトした、酵母ツーハイブリッド実験の結果を示す写真である。この結果から、酵母株AH109においてZNFN3A1とKIAA0054との結合が確認される。図7Cは、哺乳類細胞におけるZNFN3A1とKIAA0054との結合の確認を示す写真である。HeLa細胞由来の溶解物を、抗FLAG抗体または抗HA抗体と免疫沈降させた。この免疫沈降物を、抗HA抗体または抗FLAG抗体を用いた免疫プロットティングで解析した。溶解物は、対照として免疫プロットティングで直接解析した。30

【図8】ZNFN3A1とKIAA0054との相互作用が、KIAA0054のSETドメインおよびC末端領域により媒介されることを示す写真である。ZNFN3A1の欠失コンストラクトを、KIAA0054のC末端領域との相互作用能力についてツーハイブリッド系で解析した。

【図9】RNAヘリカーゼKIAA0054が、ZNFN3A1およびRNAポリメラーゼIIとインビオで結合することを示す写真である。細胞抽出物を、8 μgのpFLAG-CMV-ZNFN3A1（Full）発現ベクター、およびpCMV-HA-KIAA0054（全長）発現ベクターによりトランスクレプトしたHeLa細胞から調製した。この抽出物を、抗RNAポリメラーゼII抗体、抗HA抗体、または抗FLAG抗体を用いて免疫沈降させた。この免疫沈降物を、抗RNAポリメラーゼII抗体、抗HA抗体、または抗FLAG抗体を用いて免疫プロットティングにより解析した。溶解物は、対照として免疫プロットティングで直接解析した。40

【図10】ZNFN3A1により調節される候補下流遺伝子を示す。図10Aは、全長のZNFN3A1を含むGST融合タンパク質との結合および增幅反応によって単離された、オリゴヌクレオチド配列を示す。ランダムヌクレオチド領域を含むコアの配列を示す。図10Bは、ZNFN3A1を外因的に発現する、COS7安定形質転換体における複数の遺伝子の伸長転写物の逆転写解析を示す写真である。

【図11】(A) EGFRの5'側隣接領域において、推定ZNFN3A1結合エレメントを含む、様々

10

20

30

40

50

なレポータープラスミドの略図である。推定転写開始部位に対するスクレオチドの位置を(+)または(-)の数字で示す。(B)図示したレポータープラスミドを用いた、SNU475細胞におけるEGFRプロモーターの分析。バーは標準偏差(SD)を示す。*は、フィッシャーの最小有意差法により判定される有意差($p < 0.05$)を示す。

【図12】遺伝子の転写を調節するために、ZNFN3A1、RNAヘリカーゼ、およびRNAポリメラーゼIIの間で形成される複合体の図を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

10

<110> JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TOKYO
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> Gene and Protein Relating To Hepatocellular Carcinoma

<130> ONC-A0206P

20

<150> US 60/324,261

<151> 2001-09-25

<150> US 60/391,666

<151> 2002-06-26

<150> CA

30

<151> 2002-08-23

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

40

<211> 1622

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (96)..(1382)

<223>

<400> · 1

gtgcgcgcag ggcgcaggcg cgccgggtccc ggcagcccgat gagacgccccgt ctgctggacg 60 10

cggtagccg tctgaggtgc cggagctgcg ggagg atg gag ccg ctg aag gtg 113

Met Glu Pro Leu Lys Val

1 5

gaa aag ttc gca acc gcc aac agg gga aac ggg ctg cgc gcc gtg acc 161

Glu Lys Phe Ala Thr Ala Asn Arg Gly Asn Gly Leu Arg Ala Val Thr 20

10 15 20

ccg ctg cgc ccc gga gag cta ctc ttc cgc tcg gat ccc ttg gcg tac 209

Pro Leu Arg Pro Gly Glu Leu Leu Phe Arg Ser Asp Pro Leu Ala Tyr

25 30 35

acg gtg tgc aag ggg agt cgt ggc gtc gtc tgc gac cgc tgc ctt ctc 257 30

Thr Val Cys Lys Gly Ser Arg Gly Val Val Cys Asp Arg Cys Leu Leu

40 45 50

ggg aag gaa aag ctg atg cga tgc tct cag tgc cgc gtc gcc aaa tac 305

Gly Lys Glu Lys Leu Met Arg Cys Ser Gin Cys Arg Val Ala Lys Tyr

55 60 65 70

tgt agt gct aag tgt cag aaa aaa gct tgg cca gac cac aag cgg gaa 353

Cys Ser Ala Lys Cys Gin Lys Lys Ala Trp Pro Asp His Lys Arg Glu

75 80 85

10
tgc aaa tgc ctt aaa agc tgc aaa ccc aga tat cct cca gac tcc gtt 401

Cys Lys Cys Leu Lys Ser Cys Lys Pro Arg Tyr Pro Pro Asp Ser Val

90 95 100

cga ctt ctt ggc aga gtt gtc ttc aaa ctt atg gat gga gca cct tca 449

Arg Leu Leu Gly Arg Val Val Phe Lys Leu Met Asp Gly Ala Pro Ser

105 110 115 20

gaa tca gag aag ctt tac tca ttt tat gat ctg gag tca aat att aac 497

Glu Ser Glu Lys Leu Tyr Ser Phe Tyr Asp Leu Glu Ser Asn Ile Asn

120 125 130

aaa ctg act gaa gat aag aaa gag ggc ctc agg caa ctc gta atg aca 545

Lys Leu Thr Glu Asp Lys Lys Glu Gly Leu Arg Gin Leu Val Met Thr

135 140 145 150

30

ttt caa cat ttc atg aga gaa gaa ata cag gat gcc tct cag ctg cca 593

Phe Gin His Phe Met Arg Glu Glu Ile Gin Asp Ala Ser Gin Leu Pro

155 160 165

cct gcc ttt gac ctt ttt gaa gcc ttt gca aaa gtg atc tgc aac tct 641

Pro Ala Phe Asp Leu Phe Glu Ala Phe Ala Lys Val Ile Cys Asn Ser

170 175 180

ttc acc atc tgt aat gcg gag atg cag gaa gtt ggt gtt ggc cta tat 689

Phe Thr Ile Cys Asn Ala Glu Met Gln Glu Val Gly Val Gly Leu Tyr

185 190 195 10

ccc agt atc tct ttg ctc aat cac agc tgt gac ccc aac tgt tcg att 737

Pro Ser Ile Ser Leu Leu Asn His Ser Cys Asp Pro Asn Cys Ser Ile

200 205 210

gtg ttc aat ggg ccc cac ctc tta ctg cga gca gtc cga gac atc gag 785

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

215 220 225 230

20

gtg gga gag gag ctc acc atc tgc tac ctg gat atg ctg atg acc agt 833

Val Gly Glu Glu Leu Thr Ile Cys Tyr Leu Asp Met Leu Met Thr Ser

235 240 245

gag gag cgc cgg aag cag ctg agg gac cag tac tgc ttt gaa tgt gac 881

Glu Glu Arg Arg Lys Gln Leu Arg Asp Gln Tyr Cys Phe Glu Cys Asp

250 255 260

30

tgt ttc cgt tgc caa acc cag gac aag gat gct gat atg cta act ggt 929

Cys Phe Arg Cys Gin Thr Gin Asp Lys Asp Ala Asp Met Leu Thr Gly

265 270 275

gat gag caa gta tgg aag gaa gtt caa gaa tcc ctg aaa aaa att gaa 977

Asp Glu Gin Val Trp Lys Glu Val Gin Glu Ser Leu Lys Lys Ile Glu

280 285 290

10

gaa ctg aag gca cac tgg aag tgg gag cag gtt ctg gcc atg tgc cag 1025

Glu Leu Lys Ala His Trp Lys Trp Glu Gin Val Leu Ala Met Cys Gin

295 300 305 310

gcg atc ata agc agc aat tct gaa cgg ctt ccc gat atc aac atc tac 1073

Ala Ile Ile Ser Ser Asn Ser Glu Arg Leu Pro Asp Ile Asn Ile Tyr

315 320 325 20

cag ctg aag gtg ctc gac tgc gcc atg gat gcc tgc atc aac ctc ggc 1121

Gin Leu Lys Val Leu Asp Cys Ala Met Asp Ala Cys Ile Asn Leu Gly

330 335 340

ctg ttg gag gaa gcc ttg ttc tat ggt act cgg acc atg gag cca tac 1169

Leu Leu Glu Glu Ala Leu Phe Tyr Gly Thr Arg Thr Met Glu Pro Tyr

345 350 355

30

agg att ttt ttc cca gga agc cat ccc gtc aga ggg gtt caa gtg atg 1217

Arg Ile Phe Phe Pro Gly Ser His Pro Val Arg Gly Val Gin Val Met

360 365 370

aaa gtt ggc aaa ctg cag cta cat caa ggc atg ttt ccc caa gca atg 1265

Lys Val Gly Lys Leu Gln Leu His Gln Gly Met Phe Pro Gln Ala Met

375 380 385 390

aag aat ctg aga ctg gct ttt gat att atg aga gtg aca cat ggc aga 1313

Lys Asn Leu Arg Leu Ala Phe Asp Ile Met Arg Val Thr His Gly Arg

395 400 405 10

gaa cac agc ctg att gaa gat ttg att cta ctt tta gaa gaa tgc gac 1361

Glu His Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu Leu Glu Glu Cys Asp

410 415 420

gcc aac atc aga gca tcc taa gggAACGcAG tcAGAGGGAA atACGGCGTG 1412

Ala Asn Ile Arg Ala Ser 20

425

tgtctttgtt gaatgcctta ttgaggtcac acactctatg ctttgttagc tgtgtgaacc 1472

tctcttattt gaaattctgt tccgtgtttg ttaggtaaa taaaggcaga catggtttgc 1532

aaaccacaag aatcattagt ttagagaag cacgattata ataaattcaa aacatttgg 1592

30

tgaggatgcc aaaaaaaaaaaaaaaa 1622

<210> 2

<211> 428

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Pro Leu Lys Val Glu Lys Phe Ala Thr Ala Asn Arg Gly Asn

1 5 10 15 10

Gly Leu Arg Ala Val Thr Pro Leu Arg Pro Gly Glu Leu Leu Phe Arg

20 25 30

Ser Asp Pro Leu Ala Tyr Thr Val Cys Lys Gly Ser Arg Gly Val Val

35 40 45 20

Cys Asp Arg Cys Leu Leu Gly Lys Glu Lys Leu Met Arg Cys Ser Gln

50 55 60

Cys Arg Val Ala Lys Tyr Cys Ser Ala Lys Cys Gln Lys Lys Ala Trp

65 70 75 80

30

Pro Asp His Lys Arg Glu Cys Lys Cys Leu Lys Ser Cys Lys Pro Arg

85 90 95

Tyr Pro Pro Asp Ser Val Arg Leu Leu Gly Arg Val Val Phe Lys Leu

100 105 110

Met Asp Gly Ala Pro Ser Glu Ser Glu Lys Leu Tyr Ser Phe Tyr Asp

115 120 125

Leu Glu Ser Asn Ile Asn Lys Leu Thr Glu Asp Lys Lys Glu Gly Leu

130 135 140

Arg Gln Leu Val Met Thr Phe Gln His Phe Met Arg Glu Glu Ile Gln

145 150 155 160

10

Asp Ala Ser Gln Leu Pro Pro Ala Phe Asp Leu Phe Glu Ala Phe Ala

165 170 175

Lys Val Ile Cys Asn Ser Phe Thr Ile Cys Asn Ala Glu Met Gln Glu

180 185 190

20

Val Gly Val Gly Leu Tyr Pro Ser Ile Ser Leu Leu Asn His Ser Cys

195 200 205

Asp Pro Asn Cys Ser Ile Val Phe Asn Gly Pro His Leu Leu Leu Arg

210 215 220

30

Ala Val Arg Asp Ile Glu Val Gly Glu Glu Leu Thr Ile Cys Tyr Leu

225 230 235 240

Asp Met Leu Met Thr Ser Glu Glu Arg Arg Lys Gln Leu Arg Asp Gln

245 250 255

Tyr Cys Phe Glu Cys Asp Cys Phe Arg Cys Gin Thr Gin Asp Lys Asp

260 265 270

Ala Asp Met Leu Thr Gly Asp Glu Gin Val Trp Lys Glu Val Gin Glu

275 280 285 10

Ser Leu Lys Lys Ile Glu Glu Leu Lys Ala His Trp Lys Trp Glu Gin

290 295 300

Val Leu Ala Met Cys Gin Ala Ile Ile Ser Ser Asn Ser Glu Arg Leu

305 310 315 320

20

Pro Asp Ile Asn Ile Tyr Gin Leu Lys Val Leu Asp Cys Ala Met Asp

325 330 335

Ala Cys Ile Asn Leu Gly Leu Leu Glu Glu Ala Leu Phe Tyr Gly Thr

340 345 350

Arg Thr Met Glu Pro Tyr Arg Ile Phe Phe Pro Gly Ser His Pro Val

355 360 365

30

Arg Gly Val Gin Val Met Lys Val Gly Lys Leu Gin Leu His Gin Gly

370 375 380

Met Phe Pro Gin Ala Met Lys Asn Leu Arg Leu Ala Phe Asp Ile Met

385 390 395 400

Arg Val Thr His Gly Arg Glu His Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu

405 410 415

Leu Leu Glu Glu Cys Asp Ala Asn Ile Arg Ala Ser

10

420 425

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial 20

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 3

gcgggaggat ggagcc 16

30

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

acaacagcct caagatcatc ag

22

10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

20

<400> 5

ggccaccac tgacacgttg

20

<210> 6

<211> 23

30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ttcccgatat caacatctac cag 23

<210> 7

10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

20

<400> 7

agtgtgtgac ctcaataagg cat 23

<210> 8

<211> 24

30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

ctgccaagaa gtccggagtct ggag

24

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

10

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

cggaaattcat ggagccgcgtg aagggtggaaa ag

32

20

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

ccgctcgagg gatgctctga ttttggcgtc g

31

<210> 11

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized oligonucleotides

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(40)

<223> "n"=A, G, C or T

<400> 11

20

gggagaattc cgacacgcgt nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ctcgagcgtc tacatggatc 60

ctca

64

<210> 12

<211> 31

30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

gggttaccca gtgttgtggaa cgcgccttc g

31

10

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

20

<400> 13

gggttaccca ctcccgccgg agacttagtc c

31

<210> 14

<211> 31

30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

gggttaccct cgcattctcc tccttccttg c 31

<210> 15

<211> 31

<212> DNA 10

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

gggttacctg gtccctcctc ctccccccct g 31 20

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

gggtacctc ccgcctgcc tcccgccct c

31

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

10

220

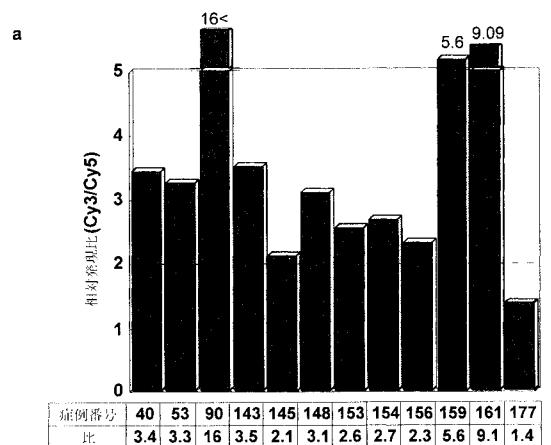
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

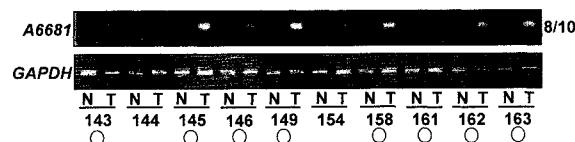
gaagatctag gtggcctgtc gtccggtctg g

31

〔図1〕



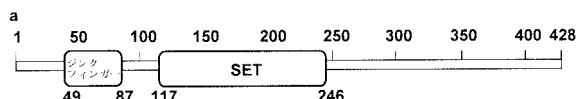
b



C



【図2】



		A
ZNF35A1 : 1	MEPLKVEKFATANRGNLRAVTPLRPGEELLFRSPLAYTVCKGSRGVCDRCLLGKEKL M 60	
	ME LKEKF TANRGNLRAV PLRPGEELLFRSPLAYTVCKGSRGVCDRCLLGKEKL	
AK010447: 1	MEALKVEFFTANRGNLRAVPLRPGEELLFRSPLAYTVCKGSRGVCDRCLLGKEKL M 60	
ZNF35A1 : 61	RCSQCRVAKYCSACKQKANPDHKRECKLKSCKPRYPDPSSVRLGRVFKLMDGAPSES 120	
	RCSQCR-AKYCSACKQKANPDH+REC CLKSCKPRYPDPSSVRLGRV+ KLM0 PSES	B
AK010447: 61	RCSQCRIAKYCSACKQKANPDHRECCSCLSKCKPRYPDPSSVRLGRVIVKLMDKEPSES 120	
ZNF35A1 : 121	EKLYSFYDLESNINKLTEDKKGRLQVMTFOHQHFMREEIYQDASQLPPAFDLFEAFAKVIC 180	
	EKLYSFYDLESNI-KLTEDKKGRLQ MTOHQHFMREEIYQDASLP+PDLFEAFAKVIC	
AK010447: 121	EKLYSFYDLESNI-TEDKKGRLQ MTOHQHFMREEIYQDASLP+PDLFEAFAKVIC 180	

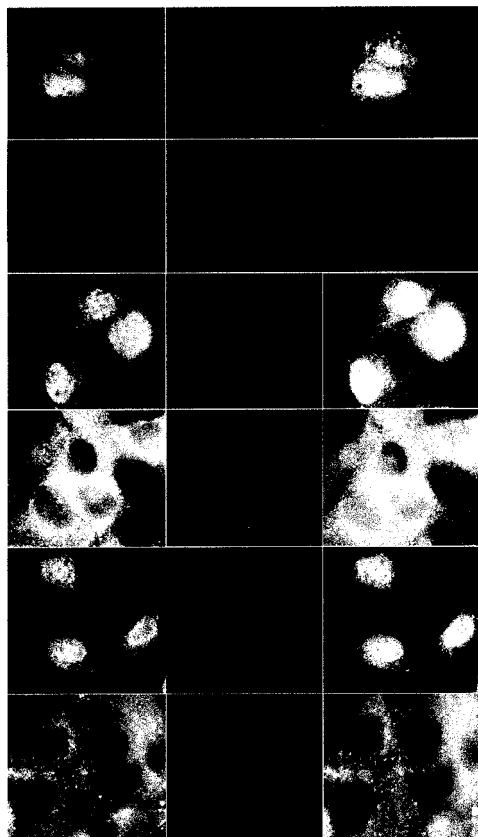
ZNPN3A1 : 181 NSFTICNAEQEVGVGLYPS1SLNHSOPNC5VFNGPHLLRRAVRDIEGGEELTCYL 240
NSFTICNAEQEVGVGLYPS+SLNHSOPNC5VFNGPHLLRRAVR+IE GEELTCYL
AK010447: 181 NSFTICNAEQEVGVGLYPSMSLNLNSHSDOPNC5VFNGPHLLRRAVREIEAGEELTCYL 240

ZNPN3A1 : 241 DMLMTSEERRKQLRQDYCFECDFCRCTQDKADAMLTGDEQWKEVEQSLSKKIELKAHN 300

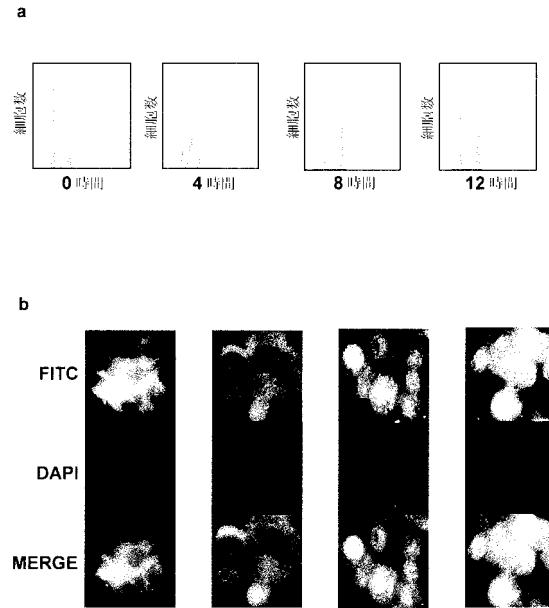
AK010447: 241 DMLMTSEERRKQLRQYCFECDCIRCQTQDKDADMLTGDEQWKEVQE5KLKIEELKAHN 300
ZNFN3A1 : 301 KNEQVLAMCQAIISNSNERLPDINIQYLKVLDACMADCINLGLEEALFYGTRTEPYRI 360
KWEQVLWA+CQAIIS+SNS RLDPDINIQYLKVLDACMADCINLG+LEEALFY RTMEPYRI

ZNF33A1 : 361 FFPGSHPVGVQVMKVLQLHQGMFPQAMKNRLAFD1IMVRTHGREHSLIEDLILLLEE 420
 FFPGSHPVGVQVMKVLQLHQGMFPQAMKNRLAFD1IMVRTHGREHSLIEDLILLLEE
AK010447: 361 FFPGSHPVGVQVMKVLQLHQGMFPQAMKNRLAFD1IMVKVTHGREHSLIEDLILLLEE 420

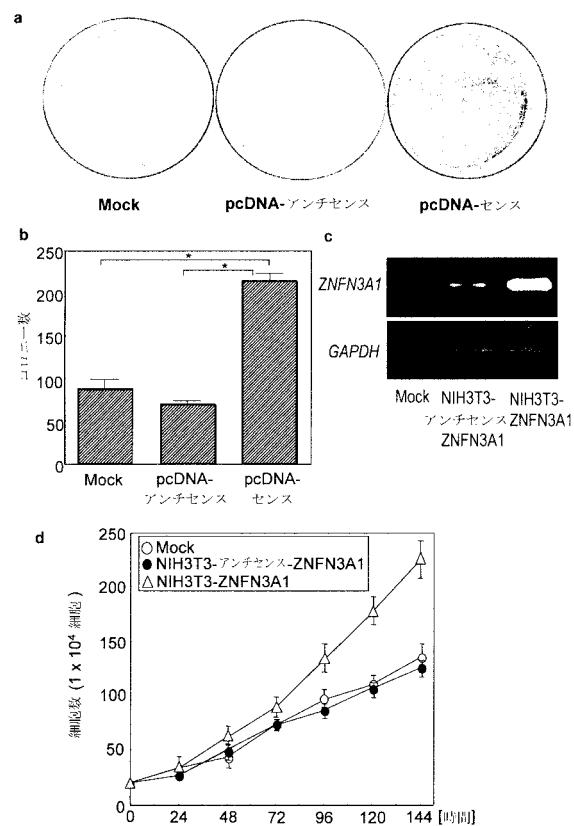
【図3】



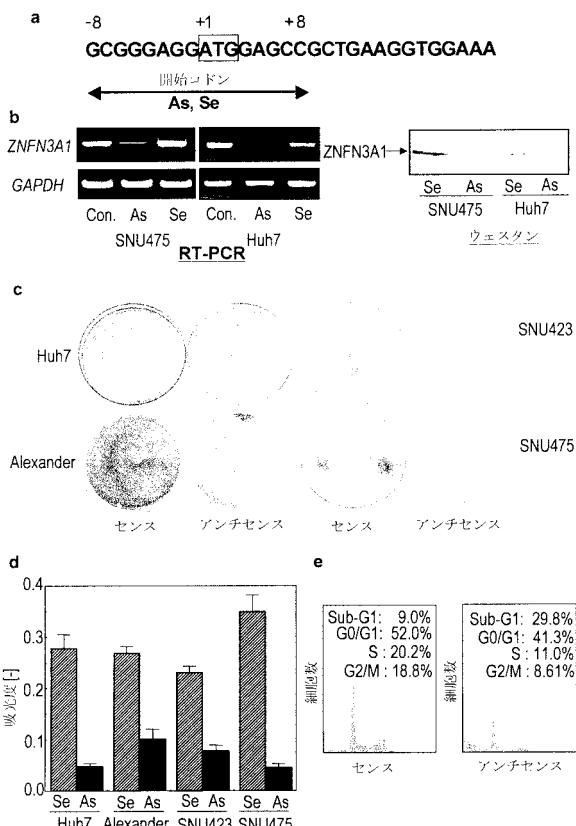
【図4】



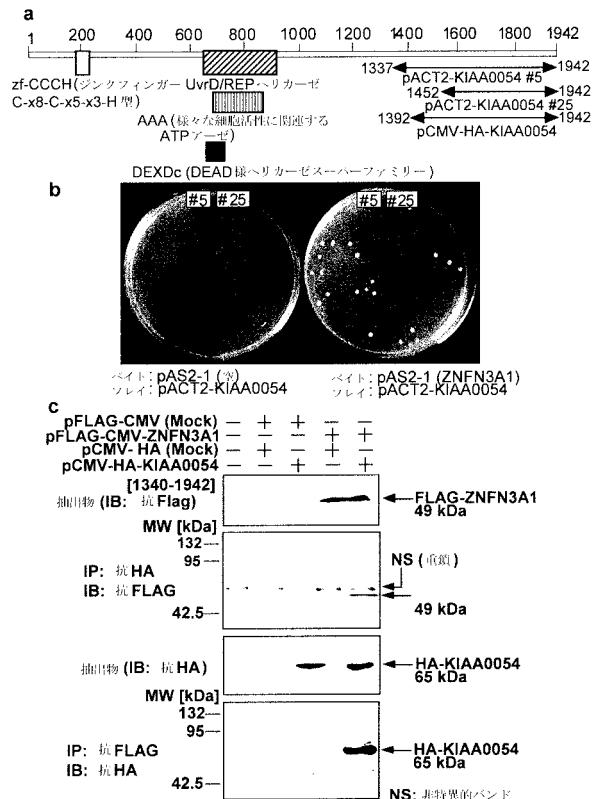
【図5】



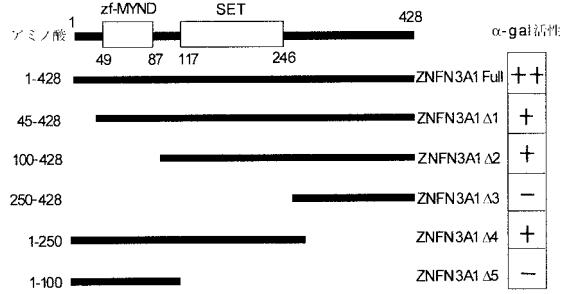
【図6】



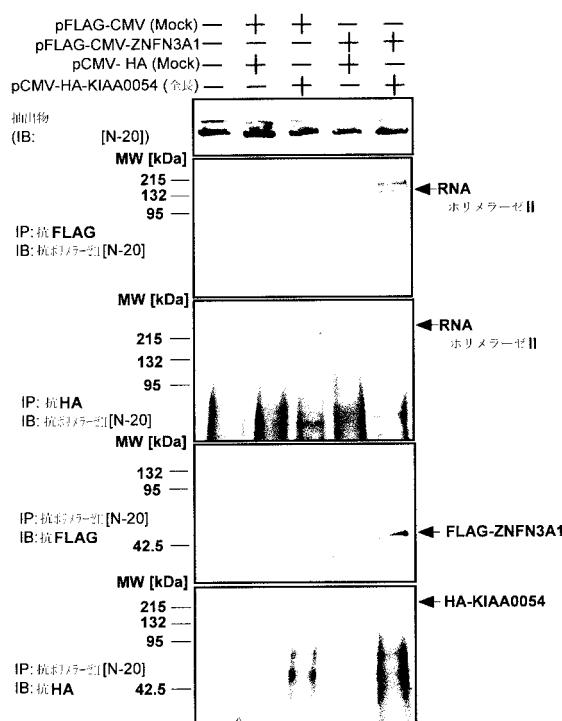
【図7】



【図8】



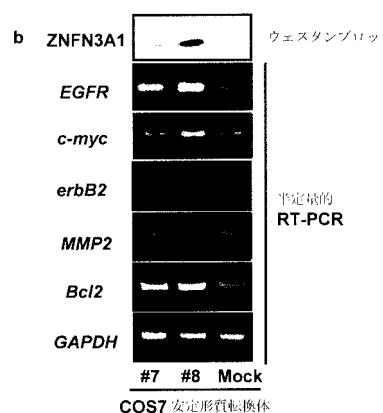
【図9】



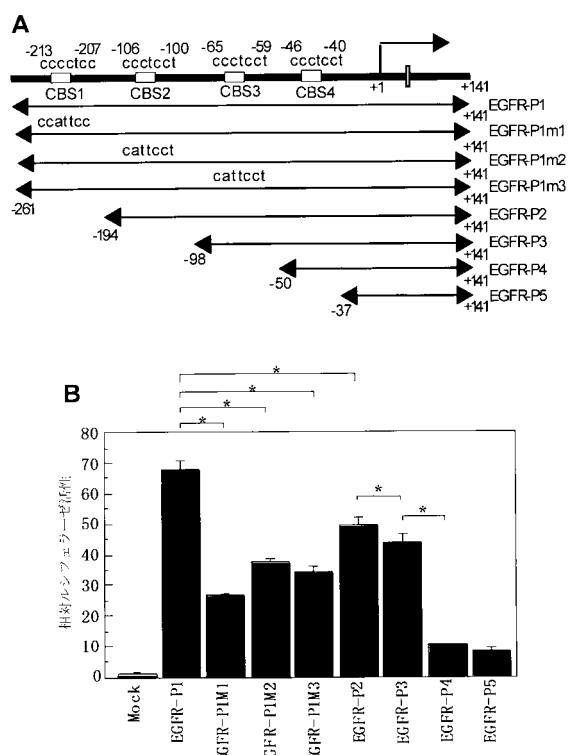
【図10】

a

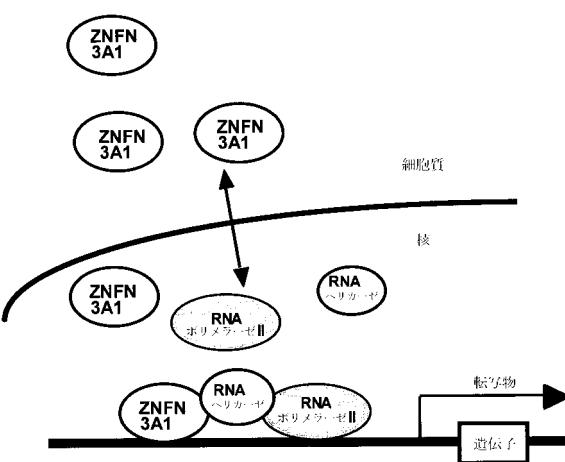
	実験上の確率	理論上の確率	実験上 理論上
C C C T C	(37.0%)	0.015 (1.5%)	24.6
C C C T C C	(34.8%)	0.0034 (0.34%)	102.3
C C C C T C C	(20.7%)	0.00079 (0.079%)	262
C C C T C C T	(20.0%)	0.00079 (0.079%)	253
(C) C C C T C C (T) (10.6%)		0.00018 (0.018%)	589
(A) G G A G G G (G) (10.6%)		0.00018 (0.018%)	589



【図11】



【図12】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z

(31)優先権主張番号 2,399,569

(32)優先日 平成14年8月23日(2002.8.23)

(33)優先権主張国 カナダ(CA)

特許法第30条第1項適用 平成14年8月25日日本癌学会発行の「第61回日本癌学会総会記事」にて発表

(56)参考文献 国際公開第00/044900(WO, A1)

国際公開第01/053456(WO, A1)

Cell, 90 (1997) p.1107-1112

J Virol., 67[12] (1993) p.6965-6972

第60回日本癌学会総会記事, (2001.08.25発行) p.117(208)

Oncogene, 19 (2000) p.351-357

Mol Cell Biol., 20[7] p.4900-4909

Cancer Res., 61 (2001 Mar) p.2129-2137

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)