

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4614473号
(P4614473)

(45) 発行日 平成23年1月19日(2011.1.19)

(24) 登録日 平成22年10月29日(2010.10.29)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/715 (2006.01)	C O 7 K 14/715	
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	
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	

請求項の数 23 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-532370
(86) (22) 出願日	平成10年1月15日(1998.1.15)
(65) 公表番号	特表2001-508306(P2001-508306A)
(43) 公表日	平成13年6月26日(2001.6.26)
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/000671
(87) 国際公開番号	W01998/031796
(87) 国際公開日	平成10年7月23日(1998.7.23)
審査請求日	平成16年12月2日(2004.12.2)
(31) 優先権主張番号	60/035,636
(32) 優先日	平成9年1月15日(1997.1.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	イエダ リサーチ アンド ディベロッ メント カンパニー リミテッド イスラエル国、76100 レホボト、ピ ーオーボックス 95 (番地なし)
(74) 代理人	弁理士 河村 洸
(74) 代理人	弁理士 藤森 洋介
(74) 代理人	弁理士 谷 征史
(74) 代理人	弁理士 佐木 啓二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規なIFN受容体1結合タンパク質、それらをコードするDNA、およびインターフェロンに対する細胞応答の調節方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えDNA分子であって、IFN- またはIFN- により誘導されうりかつ配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むIFNAR1受容体結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列からなる組換えDNA分子。

【請求項2】

さらにセンス配向でIFNAR1受容体結合タンパク質をコードする前記配列に作動可能に連結されているプロモーターを含み、組換えDNA分子が適当な発現宿主内にあるとき前記プロモーターが前記タンパク質を発現することができる請求の範囲第1項記載の組換えDNA分子。

【請求項3】

前記プロモーターがヒト細胞における強力な構成的プロモーターである請求の範囲第2項記載の組換えDNA分子。

【請求項4】

前記プロモーターがインターフェロン誘導性プロモーターである請求の範囲第2項記載の組換えDNA分子。

【請求項5】

前記ヌクレオチド配列が配列番号1または配列番号7である請求の範囲第1項記載の組換えDNA分子。

【請求項6】

組換えDNA分子であって、センスまたはアンチセンス配向のいずれかで配列番号1または配列番号7のヌクレオチド配列を含むDNA分子、またはアンチセンス配向で配列番号12のヌクレオチド配列を含み、インターフェロン誘導性IFNAR1受容体結合タンパク質をコードするmRNAの発現を抑制することができる配列番号7の断片である組換えDNA分子。

【請求項7】

前記配列がセンス配向である請求の範囲第6項記載の組換えDNA分子。

【請求項8】

前記配列がアンチセンス配向である請求の範囲第6項記載の組換えDNA分子。

【請求項9】

組換えRNA分子であって、請求の範囲第6項記載の前記DNA分子の配列に相当する配列である組換えRNA分子。

【請求項10】

前記配列がセンス配向である請求の範囲第9項記載の組換えRNA分子。

【請求項11】

前記配列がアンチセンス配向である請求の範囲第9項記載の組換えRNA分子。

【請求項12】

さらにアンチセンス配向で前記配列に作動可能に連結されているプロモーターを含む組換えDNA分子からなる請求の範囲第8項記載の組換えDNA分子。

【請求項13】

前記配列が配列番号7の5'末端由来の配列番号12のヌクレオチド配列を含む部分である請求の範囲第12項記載の組換えDNA分子。

【請求項14】

前記プロモーターがインターフェロン誘導性プロモーターである請求の範囲第12項記載の組換えDNA分子。

【請求項15】

請求の範囲第1項～第5項のいずれかひとつに記載の組換えDNA分子を含む発現ベクター。

【請求項16】

請求の範囲第6項～第8項および第12項～第14項のいずれかひとつに記載の組換えDNA分子を含む発現ベクター。

【請求項17】

請求の範囲第15項記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項18】

請求の範囲第16項記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項19】

配列番号12のヌクレオチド配列からなる組換えDNA分子を含む発現ベクターを含む組織移植体の生存を延長するための薬剤。

【請求項20】

配列番号2または配列番号8の配列を含むIFNAR1結合タンパク質。

【請求項21】

請求の範囲第20項記載のIFNAR1結合タンパク質に特異的な抗体の可変部を含む分子。

【請求項22】

モノクローナル抗体からなる請求の範囲第21項記載の分子。

【請求項23】

IFNAR1受容体結合タンパク質を提供する方法であって、請求の範囲第1項記載のDNAを適当な発現宿主に前記タンパク質の発現が前記宿主の培養の際えられうる方法で導入し、前記タンパク質の発現をえるために前記宿主を培養することからなるIFNAR1受容体結合タンパク質を提供する方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

発明の技術分野

この発明は、一般に、インターフェロン作用の分子機構に関し、さらに詳しくは、新規なインターフェロン受容体1結合タンパク質、それらをコードする組換えDNA分子、およびインターフェロンに対する細胞応答の調節方法に関する。

発明の背景

I型インターフェロン類(I F N - サブタイプとI F N - サブタイプ)は、細胞に対して、ウイルス複製の阻害(抗ウイルス作用)、細胞増殖の阻害(抗腫瘍作用)、および免疫細胞の活性の調節(免疫調節作用)などの多面的作用を示す。インターフェロン(I F N)のこれら多くの作用は、細胞の形態学および生化学的な変化に関連している(レ

10

ベル(Revel)の1984年の報告、総説)。
 インターフェロンは、種特異的受容体を通じてその活性を発揮する。I型インターフェロン類の場合、2つの膜貫通受容体鎖(transmembranal receptor chains)、すなわちI F N A R 1(ウゼ(Uze)らの1990年の報告)およびI F N A R 2 - 2(またはI F N A R 2 - c、ドマンスキー(Domanski)らの1995年の報告)が確認されている。I F N - , , により生ずるシグナル伝達には、ヤーヌス(Janus)キナーゼ(Jak)ファミリーのタンパク質チロシンキナーゼおよびstatt(Stat)ファミリーの転写因子が関与する(ダーネル(Darnell)らの1994年の報告)。Jak - Stat経路のタンパク質は、I F N A R 1とI F N A R 2の受容体鎖の細胞質内(IC)ドメインに結合することによって活性化される。I F N A R 1のICドメインに結合するタンパク質としてはtyk2とStat2がある(アブラモヴィック(Abramovich)らの1994年の報告)。Stat2はStat1をともなって、I F N誘導ISGF3転写複合体を生成し、この複合体はI F N誘導型遺伝子を活性化する(レヌン(Lenung)らの1995年の報告)。Stat3を含有する転写複合体もI F N - によって誘導され(ハーロック(Harroch)らの1994年の報告)、そしてStat3のI F N依存性のI F N A R 1 - ICに対する結合が観察された(ヤン(Yang)らの1996年の報告)。タンパク質チロシンホスファターゼのPTP1CとPTP1Dは、I F Nが付加する際、I F N A R 1と可逆的に結合する(デビッド(David)らの1995年aの報告)。加えて、2つのセリン/トレオニンタンパク質キナーゼである48KDaのERK2MAPキナーゼ(デビ

20

30

ッド(David)らの1995年bの報告)およびcAMP活性化タンパク質キナーゼA(デビッド(David)らの1996年の報告)は、I F N A R 1 - ICの単離された膜近位の50残基に結合する。したがって、I型I F N受容体のICドメインは、細胞に対するI F Nの生物学的作用を生成させそして調節する働きをする多くのタンパク質の結合部位として働く。
 酵母におけるツーハイブリッドスクリーニング(two-hybrid screening)は、特定のポリペプチド配列に結合する新しいタンパク質を同定する有力な方法である(フィールズ(Fields)とソング(Song)の1989年の報告)。要約すると、ツーハイブリッドスクリーニングは、(a)特定のポリペプチド(ベイト(bait))がGal4転写因子のDNA結合ドメインに融合されているプラスミドDNAおよび(b)pACTプラスミド中のGal4の活性化ドメインに融合されているcDNAライブラリーを、酵母細胞にトランスフェクトすることによって実施する。そのとき、前記ポリペプチドのベイトに結合するタンパク質をコードするcDNAをトランスフェクトされた酵母細胞はGal4活性を再構成するであろう。前記ポリペプチドのベイトに結合するそのようなタンパク質の存在は、好ましくは酵母ゲノムに導入されているGAL1-1lacZ構造体から、 - ガラクトシダーゼなどの酵素の活性が発現されることによって明らかになる。この試験で陽性の酵母のクローンから、pACTプラスミドを単離して、そのインサートのヌクレオチド配列を決定しかつそれがコードするタンパク質を同定することができる。この方法によって、サイトカイン受容体のICドメインと相互に作用する新規なタンパク質を同定することが可能である(ボルディン(Boldin)らの1995

40

50

年の報告)。

この明細書でのいずれの文書の引用も、そのような文書が直接関連する従来技術であると容認するものではなく、または、本願の請求の範囲の特許性にとっての材料であるとみなすものではない。いずれの文書の内容または日付に関する陳述も、出願人が出願時に入手可能な情報に基づいており、そしてこのような陳述の正確さについては容認するものではない。

発明の要約

本発明は、IFN受容体1 (IFNAR1) 結合タンパク質であることが確認された、本明細書でIR1B1およびIR1B4と呼称される2つの新規なヒトタンパク質、ならびにこれら2つのタンパク質をコードするDNAに関する。IR1B1タンパク質とIR1B4タンパク質は各々、IFNAR1の細胞質内(IC)ドメインと相互作用し、インターフェロンに対する細胞応答を仲介する。

10

本発明は、IR1B1タンパク質またはIR1B4タンパク質のいずれか、あるいはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含有する組換えDNA分子、およびその組換えDNA分子がコードするタンパク質に関する。前記組換えDNA分子において、IR1B1タンパク質またはIR1B4タンパク質、あるいはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列が、センス配向またはアンチセンス配向のいずれかで、プロモーターに作動可能に連結されている。

センス配向で新規なIFNAR1結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する組換えDNA分子を、腫瘍中に直接投与することによって、癌の治療における外因性インターフェロン療法に対する応答が促進される。

20

さらに、本発明は、アンチセンス配向で、新規なIFNAR1結合タンパク質またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する組換え分子を、患者に移植する前に、移植組織中に導入することによって、組織移植体の生存を延長する方法に関する。

したがって、本発明はまた、このようなDNA、RNAまたはタンパク質を含有する医薬組成物および、その組成物を使用する治療法に関する。

また、本発明は、本発明の新規なタンパク質に対し特異的な抗体に関する。

【図面の簡単な説明】

図1は、酵母におけるツーハイブリッド遺伝子相互作用分析によって測定した、IR1B1とIFNAR1-ICドメインの相互作用を示す。図1の下方の四角枠内に、各種の「ベイト」と組み合わせたpACT中のcDNAインサートを示す。

30

図2は、酵母におけるツーハイブリッド遺伝子相互作用分析によって測定した、IR1B4とIFNAR1-ICドメインの相互作用を示す。図2の下方の四角枠内に、各種の「ベイト」と組み合わせたpACT中のcDNAインサートを示す。

図3は、IR1B1の、ヌクレオチド配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

図4は、IR1B1のアミノ酸配列(配列番号2)と、2つのカルシウム結合タンパク質、カルシニューリンB(略号CALB;配列番号3)およびカルトラクチン(略号CATR;配列番号4)のアミノ酸配列との相同性と配列を示す。IR1B1とCALB内またはCATR間では同一のアミノ酸は、その間の記号「|」で示してある。IR1B1とCATR間で同一であって、CALBとは同一でないものは、その間の記号「:」で示してある。太い活字で示す領域は、カルシウム結合ヘリックス-ループ-ヘリックスEFハンドのドメインである。

40

図5は、IR1B1のcDNAとハイブリッドを形成させたヒト骨髓腫U266S細胞中のIR1B1 mRNAと18SrRNA(下方ライン)、および前記細胞をIFN-8またはIFN-のいずれかで2hrまたは18hr処理した際のIR1B1の迅速かつ一時的な誘導のノーザンプロットを示す。第一ラインは、IFNによる処理なしで2hr後のコントロールである。

図6Aと6Bは、IR1B4と単離されたIFNAR1-ICドメインとのin vitro

50

roでの相互作用(図6A)およびIR1B4とヒトU266SおよびヒトU266Rの細胞膜からの細胞抽出物との*in vitro*での相互作用(図6B)を示すSDS-PAGEレーンである。図6Aにおいて、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンの標識をつけた翻訳産物であって、フラッグ(flag)-IR1B4の*in vitro*転写産物ありまたはなしのものを、抗フラッグM2ビーズで免疫沈降させたか(10 μl)(レーン1と4)、または100個のアミノ酸長のIFNAR1-ICドメインと融合したGSTと結合した(レーン2と5)、もしくはGSTのみと結合した(レーン3と6)グルタチオンビーズと反応させた(50 μl)。4で一夜インキュベートした後(最終容量100 μl)、該ビーズを洗浄し、次にSDSで溶出させたタンパク質を還元条件下で沸騰させた後、SDS-PAGEにかけた。図6Bの場合は、U266S細胞(レーン1)またはU266R細胞(レーン2)をBrij緩衝液およびアンチプロテアーゼで抽出し(アブラモヴィック(Abramovich)らの1994年の報告)、次いで0.35ml(10⁷細胞)をフラッグIR1B4転写産物の $[^{35}\text{S}]$ メチオニンの標識を付けた翻訳産物75 μl とともに4にて一夜インキュベートした。プロテインGビーズに固定化した抗IFNAR1 mAbR3(25 μl)を2.5hrかけて添加し、Brij緩衝液中で洗浄し、次にSDSで溶出させ、沸騰させ、そして還元されたタンパク質をSDS-PAGEで分析した。前記のような抗フラッグM2ビーズによるコントロールを泳動した(レーン3)。乾燥したゲルを、ホスファージャー(Phosphor-Imager)で視覚化した。図6Aの最初の3つのレーンでは、*in vitro*翻訳反応にIR1B4 mRNAを添加しなかった。図6Aの続く3つのレーンでは、フラッグタンパク質に融合させたIR1B4タンパク質をコードするmRNAを、*in vitro*の系で翻訳した。図7は、IR1B4のヌクレオチド配列(配列番号7)とそれから導き出されるアミノ酸配列(配列番号8)を示す。

図8は、IR1B4のアミノ酸配列(配列番号8)とPRMT1のアミノ酸配列(配列番号9)およびそれらの差を示す。

図9は、IR1B4のアミノ酸配列とHCP-1のアミノ酸配列(配列番号10)およびそれらの差を示す。

図10はメチルトランスフェラーゼアッセイを示す。U266S細胞の抽出物を、プロテインAと抗IFNAR1抗体でコートしたビーズと反応させるか(レーン1)またはプロテインAだけでコートしたビーズと反応させた(レーン2)。メチルトランスフェラーゼ活性を、ヒストンに¹⁴C(メチル)-S-アデノシルメチオニンで標識を付け次いでSDS-PAGEによる電気泳動法でヒストンバンド中の放射能を分析することによって測定した。

図11は、U266S細胞内のタンパク質-アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性のアッセイを示す。レーン1では、ヒトU266S細胞のタンパク質-アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性を、配列番号11の配列を有するペプチドR1をメチル化することによって測定した。レーン2では、IR1B4 cDNAの開始コドンのまわりのヌクレオチド12-33の配列に相補的な配列番号12のアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加した。レーン3では、対応するセンスオリゴヌクレオチドを添加した。アンチセンスオリゴヌクレオチドはタンパク質-アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性を実質的に阻害するが、コントロールのセンスオリゴヌクレオチドはほとんど作用しないことが分かる。

図12は、図11で使用したアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-1)、対応するセンスオリゴヌクレオチド(S-3)、およびIR1B4 cDNAの中央部にかかわる他のアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-2)の存在下または非存在下でのIFN-による処理にตอบสนองするヒトU266S細胞の増殖阻害を示すグラフである。細胞密度を、アラマブルー(Alamar Blue)を用いる発色試験で定量し(実施例7参照)、細胞密度の減少を、未処理のコントロールウェルに対する%で計算して増殖阻害としてプロットした。

発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

本発明は、I型インターフェロン（IFN- α 、または β ）受容体のIFNAR1鎖の細胞質内ドメイン（IC）と相互作用し、本明細書ではIFN受容体結合タンパク質1（IR1B1）およびIFN受容体結合タンパク質4（IR1B4）と呼ばれる2つの新規なヒトタンパク質の発見に関する。これら2つの新規なタンパク質とIFNAR1との相互作用は、酵母におけるツーハイブリッド遺伝子試験によって示した。この試験では、酵母のレポーターストレインSFY526（バーテル（Bartel）らの1993年の報告）に、Gal4活性化ドメインに融合させたIR1B1またはIR1B4のcDNAをトランスフェクトすると、IFNAR1-ICドメイン（Gal4DNA結合ドメインに融合されている）がベイトとして使用されたときのみ β -ガラクトシダーゼ活性がもたらされた。

10

IR1B1 cDNAの配列は191個のアミノ酸ポリペプチドをコードしている。配列データベースのコンピュータサーチでは、IR1B1が、カルシウム結合タンパク質であるカルシニューリン およびカルトラクチンに対して、たとえばカルシウム結合部位（E-Fハンドル）と著しい相同性を示す新規なタンパク質であることが明らかになった。カルシニューリン（ゲリーニ（Guertini）らの1989年の報告）は、セリン/トレオニンホスファターゼの19kDaのサブユニットであり、転写因子NFATの、T-リンパ球の核へのトランスロケーションを活性化する際に重要な役割を演じ、かつシクロスポリンなどの免疫抑制剤によって阻害される。カルトラクチン（リー（Lee）とファン（Huang）の1993年の報告）は、21kDaのタンパク質であって、中心体内に見られる細胞骨格関連タンパク質であり、そして、有糸分裂中の染色体の運動に関与しており、より一般的には、微小管形成中心に関与している。したがって、新規なIR1B1タンパク質は、カルシウム調節タンパク質のカルシニューリンおよびカルトラクチンのファミリーの新しいメンバーである。

20

驚くべきことに、IR1B1の遺伝子は、ヒト細胞内で、IFNによる処理によって迅速に活性化されることが発見された。したがって、これは、IFNによって誘導されるカルシウム結合タンパク質の最初の例である。カルシウムイオンは細胞の形態、接着および分裂を調節するので、細胞内のIR1B1活性の調節は、正常細胞と悪性細胞のIFNに対する応答に影響しうる。細胞におけるIFNの作用を仲介するIR1B1の役割は、IR1B1と、IFN受容体鎖のICドメインとの相互作用によって維持される。

IR1B4は、IR1B1と同様に、配列データベースのコンピュータサーチによって確認したところ、新規なタンパク質であることが発見されたが、IR1B4は、S-アデノシルメチオニンを利用して、タンパク質中のアルギニン残基をメチル化し、タンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ（PRMT1；カガン（Kagan）とクラーク（Clarke）の1994年の報告；リン（Lin）らの1996年の報告）と呼ばれている酵素に対して配列の相同性を有することも発見された。IR1B4は、*in vitro*で、IFNAR1のICドメインに直接、結合することが発見され、そして、PRMTの活性とヒト細胞から単離されたIFN- α 、受容体のIFNAR鎖との構造的関連がヒストンのメチル化によって示された。IR1B4 cDNA由来のアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドをヒト細胞培養物に添加したとき、細胞培養物内のPRMT活性が消失することが観察された。この方式で処理したヒト骨髄腫細胞は、増殖阻害で測定したところ、IFNに対する応答が著しく低下することを示した。したがって、IR1B4/PRMTは、IFN受容体が腫瘍細胞の増殖阻害を起こす経路に関与し、またIFN受容体の他の機能にも関与している。PRMTの公知の基質には、多くのRNAとDNAの結合タンパク質およびとくに異種核リボ核タンパク質（hnRNP）がある。hnRNPは、核から細胞質へのmRNAの輸送、プレmRNAの選択的スプライシング、および転写後の調節に関与している（リウ（Liu）とドレイファス（Dreyfuss）の1995年の報告）。したがって、新規なヒトIR1B4/PRMTのcDNAとタンパク質は、そのIFN受容体との関連によって発見されたが、ヒトまたは動物の細胞のIFNに対する応答を変化させるために使用できる。

30

40

本発明による組換えDNA分子は、IR1B1またはIR1B4のタンパク質あるいはそ

50

のフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでおり、そしてIR1B1またはIR1B4のcDNAの発現を増大することによってIFNに対する細胞応答を増大し、またはアンチセンスRNA分子によってIR1B1またはIR1B4のタンパク質の発現を減らすことによってIFNに対する細胞応答を減らすために使用することができる。

IR1B1またはIR1B4のcDNAの*in vivo*での発現が増大することは、癌の治療法に有用であろう。この場合、IFNに対する細胞応答の増大は悪性細胞の増殖の減少をもたらす、かつ外因性IFN療法に対する応答が高まる。IFNに対する細胞応答を増大させるため、標的部位に、IR1B1とIR1B4の*in vivo*での発現を増大させるため、強力な構成的プロモーターにセンス配向で作動可能に連結されたIR1B1またはIR1B4のcDNAを含有する発現ベクターを、標的部位に、たとえば脳腫瘍または転移性腫瘍の小結節（たとえば骨髄腫または乳癌）中に、直接注入しても良い。

逆に、IR1B1またはIR1B4のタンパク質の*in vivo*での発現の減少は、組織移植体の生存を延長するのに有用であろう。というのは、これら移植体の宿主内での拒絶反応は、その合成がIFNの刺激に依存している組織適合性抗原（MHCクラス1）によって仲介されるからである。適切なベクターに保持されかつプロモーターにアンチセンス配向で作動可能に連結されている、IR1B1またはIR1B4、あるいはそのフラグメントのcDNAが、移植される組織の細胞中に導入されると、アンチセンスRNAの発現は、IR1B1またはIR1B4のmRNA（またはIR1B1/IR1B4のセンスRNA）の分解をもたらす、そのためIR1B1またはIR1B4のタンパク質の細胞レベルが低下する。

アンチセンスRNAは、アンチセンス方向、すなわち、DNAおよびその転写されたセンスRNA（mRNA）の正常またはセンス方向と逆方向に配向されたコード配列に作動可能に連結された上流のプロモーターから転写される。前記センスRNAに相補的なアンチセンスRNAを発現させることは、RNA分子の生物学的機能を調節する強力な方法である。センスRNAとアンチセンスRNAの安定な二重らせんの生成を通じて、正常またはセンスRNAの転写産物は不活性になり、翻訳できなくなる。

本発明の実施態様としての組換えDNA分子は、センス配向またはアンチセンス配向で、プロモーターに作動可能に連結されたIR1B1またはIR1B4、あるいはそのフラグメントのcDNAを含有している。用語「プロモーター」は、RNAポリメラーゼに結合して、「作動可能に連結した」核酸配列の転写を促進できる二本鎖のDNAまたはRNAの配列を含むものとする。したがって、プロモーターが、DNA配列の配向のいかんにかかわらずそのDNA配列を転写できる場合、そのDNA配列はプロモーターの配列に作動可能に連結されているであろう。

転写を調節するために使用されるタイプのプロモーターは、宿主/標的の細胞内で機能するタイプのプロモーターである。哺乳類の細胞内で機能するプロモーターの例としては、SV40初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペス（HSV）チミジンキナーゼプロモーター、ラウス肉腫（RSV）LTRプロモーター、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）極初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス（MMTV）LTRプロモーター、インターフェロンプロモーター、熱ショックタンパク質70（hsp70）プロモーターおよび当該技術分野で公知の他の多くのプロモーターがある。

IR1B1またはIR1B4のタンパク質の発現のため、センス配向でIR1B1またはIR1B4のcDNAに作動可能に連結されたプロモーターは、強力な構成的（constitutive）プロモーターが好ましい。このプロモーターによって、IR1B1またはIR1B4の発現を調節する内因性細胞機構の存在にかかわらず、高レベルのIR1B1またはIR1B4を得ることができる。

同様に、アンチセンス配向でIR1B1またはIR1B4のcDNAに作動可能に連結されているプロモーターは強力なプロモーターが好ましく、たとえば、エプスタイン・バー・ウイルス（Epstein-Barr Virus）（EBV）中に存在し、高レベルでアンチセンスRNAを発現できる領域を調節するプロモーターがある（ダイス（Deiss）とキムチ（Kimchi）の1991年の報告）。

10

20

30

40

50

前記アンチセンス配列は、宿主ノ標的の細胞、好ましくはヒトの細胞内でのみ発現可能であることが好ましく、かつ発現されたアンチセンスRNAは安定でなければならない(すなわち迅速には分解されない)。そのアンチセンスRNAは、宿主ノ標的細胞内で発現されたセンスmRNAとのみ特異的にハイブリッドを形成して、本質的に、翻訳できない安定な二本鎖RNA分子を生成しなければならない。換言すれば、宿主ノ標的細胞内で発現されたアンチセンスRNAは、発現されたセンスmRNAがIR1B1またはIR1B4のタンパク質に翻訳されるのを阻害する。ベクターが保持するアンチセンス配列は、そのアンチセンス部分がセンスmRNAとハイブリッドを形成して、IR1B1またはIR1B4のタンパク質に翻訳されるのを阻害できる限り、IR1B1またはIR1B4の全cDNA配列あるいはその一部分だけを保有していればよい。したがって、この明細書と請求の範囲を通じて使用される「アンチセンス」配列は、形質転換ノトランスフェクションがなされた細胞内で発現することができ、かつIR1B1もしくはIR1B4の「センス」mRNAと特異的にハイブリッドを形成して翻訳できない二本鎖RNA分子を生成できる全アンチセンス配列またはその一部分と定義する。

アンチセンス配列は、IR1B1またはIR1B4のmRNAの全長とハイブリッドを形成する必要はない。代わりに、アンチセンス配列は、「センス」mRNAの5'-非翻訳非コード配列、コード配列または3'-非翻訳配列などの選択された領域とハイブリッドを形成すればよい。アンチセンス配列は、たとえばキャップおよび開始コドン部位における、5'-コード配列および/または5'-非コード領域とハイブリッドを形成することが好ましい。というのは、開始コドンを標的にすることがより効率的であり、一方、コード領域内の内部配列を標的にすることは効率的でないことがアンチセンスオリゴヌクレオチドの多数の例で観察されているからである(ウィックストロム(Wickstrom)の1991年の報告)。IR1B4のセンスmRNAの翻訳を阻害するアンチセンス配列の有効性は、実施例7に記載されている、U266S細胞におけるタンパク質-アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性のアッセイで容易に試験できる。哺乳類のゲノムの大きさからみて、アンチセンスのIR1B1またはIR1B4の配列は、長さが、好ましくは少なくとも17塩基対であり、より好ましくは少なくとも30塩基対である。しかし、さらに短い配列が有用なこともあるかもしれず、すなわち、このような配列は、他の哺乳類の配列とハイブリッドを偶発的に形成することはなく、またはこのような「交差ハイブリッド形成」は、この発明の目的の達成を阻害する方式および程度において細胞の代謝を阻害しない。

好ましいハイブリッド形成標的と好ましいアンチセンス配列の長さは、組織的な実験によって容易に決定できる。オースベル(Ausubel)ら編集、Current Protocols in Molecular Biology、米国ニューヨーク州ニューヨーク、Greene Publishing Assoc. 1987~1996年、およびサンブルック(Sambrook)ら著、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、Cold Spring Harbor Press(1989年)などに記載の標準の方法を利用して、ベクターから、アンチセンス配列の徐々に長い部分を組織的に取り出すことができる。全長のアンチセンス配列のみならず、好ましくは、アンチセンス配列の5'末端において、少しずつ欠失させた一連のものを生成させてもよい。このようにして、好ましくはセンスmRNAの5'末端に相補的なまの一端の末端切断型のアンチセンス配列を形成し、その結果、センスmRNAの5'末端が二本鎖であり(アンチセンスRNAの3'末端を相補する)かつ翻訳できないままであるRNA分子が生成する。さらに、たとえばオリゴヌクレオチドAS-1(配列番号12)のようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、化学的に容易に合成することができ、そしてプロモーターと作動可能に連結してベクター中に導入し、IR1B1またはIR1B4のタンパク質のin vivo細胞発現を減らすのに使用される。

本発明のベクターは、当該技術分野で公知のエピソームの、複製可能なまたは染色体に組み込むことができるベクターなどの、哺乳類細胞にトランスフェクトするのに通常用いら

10

20

30

40

50

れる適切な真核ベクターまたは原核ベクターであってよい。IR1B1またはIR1B4のアンチセンスRNAを発現させるのに特に好ましいベクターは、プロモーターとして働くエプスタイン・バー・ウイルス調節領域(ダイス(Deiss)とキムチ(Kimchi)の1991年の報告)を含有するエピソームのプラスミドであり、このプロモーターは、前記調節領域に対しアンチセンス配向で配置されたIR1B1またはIR1B4のcDNAに作動可能に連結されている。アンチセンスベクターおよびオリゴヌクレオチドのホスホロチオエートの使用は、ビーイーフーバー(B.E.Huber)およびジェイエスラゾ(J.S.Lazo)編、Annals of the New York of Sciences: Gene Therapy for Neoplastic Diseases、716巻、1994年(たとえばミリガン(Milligan)らの報告、228~241頁)に記載されている。

10

本発明によれば、IFNに対する細胞の応答を減らすことによって、移植を必要とする患者に移植される組織または器官の生存を延長することができる。移植組織の拒絶反応は組織適合性抗原によって仲介され、これらMHCクラスI抗原の合成はIFNの刺激に依存している。したがって、IFNの刺激に対する細胞応答が低下すると、移植組織の生存が延長されるであろう。本発明による組織移植体の生存を延長する方法には、患者に移植すべき組織または器官の細胞に、アンチセンス配向でプロモーターに作動可能に連結されたIR1B1またはIR1B4のcDNA配列あるいはそのフラグメントを含有する組換えDNA分子を導入することが関与しており、その結果、アンチセンスのIR1B1またはIR1B4のRNAが、そのようなトランスフェクトされた細胞/形質転換細胞の中で発現される。その組換えDNA分子は、前記目的に適した当該技術分野で公知の方法で組織または器官の細胞内に導入されうる。組換えDNA分子の組織または器官の細胞中への導入につづき、その組織または器官を、そのような移植を必要とする患者に移植できる。

20

発現ベクターであり、かつセンス配向でプロモーターに作動可能に連結されたIR1B1またはIR1B4のcDNAを保有する組換えDNA分子を含有する医薬組成物は、腫瘍、たとえば脳腫瘍および転移性腫瘍の小結節中に直接、注射して、これら腫瘍内の細胞を、癌の治療法としての外因性IFN療法に対してより応答性を高くすることができる。外因性IFN療法に対する細胞の応答性が高められると、悪性の細胞の増殖が阻止されるであろう。

in vivoまたはex vivoでの遺伝子導入(gene transfer)はよく報告されている。すなわちAnnals of the New York of Sciences: Gene Therapy for Neoplastic Diseases、716巻、1994年における、たとえばジエイブラウツ(G.E.Plautz)の“Direct Gene Transfer for the Understanding and Treatment of Human Disease”(144~153頁)およびレーマー(Roemer)らの“Mechanism of Action of the p53 Tumor suppressor and Prospects for Cancer Gene Therapy by Reconstitution of p53 Function”(265~282頁)がある。移植すべき組織または器官あるいは腫瘍の細胞中に組換えDNA分子を挿入する方法としては、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス関連ウイルス(AAV)のベクターならびに直接DNA注射またはオリゴヌクレオチド-リポソーム注射がある。レトロウイルスベクターを脳腫瘍に注射するとか、またはアデノウイルスを用いてのう胞性線維症の患者の上気道細胞に感染させる臨床試験がよく知られている。

30

40

作動可能に連結されているプロモーターに対しセンス配向またはアンチセンス配向でIR1B1またはIR1B4のcDNAあるいはそのフラグメントをコードする組換えDNA分子を含有する医薬組成物には、前記組換えDNA分子をその目的を達成するのに有効な量で含有しているすべての組成物が含まれる。さらに、該医薬組成物は、前記組換えDNA分子を安定化するかまたはそれを投与しやすくするのに適切な薬学的に許容されうる担体または賦形剤を含有してよい。

50

本発明の他の実施態様は、生検試料から得られる腫瘍組織中のIR1B1またはIR1B4のタンパク質のレベルをアッセイする免疫検出法などの診断法、またはタンパク質のアフィニティークロマトグラフィーによる精製に用いられる、IFNAR1結合タンパク質のIR1B1またはIR1B4あるいはそのフラグメントに対して特異的な抗体の抗原結合部分を含有する分子に関する。

用語「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、キメラ抗体、抗イディオタイプ(anti-id)抗体、一本鎖抗体、および組換えで製造されたヒト化抗体、ならびに公知の方法であるが限定されないたとえば酵素的開裂法、ペプチド合成法または組換え法で提供される、前記抗体の活性画分が含まれるものとする。

ポリクローナル抗体は、抗原で免疫性を与えられた動物の血清由来の、抗体分子の不均質集団である。モノクローナル抗体は、抗原に対し特異的な抗体の実質的に均質の集団を含有し、その集団は実質的に同じエピトープ結合部位を含有している。mAbは当業者にとって公知の方法で得てよい。たとえば、コーラー(Kohler)およびミルスタイン(Milstein), Nature, 256巻495~497頁、1975年; 米国特許第4,376,110号; オースベル(Ausubel)ら編、前掲文献、ハーロー(Harlow)およびレーン(Lane)、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory (1988年); およびコリガン(Colligan)ら編、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、米国ニューヨーク、Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1992年、1993年)参照。なおこれら引用文献の内容はすべて本明細書に援用するものである。これら抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、GILDおよびそれらのサブクラスを含む免疫グロブリンクラスの抗体である。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitro、in situまたはin vivoで培養してよい。in vivoまたはin situで高い力価のmAbを産生すれば、現時点で好ましい製造法になる。

キメラ抗体は、その異なる部分が異なる動物種由来である分子であり、たとえばマウス(murine)mAb由来の可変部およびヒト免疫グロブリンの定常部を有する抗体がある。キメラ抗体は、主として、使用時に免疫原性を減らしかつ産生中、収率を高くするために使用され、たとえば、マウスmAbはハイブリドーマから高い収率で得られるがヒト内では免疫原性が高いのでヒト/マウスキメラmAbが使用される。キメラ抗体およびその製造法は当該技術分野で公知である(カビリ(Cabilly)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81巻3273~3277頁、1984年; モリソン(Morrison)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81巻6851~6855頁、1984年; ブリアン(Boulianne)ら、Nature、312巻643~646頁、1984年; カビリ(Cabilly)ら、欧州特許願第125023号(1984年11月14日付けで公開); ニューバーガー(Neuberger)ら、Nature、314巻268~270頁、1985年; タニグチ(Taniguchi)ら、欧州特許願第171496号(1985年2月19日付け公開); モリソン(Morrison)ら、欧州特許願第173494号(1986年3月5日付け公開); ニューバーガー(Neuberger)ら、PCT特許願WO8601533号(1986年3月13日付け公開); クドー(Kudo)ら、欧州特許願第184187号(1986年6月11日付け公開); モリソン(Morrison)ら、欧州特許願第173494号(1986年3月5日付け公開); サハガン(Sahagan)ら、J. Immunol., 137巻1066~1074頁、1986年; ロビンソン(Robinson)ら、国際公開報WO9702671号(1987年5月7日付け公開); リウ(Liu)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻3439~3443頁、1987年; サン(Sun)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻214~218頁、1987年; ベター(Better)、Science、240巻1041~1043頁、1988年; ならびにハーロー(Harlow)およびレー

10

20

30

40

50

ン (Lane)、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、前掲文献)。

抗イディオタイプ (抗 Id) 抗体は、抗体の抗原結合部位と一般に結合する特有の決定基を認識する抗体である。Id 抗体は、mAb の供給源として同じ種でかつ同じ遺伝子型の動物 (たとえばマウス系統) に、抗 Id が調製されている mAb で免疫性を与えることによって製造することができる。その免疫性を与えられた動物は、免疫性を与える抗体のイディオタイプ決定基を認識し応答して、これらイディオタイプ決定基に対する抗体 (抗 Id 抗体) を産生する。たとえば、米国特許第 4,699,880 号参照。

また、抗 Id 抗体は、さらに他の動物に免疫応答を誘導して、いわゆる抗抗 Id 抗体を産生させる「免疫原」としても使用してよい。抗抗 Id は、抗 Id を誘導する原 mAb とエピトープが同じであってよい。したがって、mAb のイディオタイプ決定基に対する抗体を用いることによって、同一の特異性を有する抗体を発現する他のクローンを同定することができる。

本発明の抗体は、モノクローナル抗体などの無傷の (intact) 抗体であってよいが、目的とする機能を提供する抗体のエピトープ結合部位であると解すべきである。したがって、前記無傷の抗体のみならず、そのタンパク質分解フラグメントたとえば Fab フラグメントまたは $F(ab')_2$ フラグメントも使用できる。Fab フラグメントと $F(ab')_2$ フラグメントは、無傷の抗体の Fc フラグメントを欠いており、循環系からはより速く消失し、そして無傷の抗体より、非特異的組織結合性が低い (ワール (Wahl) ら、J. Nucl. Med.、24 巻 316~325 頁、1983 年)。そのようなフラグメントは、一般的にタンパク質分解開裂法で製造され、たとえばパパイン (Fab フラグメントを製造する場合) またはペプシン ($F(ab')_2$ フラグメントを製造する場合) などの酵素を使用する。

さらに、抗体の可変部をコードする DNA は、他の抗体に挿入してキメラ抗体を生成させることができ (たとえば、米国特許第 4,816,567 号参照) または T 細胞受容体に挿入して同じ広い特異性を有する T 細胞を生成させることができる (エッシャーゼット (Eshhar, Z.) ら、Br. J. Cancer Suppl.、10 巻 27~29 頁、1990 年; グロスジイ (Gross, G.) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86 巻 10024~10028 頁、1989 年参照)。一本鎖抗体も製造して使用できる。一本鎖抗体は、抗原結合性を有しかつ免疫グロブリンの軽鎖と重鎖の可変部 (結合した $V_H - V_L$ または一本鎖の F_V) に相同もしくは類似の一对のアミノ酸配列を含有する一本鎖複合体のポリペプチドでありえる。 V_H と V_L の両者は天然のモノクローナル抗体の配列をコピーしてよく、または、これら鎖の一方または両者は米国特許第 5,091,513 号に記載されているタイプの CDR-FR 構造体を含有していてもよい。前記軽鎖と重鎖の可変部に類似の別のポリペプチドは、ともにポリペプチドリンカーによって保持されている。とくに、 V_H 鎖と V_L 鎖のポリペプチド構造をコードする DNA が知られている場合の前記一本鎖抗体の製造法は、たとえば、米国特許第 4,946,778 号、同第 5,091,513 号および同第 5,096,815 号に記載の方法によって実施してよい。

したがって、「抗体の抗原結合部分を含有する分子」という用語には、任意の動物細胞系または微生物により生成され、また任意のイソタイプ (isotype) の無傷の免疫グロブリン分子のみならずそれらの反応性画分、それらは限定されないが、Fab フラグメント、 Fab' フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、その重鎖および/または軽鎖の可変部およびそのような反応性画分を含有するキメラまたは一本鎖抗体があり、ならびにそのような抗体反応性画分が物理的に挿入されている他のタイプの分子または細胞、たとえばキメラ T 細胞受容体またはそのような受容体を有する T 細胞、あるいはそのような反応性画分を含有する分子の一部によって、治療用分子を送達するために開発された分子が含まれるものとする。

本発明は、十分に説明したので、本発明を例示するために提供されかつ本発明を限定するものではない下記実施例を参照することによって一層容易に理解されるであろう。

10

20

30

40

50

実施例 1

2つのヒトタンパク質であるIR1B1およびIR1B4は、IFN受容体に結合する。

BamH1 - センスプライマー (5' ctgaggatccAAAGTCTTCTTGA
GATGCATC (配列番号5)) および EcoRI アンチセンスプライマー (5' tga
acgaattccctATCATAACAAGTC (配列番号6)) を使ってPCRで増
幅した全IFNAR1 - ICドメインをコードするcDNAフラグメントをブレスクリ
プトベクター (BS - SK+, ストラテジーン) 中にクローン化した。このBS - IFN
AR1 - IC由来のBamH1 - SalIフラグメントをpGBT₁₀ベクター (クローン
テック) に導入し、ツーハイブリッドスクリーニングのためGal4 DNA結合ドメイ
ン (pGBT₁₀ - IFNAR1 - IC) のあとに同相に融合した。ツーハイブリッドスク
リーニング法 (フィールズ (Fields) とソング (Song), 1989年) を、酵
母のレポーターストレインであるY153をpGBT₁₀ - IFNAR1 - ICで同時に形
質転換するため、ヒトエプスタイン・バー・ウイルス (EBV) で形質転換したBリンパ
球由来のpACTプラスミドcDNAライブラリーを使ってダーフィー (Durfée)
ら (1993年) の修正法により実施した。酵母Y153ストレインは、Gal4転写因
子の活性が再構成された場合にのみ転写されるGAL1アップストリームアクチベ
ィング配列 (UAS) の支配下にある2つのレポーター遺伝子を有する。これには、この特
定の酵母クローンに導入されたpACTプラスミドによりコードされる融合タンパク質が
pGBT₁₀プラスミド由来のIFNAR1 - ICドメインに親和性を有するということが
必要である。レポーター遺伝子の1つはGAL1 His3であり、それは、ヒスチジン
欠損培地中での増殖を可能にする。その他のレポーター遺伝子はGAL - LacZであり
、それは、 β -ガラクトシダーゼ活性を付与する。加えて、pACTプラスミドはLeu
2遺伝子を有し、また、pGBT₁₀プラスミドはTRP1遺伝子を有しており、それぞれ
、ロイシンおよびトリプトファン欠損培地中での増殖を可能にする。25mM 3 - アミ
ノトリアゾール存在下トリプトファン、ロイシン、ヒスチジン欠損人造SC培地にてコロ
ニーを選抜した (それにより、さらにヒスチジン原栄養株 (prototrophy) を
選抜する)。ついで、増殖コロニーを、X - galフィルターアッセイ (ブリーデン (B
reeden) とネイスミス (Naysmith), 1985年) を使って β -ガラクト
シダーゼ活性について試験した。

9つの陽性な酵母クローンを得て、それらのpACTプラスミドを、E. coli HB
101にトランスフェクトし、leu⁺ 形質転換細胞を選抜することにより、回収し
た。各酵母DNAについて、2つのそのようなE. coli HB101クローンを単離
した。これらE. coliクローン由来のpACTプラスミドの部分DNAシーケン
シングは、IR1B1およびIR1B4と呼称される2つのcDNA配列に分かれることを
示した。IR1B1およびIR1B4グループのpACTプラスミドを、ラミン (Lam
in)、cdk2およびp53または他のコントロールインサートを保持するpASプラ
スミド (クローンテック) とSFY526酵母レポーターストレイン (バーテル (B
artel) ら、1993年) を同時に形質転換することにより、特異性試験に供した。S
C培地 (-trp、-leu) 中で増殖するコロニーを β -ガラクトシダーゼ発現につ
いて試験した。明らかに陽性なpACTプラスミドから、インサートをXhoIで切りだし
、BS - KS (ストラテジーン) にクローン化し、そして373A DNAシーケンサー
(アプライド バイオシステムズ) にてダイデオキシターミネーターサイクルシーケン
シングキットを使い、T7およびT3プロモーターからシーケンシングを行った。

図1は、異なるpASまたはpGBT₁₀プラスミドと共に酵母SFY526に同時にト
ランスフェクトされたpACTクローンIR1B1についての結果を示す。フィルターの画
線接種 (streak) 1~9にて選抜的なSC培地 (-trp、-leu) において酵
母細胞が増殖した。X - gal試薬 (5 - プロモ - クロロ - 3 - インドリル - β - D - ガ
ラクトピラノシド) による染色では、画線接種2および4のみが陽性であった。図1に示
すように、画線接種4は活性なLacZ遺伝子を有するコントロール酵母である。画線接
種2はIR1B1およびIFNAR1 - IC融合タンパク質の組み合わせである。IR1

10

20

30

40

50

B 1のみ(画線接種9)またはIR1B1およびIFNAR1-IC以外のどのほかの組み合わせでも - ガラクトシダーゼ活性を示さなかった。それゆえIR1B1はIFNAR1-IFN受容体鎖のICドメインと特異的に結合することができる。

同様に、図2は、異なるpASまたはpGBT₁₀プラスミドと共に酵母SFY526に同時にトランスフェクトされたpACTクローンIR1B4についての結果を示す。フィルターの画線接種1~8にて選抜的なSC培地(-trp、-leu)において酵母細胞が増殖し、X-gal試薬による染色では、画線接種3および7のみが陽性であった。図2の下部の囲み部分に示すように画線接種7は活性なlacZ遺伝子を有するコントロール酵母である。画線接種3はIR1B4およびIFNAR1-IC融合タンパク質の組み合わせである。IR1B1を用いて得られた結果のように、IR1B4のみ(画線接種1)またはIR1B4およびIFNAR1-IC以外のどのほかの組み合わせでも - ガラクトシダーゼ活性を示さなかった。それゆえIR1B4もまたIFNAR1-IFN受容体鎖のICドメインと特異的に結合することができる。

10

実施例2

IR1B1タンパク質配列はカルシウム結合EFハンドサイトを示す。

pACT-IR1B1プラスミドのcDNAインサートを制限酵素XhoIで切りだし、ブルースクリプトBS-KSベクターにクローン化し、そして373A DNAシーケンサー(アプライド バイオシステムズ)にてダイデオキシターミネーターサイクルシークエンシングキットを使い、T7およびT3プロモーターからシークエンシングを行った。最も長いプラスミドはGal4アクチベーションドメインおよびpACTプラスミドのリンカー配列に続く830のヌクレオチド(図3)の配列を有し、そして191のアミノ酸のオープンリーディングフレームがその中に見られた(図3)。タンパク質データベースのオンラインサーチを、バイオアクセラレーター アラインメント(Bioaccelerator Alignment)(ヘニコフ(Henikoff)とヘニコフ(Henikoff)、1992年)およびブラストパイ アルゴリズム(BlastP algorithm)(アルチュル(Altschul)ら、1990年)を使って実施した。カルトラクチン(caltractin)(CATR_HUMAN, accession Swiss Protein SW New P41208)については62.1%の類似性(similarity)および52~173のアミノ酸では32.4%の相同性(identity)、そしてカルシニューリンB(CALB_NAEGR, accession Swiss Protein P42322; CALB_HUMAN, accession P06705)については59.8%の類似性および50~171のアミノ酸では32.5%の相同性という最も高いスコアが得られた。

20

30

図4はヒトカルシニューリンB(CALB)およびカルトラクチン(CATR)とともにIR1B1の配列を示す。カルシウムを結合するヘリックス-ループ-ヘリックスEF-ハンドドメインを、太くそして下線を引いた文字で示す。IR1B1は2つのEF-ハンドサイトを有するが、最初の2つのEF-ハンドドメインは保存されていない。IR1B1はカルシニューリンB(図4に縦線で示す)およびカルトラクチン(図4にコロンで示す)の両者に相同性を示す。しかしながら、IR1B1は明らかに新規なものであり、以前には同定されていない異なったヒトタンパク質である。

40

実施例3

IR1B1はIFNで誘導される遺伝子産物である。

ヒト骨髄腫U266S細胞(5mlサスペンション培養物中、約 3×10^6 個の細胞)を、組換えIFN- γ (2×10^8 IU/mg 細菌由来)または組換えIFN- γ (3×10^8 IU/mg CHO細胞由来)で、750 IU/mlにて2時間または18時間処理した。IFNで処理後、細胞を回収し、 Guanidinium チオシアネートおよびフェノールを含有するTRI試薬(モレキュラーリサーチセンター、シンシナティ、オハイオ)で抽出した。抽出したRNAをエタノール沈殿し、ホルムアルデヒドで変性して、ホルムアルデヒド-アガロースゲル(10ug RNA/スロット)にて電気泳動により分析し、ジーンスクリーンプラス(デュポン、ニューイングランドニ

50

ュークリアー、ピレリカ、エムエイ)上にプロットした。ノーザンプロットを、 ^{32}P -dCTPおよびランダムプライミングを使ってレディプライムキット (Redi prime kit) (アマシャム、ユウケイ)によりラベルした 10^6 cpmのIR1B1 cDNAと反応させた。

図5は、IR1B1 cDNAが1.1kb RNAにハイブリダイズしたことを示す。IR1B1 mRNAの量は、U266S細胞のIFN-処理後、2時間で著しく増加した。しかしながら、IFN-処理後18時間において、IR1B1 mRNAは細胞から消失し、このことは、誘導が急速にしかも一時的に起こることを示している。多くのIFNで誘導されたmRNAが、IFN処理後24時間以上にわたって細胞中に蓄積しつづける(レベル(Revel)とチェバス(Chebath)、1986年)。

同量のRNAが各レーンに存在することを確認した。図5の下部に示すように、同じU266S(IFN受容体が豊富)RNAの18SリボソームcDNAプローブへのハイブリダイゼーションは、各レーンの同量の18S rRNAを示す(18S rRNAを泳動したプロットの部分のみを示す)。誘導のため $1,200\text{U/ml}$ のIFNを使用した別の実験では、IR1B1 mRNAがまたIFN-8と共に2時間において観察されたが、30分においては観察されなかった(示していない)。

IR1B1 mRNAは、異なったヒト細胞(U266、ダウジ(Daudi)とTHP-1細胞)で同じ1.1kbのサイズを有することが明らかとなった。このサイズは、カルラクチンmRNAのそれに近似しているが、カルシニューリンB mRNA(2.5kb)のそれには近似していないことは注目すべきことである。小さなサイズのmRNAは、約20kDaの小さなタンパク質であるIR1B1に一致する。

実施例4

IR1B4タンパク質は、in vitroでIFNAR1に結合する。

IR1B4のIFNAR1のICドメインへの結合を、網状赤血球溶解物におけるin vitroでの翻訳を使うタンパク質タグ(protein tag)(フラッグ配列)によるIR1B4タンパク質の合成、およびこのタンパク質をE.coliにおいて組換えIFNAR1-IC融合タンパク質と反応させることにより、試験した。XhoIで切断し、クレノー酵素で補充した実施例1由来のpACT-IR1B4 DNAを、EcoRIで切断し、補充したPECE-フラッグ発現ベクター(エリス(Ellis)ら、1986年)中にクローン化した。In-frameのフラッグ-IR1B4融合物を含むNotI-BamHIフラグメントを、NotI-BamHIで切断したBS-SK中T3プロモーターの下流に再クローン化した。フラッグ融合物の配列をT3プロモーターからシークエンシングすることにより明らかにした。in vitroでの転写(プロメガキット)を、T3ポリメラーゼおよび 1ug のBamHIで1本鎖化したBS-フラッグ-IR1B4 DNAを使って行った。in vitroでの翻訳を、ウサギ網状赤血球溶解物(プロメガキット)において、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン(アマシャム)および 5ug のRNA転写物を使って30分で1時間行った。該産物を使用前にRNase処理した。GST-IFNAR1-IC融合タンパク質を、BamHI-EcoRIをクローニングすることにより、つまりpGEX2(ファルマシア バイオテック)の同サイトにBS-IFNAR1-IC(前記参照)を挿入することにより調製した。GSTおよびGST-IFNAR1-ICをE.coli中で発現させ、グルタチオニン-アガロースビーズ(シグマ)へ結合させ回収した。

抗フラッグM2アガロースビーズは、コダックサイエンティフィックイメージングシステムからのものである。IFN受容体(IFNAR1)の成分に対するモノクローナル抗体IFNaR3は、オウ コーラモニチ博士(Dr. O. Colamonici)(コーラモニチ(Colamonici)ら、1990年)から提供していただいたものであり、1:100に希釈して使用した。IFNAR1-IC(Ab 631)のC末端ペプチドに対するウサギ抗体を調製し、プロテインGビーズ(ファルマシア)をmAb IFNaR3と共に使用することを除き、以前詳細に述べたアンチプロテアーゼによる 2×10^7 個のヒト骨髄腫U266SおよびU266R細胞のBrij抽出物(0.75ml)か

10

20

30

40

50

ら I F N A R 1 を免疫沈降するのに使用した (アンブロビック (A m b r o v i c h) ら、1994年)。S D S - P A G E およびフジックス B A S 1 0 0 0 ホスファージマーにおける分析を以前のように行った (ハーロック (H a r r o c h) ら、1994年)。

翻訳産物を抗フラッグ抗体により免疫沈降させると、約 3 2 k D a のタンパク質産物が得られることが初めて明らかとなった (図 6 A および 6 B)。図 6 A および 6 B において、抗フラッグ抗体の使用が表示される時 (+ s i g n による) はいつも、I R 1 B 4 フラッグ融合 mRNA (i n v i t r o で相当する DNA 構造体から転写されたもの) の放射性翻訳産物がアガロースビーズ (コダックサイエンティフィックイメージングシステムの商品) に結合した抗フラッグ M 2 抗体と反応したということを示す。フラッグアミノ酸配列に融合した I R 1 B 4 を含む翻訳されたタンパク質はこれらの抗フラッグ抗体ビーズに結合し、遠心分離してビーズを沈降させたあと、該タンパク質を S D S 緩衝液で溶出し、S D S - P A G E にかけた。これらの反応は、期待される融合タンパク質が存在することを示すためのコントロールとして機能する。

I F N A R 1 - I C に融合したグルタチオン S トランスフェラーゼ (G S T) が結合するグルタチオン - セファロース (シグマ) のビーズを網状赤血球溶解物翻訳反応に加えた。ビーズを遠心分離し、洗浄し、G S T ビーズに結合したタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム (S D S 1%) で溶出し、そして S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) により分析した。³⁵S メチオニンでラベルされた 3 2 k D a のタンパク質が G S T - I F N A R 1 - I C に結合していることが観察されたが、G S T のみには結合は観察されなかった (図 6 A)。このことは、I R 1 B 4 が単離された I F N A R 1 - I C ペプチド領域に直接結合することを示している。

I R 1 B 4 がヒト細胞膜に存在するような I F N A R 1 タンパク質と相互作用するかを明らかにするため、ヒト骨髄腫 U 2 6 6 細胞の界面活性剤抽出物を網状赤血球溶解物由来の I R 1 B 4 mRNA の³⁵S メチオニンでラベルした翻訳産物と混合した。I F N A R 1 タンパク質を I F N A R 1 のエクストドメインに特異的なモノクローナル抗体 I F N a R 3 (コーラモニチラ由来、1990年) により免疫沈降した。S D S - P A G E による分析は、界面活性剤抽出物が U 2 6 6 S (I F N 受容体が豊富) に由来する時は 3 2 k D a の I R 1 B 4 フラッグバンド (図 6 B) の存在を示し、I F N 受容体欠損 U 2 6 6 由来の突然変異体 I F N - 、抵抗性の誘導細胞系 (アブラモヴィック (A b r a m o v i c h) ら、1994年) である U 2 6 6 R 細胞に由来する時は存在しないことを示した。U 2 6 6 S 抽出物を I F N A R 1 の C 末端ペプチドに対する A b 6 3 1 と反応させると、3 2 k D a バンドが同様に見られ、また、C o s - 7 細胞を f l g - I R 1 B 4 およびヒト I F N A R 1 c D N A により変質させると、I F N A R 1 が抗フラッグにより沈降した。これらの結果は、特異的な方法でヒト細胞に由来する無傷の I F N A R 1 に I R 1 B 4 が結合することを示している。

実施例 5

I R 1 B 4 の c D N A およびタンパク質の配列

I R 1 B 4 c D N A のヌクレオチド配列は、3 6 1 のアミノ酸からなる長いタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有する (図 7)。このヒト c D N A は、U 2 6 6 骨髄腫細胞を含む種々のヒト細胞において 1 . 5 k b の構成要素的に発現される p o l y - A + mRNA を認識した。タンパク質データベースのオンラインサーチを、パイオアクセラレーター アラインメント (B i o a c c e l e r a t o r A l i g n m e n t) (ヘニコフ (H e n i k o f f) とヘニコフ (H e n i k o f f)、1992年) およびブラストパイ アルゴリズム (B l a s t P a l g o r i t h m) (アルチュル (A l t s c h u l) ら、1990年) を使って実施し、そして、I R 1 B 4 は、タンパク質 - アルギニンメチルトランスフェラーゼファミリーの特有の構成要素であることがわかった。リン (L i n) らによって記載されているラット P R M T 1 c D N A (1996年、G e n b a n k s e q u e n c e I . D . 1 3 9 0 0 2 4 ; A c c e s s i o n U 6 0 8 8 2) は、アラインメントコンピュータプログラムで分析するとほんの 8

10

20

30

40

50

1.4%の相同性を示す。アミノ酸レベルでは(図8)、ヒトIR1B4/PRMTはPRMT1のアミノ末端で明らかに異なり、最初の19のアミノ酸は全く異なっている。IR1B4のN末端シークエンシングのみでは、IR1B4がPRMT1に相同性を示すことについての示唆を全く示さなかった。以前記載されている他のヒトタンパク質であるHCP-1(ニカワ(Nikawa)ら、1996年; Genbank accession D66904)もまたIR1B4に相同性を有することが明らかとなった。しかしながら、HCP-1はアミノ酸配列が残基147-175で異なっている(図9)。HCP-1は酵母においてire15変異を補足するその能力に基づいて独自に同定され、その酵素的機能については以前に同定はされていない(ニカワ(Nikawa)ら、1996年)。それゆえ、IR1B4は新規なヒトタンパク質である。

10

実施例6

IFNAR1-ICに結合したIR1B4は、メチルトランスフェラーゼ活性を有する
メチルトランスフェラーゼ活性をIFNAR1受容体と共にヒト細胞抽出物から同時に免疫沈降できた。U266S細胞のBrij界面活性剤抽出物を、抗IFNAR1抗体Ab631(アブラモヴィック(Abramovich)ら、1994年)ありまたはなしで4にて一夜反応させた。タンパク質Aビーズ(50%のIPA-400ファーストフロ-40ul、レプリゲン)を1時間加えた。該ビーズを洗浄し、そして0.1mlの25mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50uM(0.25uCi)14C-(メチル)-S-アデノシルメチオニン(アマシャム)、および100ug ヒストン(子牛胸腺由来のタイプIIA、シグマ)中で30にて30分間インキュベートした。ヒストンのin vitroでのメチル化を、リン(Lin)ら(1996年)により記載される条件の下で実施した。ヒストンバンドにおける放射活性をSDS-PAGE(15%アクリルアミド)およびホスファージマーにおける露光の後に分析した。¹⁴Cメチルラベルしたヒストンは、抗IFNAR1でコートしたビーズにより観察されたが、コントロール反応ではそれらにより観察されなかった(図10)。それゆえ、タンパク質メチルトランスフェラーゼ活性は、これらヒト細胞のIFN受容体鎖と構成要素的に関係している。U266S細胞へのIFN-の添加後5分にIFNAR1を免疫沈降させた際、同様な酵素活性が回収された。

20

実施例7

IFN作用におけるIR1B4/PRMT1の関わり

IR1B4 cDNA(AS-1、アンチセンス配列5'-GGCTACAAAATTC TCCATGATG-3'; 配列番号12)の開始コドン周辺のヌクレオチド12-33の配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドホスホロチオエート(phosphorothioate)(シュタイン(Stein)ら、1989年)を化学的に合成した。オリゴヌクレオチドを、96穴マイクロプレートに播種したU266S細胞(8000細胞/ウェル(穴)/0.2ml RPMI、10% FCS)に、初日においては10uMの最終濃度で添加し、また2日後においては5uMで再添加した。IFN-を初日において64または125IU/mlで添加した。3日培養後、酸化還元に基づく比色細胞密度指示薬(バイオソース、カマリロ(Camarillo)、シイエイ)アラマーブルー(Alamar Blue)20ulを各ウェルに添加し、6-7時間にわたってインキュベーションした。複数のウェルの多数の読み取りができるマイクロプレートELISAリーダー(試験フィルター(filter)530nm、対象フィルター630nm)にて、色を測定した。生存細胞数によるグロースカーブとODによるものとの相関関係が明らかになった。メチルトランスフェラーゼを測定するため、プールしたウェルからの細胞を、25ul/ウェルの25mM Tris-HCl, pH7.4、1mM EDTA、1mM EGTA、40ug/mlロイペプチンおよびアプロチニン(aprotinin)、20ug/mlペプスタチン(pepstatin)、1uMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)中で凍結-解凍により溶解した。25ulの細胞抽出物、100uMペプチドR1(ナジュボイヤ(Najbauer)ら、1993年; ゲノシス(Genosys)、ケンブリッジ、ユウケイから得られた)、3uCiの[³

30

40

50

H] (メチル)S - アデノシルメチオニン (アマシャム、73 Ci / mmol) を含む 50 μ l 中で反応を 30 分にて 30 分間行った。SDS ポリアクリルアミドゲル (16%) にて電気泳動後、50% メタノール、10% 酢酸中で固定し、アンプリファイ (登録商標) (アマシャム) で処理し、オートラジオグラフィーを 8 日間実施した。R1 ペプチド基質へのトリチウム化メチル基の取り込みにより測定すると、この AS - 1 アンチセンス DNA は U266S 細胞においてタンパク質 - アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性を著しく減少することができ (図 11)、そして、この酵素の IFN 作用における働きについての役割を調査するのに使用した。細胞に関し最も直接的に定量でき、またラット PRMT1 と増殖関連遺伝子産物との相互作用が観察されているため (リン (Lin) ら、1996 年)、IFN の増殖阻害活性を選択した。IR1B4 / PRMT cDNA の開始コドン周辺の配列と相補的なアンチセンス - 1 オリゴヌクレオチド AS - 1 の添加により、ヒト骨髄腫 U266S 細胞において IFN - の増殖阻害効果が減少した (図 12)。このことは、アンチセンス AS - 1 の存在下、IFN 処理細胞がより高い増殖を示したことを意味する (ホスホロチオエート (phosphorothioates) のいずれの毒性効果も除く)。IFN 非存在下における増殖には有意な影響は与えなかった。同じ cDNA 領域に相当するセンスオリゴヌクレオチド S - 3 は、アンチセンス - 1 と比較して、ほんの小さな効果 (S - 3、図 12) しか持たなかった。センス S - 3 はまた酵素活性のレベルに対しほんのわずかな阻害効果しか持たなかった (図 11)。cDNA の中位に対するものであり、配列番号 7 のヌクレオチド 572 - 592 に相補的な他のアンチセンスホスホロチオエートオリゴヌクレオチド AS - 2 (配列番号 13) は、ほとんど影響を持たなかった (図 12)。アンチセンス - 1 オリゴヌクレオチドにより部分的に PRMT 活性が欠損した骨髄腫細胞における IFN - の増殖阻害効果の 5 倍までの減少は、IR1B4 / PRMT 酵素と IFNAR1 受容体の ICドメインとの関係が細胞における IFN 作用にとって機能的に重要であることを示している。

これらの実験はまた、IR1B4 タンパク質が、図 11 に説明される実験において使用された R1 ペプチド Gly - Gly - Phe - Gly - Gly - Arg - Gly - Gly - Phe - Gly (配列番号 11; ナジュボイヤ (Najbauer) ら、1993 年) のような PRMT クラスの酵素のペプチド基質をメチル化することを示している。グリシン残基に隣接するアルギニン残基におけるタンパク質のメチル化は (たとえば、前記ペプチドにおけるように)、細胞にシグナルを伝達するのに働くリン酸化のような一種のタンパク質修飾でありうる。hnRNP グループのタンパク質は、PRMT 酵素の標的であり、そしてこれらのタンパク質は mRNA プロセッシング、スプライシング、輸送および安定性に影響を与えるので (リウ (Liu) とドレイファス (Dreyfuss)、1995 年)、それらのメチル化は遺伝子発現の転写後調節においてある役割を演じるかもしれない。IFN 受容体の鎖に結合するとしてここで発見された IR1B4 / PRMT タンパク質は、IFN への応答における遺伝子発現についての変化を仲介することができるかもしれない。他のタンパク質基質は、IFN 受容体複合体および転写因子の他の成分を含む IFN 受容体を通じてメチル化されるかもしれない。リン (Lin) ら (1996 年) は、ラット PRMT1 の増殖因子で誘導されるタンパク質への結合は PRMT1 を活性化し、そして、おそらく細胞の細胞質において PRMT1 に結合する何らかの阻害性タンパク質を除去することによりその基質特異性を修飾することを観察した。IFN 受容体の IFNAR1 鎖へ結合した IR1B4 の同様な活性化が期待できうる。

結論

新規タンパク質 IR1B1 は、I 型インターフェロン受容体の IFNAR1 鎖の細胞内ドメインと相互作用することを述べた。このタンパク質は、ヒト細胞の IFN 処理に続いて非常に急速にしかも一時的に誘導される。IR1B1 は、カルシウム結合タンパク質の特徴 (hall mark) であるヘリックス - ループ - ヘリックス EF ハンドルサイトの存在により特徴づけられる。カルシウムイオンの流動は IFN の作用機構に関係し、とくに、細胞形態および細胞骨格の組織化における初期の細胞の応答および変化について関係する (タム (Tamm) ら、1987 年)。カルシウムイオンで活性化される酵素は、IF

10

20

30

40

50

Nへの応答において、ジアシルグリセロールのようなセカンドメッセンジャーを産生することができる。さらに、カルモジュリン様タンパク質は多くのタンパク質キナーゼを調節し、これらの経路は、IFN処理細胞において機能することが観察されている(タムら、1987年)。IFN受容体結合タンパク質IR1B1は細胞においてIFNのそのようなCa⁺⁺依存効果に関与しているようである。

IFNAR1-ICドメインと相互作用するタンパク質のためのツーハイブリッドスクリーニング(two-hybrid screening)ではまた他のタンパク質IR1B4を同定し、それは、タンパク質-アルギニンメチルトランスフェラーゼファミリーの酵素の構成要素であることが明らかとなった(PRMT1;リンら、1996年)。この酵素は多くのRNAおよびDNA結合タンパク質、とくに異種核リボ核タンパク質(hnRNP)をメチル化することが知られている。hnRNPは、核から細胞質へのmRNAの輸送、プレmRNAの副スプライシング(alternative splicing)、および転写後調節に関与している(リウ(Liu)とドレイファス(Dreyfuss)、1995年)。IFNAR1-ICドメイン上に連結するIR1B1およびIR1B4/PRMT1タンパク質は、ダーネル(Darnell)ら(1994年)により記載される既知のジャック-スタット(Jak-Stat)経路以外に存在するIFNの新規なシグナル機構を明らかにする。

本発明を完全に記載したので、本発明の思想および範囲から離れることなくまた不適切な実験なく、同じことが、等しいパラメーター、濃度、条件の広い範囲内において実施されることが当業者により理解されるであろう。

本発明は特定の具体例との関連で記載されているが、さらなる修飾が可能であると理解されるであろう。本願は、一般に本発明の原理に従う、また本発明の技術分野における既知のまたは慣習的方法内で生ずる、および以下に添付する請求の範囲における前記説明にある必須事項に適用されるかもしれないような本開示からの発展を含むいずれのバリエーション、使用、または適用をカバーすることを意図している。

雑誌記事または要約、公開されたまたはそれに相当する米国または外国特許出願、認定された米国または外国特許、またはその他のあらゆる引用例は、この引用文献に全て含まれており、それは引用した引用例に存在する全てのデータ、表、図、および文書を含んでいる。さらに、ここに引用した引用例の中に引用される引用文献の全ての内容もまた引用文献に全て含まれている。

既知の方法の段階、従来の方法の段階、既知の方法または従来の方法に対する引用例は、本発明のいずれの側面、記載または具体例も本技術分野において開示、教示または示唆されているとすることについて、いずれの場合においても認めるものではない。

前記した特定の具体例において本発明の一般的な性質を十分に明らかにしているので、他者は、本分野の技術内の知識を適用することにより(ここに引用される引用例の内容を含む)、不適切な実験なく、本発明の一般的概念からはなれることなく、特定の具体例のような種々の用途のために容易に修飾および/または適用することができるであろう。それゆえ、そのような適用および修飾は、ここに示される教示または指導に基づくものであり、開示された具体例と等しい意味および範囲にあると意図されている。

ここにある表現または術語は、記載を目的とするものであり限定するものではないと理解されるべきであって、それゆえ、本明細書の表現または術語は、当該技術分野における通常の技術の1つについての知識と組み合わせ、ここで示されている教示や示唆に照らし、当業者により理解されるべきである。

引用文献

10

20

30

40

- Abramovich, C., Shulman, L.M, Ratovitski, E., Harroch, S., Tovey, M, Eid, P. and Revel, M. (1994) Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I Interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN- α and IFN- β . EMBO J., 13:5871-5877.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment research tool. J. Mol. Biol., 215:403-410.
- Barter, P.L., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. BioTechniques, 14:920-924. 10
- Boldin, M.P. Varfolomeev, E.E. Pancer, Z. Mett, I.L. Camonis J.H. and Wallach D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem, 270:7795-7798 .
- Breeden, L. and Naysmith, K., (1995) Regulation of the yeast HO gene. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 50:643-650. 20
- Colamonici, O.R., D'Allessandro, F., Diaz, M.O., Gregory, S.a., Necker, L.M. and Nordan, R. (1990) Characterization of three monoclonal antibodies that recognize the Interferon- α 2 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7230-7234.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994) Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science, 264:1415-1421. 30
- David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Larner, A.C. and Neel, B.G. (1995a) Differential regulation of the alpha/beta Interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. Mol. Cell. Biol., 15:7050-7058.
- David, M., Petricoin, E. III, Benjamin, C., Pine, R., Weber, M.J. and Larner, A.C. (1995b) Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in Interferon α - and Interferon β -stimulated gene expression through Stat proteins. Science, 269:1721-1723.
- David, M., Petricoin, E. III. And Larner, A.C. (1996) Activation of Protein kinase A inhibits Interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells. J. Biol. Chem., 271:4585-4588. 40

- Deiss, L.P. and Kimchi, A. (199) A genetic tool used to identify thioredoxin as a mediator of a growth inhibitory signal. *Science* 252, 117-20.
- Domanski, P., Witte, M., Kellum, M., Rubinstein, M., Hackett, R., Pitha, P. And Colamonici, O.R. (1995) Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the Interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J. Biol. Chem.*, 270:21606-21611.
- Durfee, T., Becherer, K, Chen, P.-L., Yeh, S-H, Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.-H. and Elledge, S. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes & Devpt.*, 7:555-569. 10
- Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D.O., Edery, M., Roth, R.A. and Rutter, W.J. (1986) Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell*, 45, 721-731.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340:245-246. 20
- Guerini, D. et al (1989). *DNA* 8:675-682.
- Harroch, S., Revel, M. and Chebath, J. (1994). Interleukin-6 signaling via four transcription factors binding palindromic enhancers of different genes. *J. Biol. Chem.*, 269:26191-26195.
- Henikoff, S. and Henikoff, J.G. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919.
- Kagan, R.M. and Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosyl methionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 310, 417-427. 30
- Lee, V.D. and Huang, B. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11039-11043.
- Leung, S., Qureshi, S.A., Kerr, I.M., Darnell, J.E. and Stark, G.R. (1995). Role of Stat2 in the alpha Interferon signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 15:1312-1317. 40
- Lin, W.-J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S. and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a Protein-arginine Methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 271:15034-15044.

- Liu, Q. And Dreyfuss, G. (1995). In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. Mol. Cell. Biol., 15:2800-2808.
- Najbauer, J., Johnson, B.A., Young, A.L. and Asward, D.W. (1993) Peptides with sequences similar to glycine arginine rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferases modifying arginine in numerous proteins. J. Biol. Chem., 268, 10501-10509.
- Nikawa, J.-I., Nakano, H. and Ohi, N. (1996) Structural and functional conservation of human yeast HCPI genes which can suppress the growth defect of the *Saccharomyces cerevisiae* ire15 mutant. Gene, 171, 107-111. 10
- Revel, M. (1984). The Interferon system in man: nature of the Interferon molecules and mode of action. In Becker, I. (ed.), Antiviral Drugs and Interferon. The molecular basis of their activity. Martinus Nijhoff Publ., Boston, pp 357-433.
- Revel, M. and Chebath, J. (1986) Interferon-activated genes. Trends Biochem. Sci., 11:166-170. 20
- Stein, C.A., Subasinghi, C., Shinozuka, K. and Cohen, J.S. (1989) Physicochemical properties of phosphorothionate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res., 16, 3209-3221.
- Tamm, I., Lin, S.L., Pfeffer, L.M. and Sehgal, P.B. (1987). Interferons α and β as cellular regulatory molecules. In Gresser, I. (ed.), Interferon 9, Acad. Press, London, pp 14-74.
- Uze, G., Lutfalla, G. and Gresser, I. (1990). Genetic transfer of a functional human Interferon α receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. Cell, 60:225-234. 30
- Wickstrom, E. (1991). In: Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS, pp. 7-24, Wiley-Liss, New York.
- Yang, C.H., Shi, W, Basu, L., Murti, A., Constantinescu, S.N., Blatt, L., Croze, E., Mullersman, J.E. and Pfeffer, L.M. (1996). Direct association of Stat3 with the TFNAR-1 chain of the human type I Interferon receptor. J. Biol. Chem., 271:8057-8061. 40

配列表

(1) 一般情報:

(i) 出願人: レベル、マイケル

チェバス、ジュディス イー

アブラモビッチ、カロライナ

(ii) 発明の名称: 新規な IFN 受容体 1 結合タンパク質、それらをコードする DNA、およびインターフェロンに対する細胞応答の調節方法

(iii) 配列の数: 13

(iv) 連絡先:

(A) 受信人: ブラウディ アンド ネイマーク

(B) 街路：セブンスストリート 419、エヌ ダブリュー、スウィート 300 (番地なし)

(C) 都市：ワシントン

(D) 州：ディストリクト オブ コロンビア

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号 (ZIP) : 20004

(v) 機械読み取り可能形式：

(A) 媒体の形式：フロッピーディスク

(B) コンピュータ：IBM製パーソナルコンピュータ互換機

(C) オペレーティングシステム：PC - DOS / MS - DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0、バージョン #1.30

10

(vi) 現行の出願データ：

(A) 出願番号：US

(B) 出願日：

(vi) 先願のデータ

(A) 出願番号：US 60 / 035,636

(B) 出願日：1997年1月15日

(viii) 代理人についての情報：

(A) 氏名：ブラウディ、ロジャー エル

(B) 登録番号：25,618

(C) ファイル番号：REVEL=14 PCT

20

(ix) 通信についての情報

(A) 電話：202-628-5197

(B) ファックス：202-737-3528

(2) 配列番号1に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：830塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直線状

30

(ii) 配列の種類：cDNA

(ix) 特徴：

(A) 名称 / キー：CDS

(B) ロケーション：43..615

(xi) 配列：配列番号1：

CGTCTCGAGG CGAGTTGGCG GAGCTGTGCG CGCGGCGGGG CG	ATG GGG GGC TCG	54	
	Met Gly Gly Ser		
	1		
GGC AGT CGC CTG TCC AAG GAG CTG CTG GCC GAG TAC CAG GAC TTG ACG		102	
Gly Ser Arg Leu Ser Lys Glu Leu Leu Ala Glu Tyr Gln Asp Leu Thr			
5	10	15	20
TTC CTG ACG AAG CAG GAG ATC CTC CTA GCC CAC AGG CGG TTT TGT GAG		150	
Phe Leu Thr Lys Gln Glu Ile Leu Leu Ala His Arg Arg Phe Cys Glu			
	25	30	35
CTG CTT CCC CAG GAG CAG CGG AGC GTG GAG TCG TCA CTT CGG GCA CAA		198	
Leu Leu Pro Gln Glu Gln Arg Ser Val Glu Ser Ser Leu Arg Ala Gln			
	40	45	50
GTG CCC TTC GAG CAG ATT CTC AGC CTT CCA GAG CTC AAG GCC AAC CCC		246	
Val Pro Phe Glu Gln Ile Leu Ser Leu Pro Glu Leu Lys Ala Asn Pro			
	55	60	65
TTC AAG GAG CGA ATC TGC AGG GTC TTC TCC ACA TCC CCA GCC AAA GAC		294	
Phe Lys Glu Arg Ile Cys Arg Val Phe Ser Thr Ser Pro Ala Lys Asp			
	70	75	80
AGC CTT AGC TTT GAG GAC TTC CTG GAT CTC CTC AGT GTG TTC AGT GAC		342	
Ser Leu Ser Phe Glu Asp Phe Leu Asp Leu Leu Ser Val Phe Ser Asp			
	85	90	100
ACA GCC ACG CCA GAC ATC AAG TCC CAT TAT GCC TTC CGC ATC TTT GAC		390	
Thr Ala Thr Pro Asp Ile Lys Ser His Tyr Ala Phe Arg Ile Phe Asp			
	105	110	115
TTT GAT GAT GAC GGA ACC TTG AAC AGA GAA GAC CTG AGC CGG CTG GTG		438	
Phe Asp Asp Asp Gly Thr Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser Arg Leu Val			
	120	125	130
AAC TGC CTC ACG GGA GAG GGC GAG GAC ACA CGG CTT AGT GCG TCT GAG		486	
Asn Cys Leu Thr Gly Glu Gly Glu Asp Thr Arg Leu Ser Ala Ser Glu			
	135	140	145
ATG AAG CAG CTC ATC GAC TAC ATC CTG GAA GAG TCT GAC ATT GAC AGG		534	
Met Lys Gln Leu Ile Asp Tyr Ile Leu Glu Glu Ser Asp Ile Asp Arg			
	150	155	160
GAT GGA ACC ATC AAC CTC TCT GAG TTC CAG CAC GTC ATC TCC CGT TCT		582	
Asp Gly Thr Ile Asn Leu Ser Glu Phe Gln His Val Ile Ser Arg Ser			
	165	170	175
CCA GAC TTT GCC AGC TCC TTT AAG ATT GTC CTG TGACAGCAGC CCCAGCGTGT		635	
Pro Asp Phe Ala Ser Ser Phe Lys Ile Val Leu			
	185	190	
GTCCCTGGCAC CCTGTCCAAG AACCTTTCTA CTGCTGAGCT GTGGCCAAGG TCAAGCCTGT		695	
GTTGCCAGTG CGGGCCAAGC TGGCCCAGCC TGGAGCTGGC GCTGTGCAGC CTCACCCCGG		755	
GCAGGGGCGG CCCTCGTTGT CAGGGCCTCT CCTCACTGCT GTTGTCAATG CTCCGTTTGT		815	
GGGCCTTCGT GGCCA		830	

(2) 配列番号2に関する情報:

40

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 191アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号2:

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

10

20

(2) 配列番号3に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：170アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号3：

30

Met Gly Asn Glu Ala Ser Tyr Pro Leu Glu Met Cys Ser His Phe Asp
 1 5 10 15
 Ala Asp Glu Ile Lys Arg Leu Gly Lys Arg Phe Lys Lys Leu Asp Leu
 20 25 30
 Asp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Val Glu Glu Phe Met Ser Leu Pro Glu
 35 40 45
 Leu Gln Gln Asn Pro Leu Val Gln Arg Val Ile Asp Ile Phe Asp Thr
 50 55 60
 Asp Gly Asn Gly Glu Val Asp Phe Lys Glu Phe Ile Glu Gly Val Ser
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Val Lys Gly Asp Lys Glu Gln Lys Leu Arg Phe Ala Phe
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Asp Met Asp Lys Asp Gly Tyr Ile Ser Asn Gly Glu Leu
 100 105 110
 Phe Gln Val Leu Lys Met Met Val Gly Asn Asn Leu Lys Asp Thr Gln
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ile Val Asp Lys Thr Ile Ile Asn Ala Asp Lys Asp Gly
 130 135 140
 Asp Gly Arg Ile Ser Phe Glu Glu Phe Cys Ala Val Val Gly Gly Leu
 145 150 155 160
 Asp Ile His Lys Lys Met Val Val Asp Val
 165 170

10

20

(2) 配列番号4に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：172アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号4：

30

Met Ala Ser Asn Phe Lys Lys Ala Asn Met Ala Ser Ser Ser Gln Arg
 1 5 10 15
 Lys Arg Met Ser Pro Lys Pro Glu Leu Thr Glu Glu Gln Lys Gln Glu
 20 25 30
 Ile Arg Glu Ala Phe Asp Leu Phe Asp Ala Asp Gly Thr Gly Thr Ile
 35 40 45
 Asp Val Lys Glu Leu Lys Val Ala Met Arg Ala Leu Gly Phe Glu Pro
 50 55 60
 Lys Lys Glu Glu Ile Lys Lys Met Ile Ser Glu Ile Asp Lys Glu Gly
 65 70 75 80
 Thr Gly Lys Met Asn Phe Gly Asp Phe Leu Thr Val Met Thr Gln Lys
 85 90 95
 Met Ser Glu Lys Asp Thr Lys Glu Glu Ile Leu Lys Ala Phe Lys Leu
 100 105 110
 Phe Asp Asp Asp Glu Thr Gly Lys Ile Ser Phe Lys Asn Leu Lys Arg
 115 120 125
 Val Ala Lys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Thr Asp Glu Glu Leu Gln Glu
 130 135 140
 Met Ile Asp Glu Ala Asp Arg Asp Gly Asp Gly Glu Val Ser Glu Gln
 145 150 155 160
 Glu Phe Leu Arg Ile Met Lys Lys Thr Ser Leu Tyr
 165 170

10

20

(2) 配列番号5に関する情報:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 31塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 1本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号5:

30

CTGAGGATCC AAAGTCTTCT TGAGATGCAT C

31

(2) 配列番号6に関する情報:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 25塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 1本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号6:

TGACGAATTC CTATCATAACA AAGTC

25 40

(2) 配列番号7に関する情報:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 1308塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 1本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 配列の種類: cDNA

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: CDS

(B) ロケーション: 16..1098

50

GCC ATT AAG GAG CCC CTA GTG GAT GTC GTG GAC CCC AAA CAG CTG GTC Ala Ile Lys Glu Pro Leu Val Asp Val Val Asp Pro Lys Gln Leu Val 415 420 425	723	
ACC AAC GCC TGC CTC ATA AAG GAG GTG GAC ATC TAT ACC GTC AAG GTG Thr Asn Ala Cys Leu Ile Lys Glu Val Asp Ile Tyr Thr Val Lys Val 430 435 440	771	
GAA GAC CTG ACC TTC ACC TCC CCG TTC TGC CTG CAA GTG AAG CGG AAT Glu Asp Leu Thr Phe Thr Ser Pro Phe Cys Leu Val Lys Arg Asn 445 450 455	819	
GAC TAC GTG CAC GCC CTG GTG GCC TAC TTC AAC ATC GAG TTC ACA CGC Asp Tyr Val His Ala Leu Val Ala Tyr Phe Asn Ile Glu Phe Thr Arg 460 465 470 475	867	10
TGC CAC AAG AGG ACC GGC TTC TCC ACC AGC CCC GAG TCC CCG TAC ACG Cys His Lys Arg Thr Gly Phe Ser Thr Ser Pro Glu Ser Pro Tyr Thr 480 485 490	915	
CAC TGG AAG CAG ACG GTG TTC TAC ATG GAG GAC TAC CTG ACC GTG AAG His Trp Lys Gln Thr Val Phe Tyr Met Glu Asp Tyr Leu Thr Val Lys 495 500 505	963	
ACG GGC GAG GAG ATC TTC GGC ACC ATC GGC ATG CGG CCC AAC GCC AAG Thr Gly Glu Glu Ile Phe Gly Thr Ile Gly Met Arg Pro Asn Ala Lys 510 515 520	1011	
AAC AAC CGG GAC CTG GAC TTC ACC ATC GAC CTG GAC TTC AAG GGC CAG Asn Asn Arg Asp Leu Asp Phe Thr Ile Asp Leu Asp Phe Lys Gly Gln 525 530 535	1059	20
CTG TGC GAG CTG TCC TGC TCC ACC GAC TAC CGG ATG CGC TGAGGCCCGG Leu Cys Glu Leu Ser Cys Ser Thr Asp Tyr Arg Met Arg 540 545 550	1108	
CTCTCCCGCC CTGCACGAGC CCAGGGGCTG AGCGTTCCTA GCGGTTTCG GGGCTCCCC	1168	
TTCCTCTCCC TCCCTCCCGC AGAAGGGGGT TTTAGGGGCC TGGGCTGGGG GGATGGGGAG	1228	
GGCACATTGG GACTGTGTTT TTCATAAATT ATGTTTTAT ATGTTGCAT TTAATGCCAA	1288	
TAAATCCTCA GCTGGGGAAA	1308	

(2) 配列番号8に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：361アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号8：

30

Met Glu Asn Phe Val Ala Thr Leu Ala Asn Gly Met Ser Leu Gln Pro
 1 5 10 15
 Pro Leu Glu Glu Val Ser Cys Gly Gln Ala Glu Ser Ser Glu Lys Pro
 20 30
 Asn Ala Glu Asp Met Thr Ser Lys Asp Tyr Tyr Phe Asp Ser Tyr Ala
 35 40 45
 His Phe Gly Ile His Glu Glu Met Leu Lys Asp Glu Val Arg Thr Leu
 50 55 60
 Thr Tyr Arg Asn Ser Met Phe His Asn Arg His Leu Phe Lys Asp Lys
 65 70 75 80
 Val Val Leu Asp Val Gly Ser Gly Thr Gly Ile Leu Cys Met Phe Ala
 85 90 95
 Ala Lys Ala Gly Ala Arg Lys Val Ile Gly Ile Glu Cys Ser Ser Ile
 100 105 110
 Ser Asp Tyr Ala Val Lys Ile Val Lys Ala Asn Lys Leu Asp His Val
 115 120 125
 Val Thr Ile Ile Lys Gly Lys Val Glu Glu Val Glu Leu Pro Val Glu
 130 135 140
 Lys Val Asp Ile Ile Ile Ser Glu Trp Met Gly Tyr Cys Leu Phe Tyr
 145 150 155 160
 Glu Ser Met Leu Asn Thr Val Leu Tyr Ala Arg Asp Lys Trp Leu Ala
 165 170 175
 Pro Asp Gly Leu Ile Phe Pro Asp Arg Ala Thr Leu Tyr Val Thr Ala
 180 185 190
 Ile Glu Asp Arg Gln Tyr Lys Asp Tyr Lys Ile His Trp Trp Glu Asn
 195 200 205
 Val Tyr Gly Phe Asp Met Ser Cys Ile Lys Asp Val Ala Ile Lys Glu
 210 215 220
 Pro Leu Val Asp Val Val Asp Pro Lys Gln Leu Val Thr Asn Ala Cys
 225 230 235 240
 Leu Ile Lys Glu Val Asp Ile Tyr Thr Val Lys Val Glu Asp Leu Thr
 245 250 255
 Phe Thr Ser Pro Phe Cys Leu Gln Val Lys Arg Asn Asp Tyr Val His
 260 265 270
 Ala Leu Val Ala Tyr Phe Asn Ile Glu Phe Thr Arg Cys His Lys Arg
 275 280 285
 Thr Gly Phe Ser Thr Ser Pro Glu Ser Pro Tyr Thr His Trp Lys Gln
 290 295 300
 Thr Val Phe Tyr Met Glu Asp Tyr Leu Thr Val Lys Thr Gly Glu Glu
 305 310 315 320
 Ile Phe Gly Thr Ile Gly Met Arg Pro Asn Ala Lys Asn Asn Arg Asp
 325 330 335
 Leu Asp Phe Thr Ile Asp Leu Asp Phe Lys Gly Gln Leu Cys Glu Leu
 340 345 350
 Ser Cys Ser Thr Asp Tyr Arg Met Arg
 355 360

10

20

30

40

(2) 配列番号9に関する情報:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 353アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

50

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号9：

Met	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn	Cys	Ile	Met	Glu	Val	Ser	Cys	Gly	
1				5					10					15		
Gln	Ala	Glu	Ser	Ser	Glu	Lys	Pro	Asn	Ala	Glu	Asp	Met	Thr	Ser	Lys	
			20					25					30			
Asp	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Tyr	Ala	His	Phe	Gly	Ile	His	Glu	Glu	Met	
		35					40					45				
Leu	Lys	Asp	Glu	Val	Arg	Thr	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asn	Ser	Met	Phe	His	
	50					55					60					
Asn	Arg	His	Leu	Phe	Lys	Asp	Lys	Val	Val	Leu	Asp	Val	Gly	Ser	Gly	
65					70					75					80	
Thr	Gly	Ile	Leu	Cys	Met	Phe	Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Ala	Arg	Lys	Val	
				85					90					95		
Ile	Gly	Ile	Glu	Cys	Ser	Ser	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ala	Val	Lys	Ile	Val	
			100					105					110			
Lys	Ala	Asn	Lys	Leu	Asp	His	Val	Val	Thr	Ile	Ile	Lys	Gly	Lys	Val	
		115					120					125				
Glu	Glu	Val	Glu	Leu	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ile	Ile	Ile	Ser	Glu	
	130					135					140					
Trp	Met	Gly	Tyr	Cys	Leu	Phe	Tyr	Glu	Ser	Met	Leu	Asn	Thr	Val	Leu	
145					150					155					160	
His	Ala	Arg	Asp	Lys	Trp	Leu	Ala	Pro	Asp	Gly	Leu	Ile	Phe	Pro	Asp	
				165					170					175		
Arg	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Thr	Ala	Ile	Glu	Asp	Arg	Gln	Tyr	Lys	Asp	
			180					185					190			
Tyr	Lys	Ile	His	Trp	Trp	Glu	Asn	Val	Tyr	Gly	Phe	Asp	Met	Ser	Cys	
		195					200					205				
Ile	Lys	Asp	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Pro	Leu	Val	Asp	Val	Val	Asp	Pro	
	210					215					220					
Lys	Gln	Leu	Val	Thr	Asn	Ala	Cys	Leu	Ile	Lys	Glu	Val	Asp	Ile	Tyr	
225					230					235					240	
Thr	Val	Lys	Val	Glu	Asp	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Pro	Phe	Cys	Leu	Gln	
				245					250					255		
Val	Lys	Arg	Asn	Asp	Tyr	Val	His	Ala	Leu	Val	Ala	Tyr	Phe	Asn	Ile	
			260					265					270			
Glu	Phe	Thr	Arg	Cys	His	Lys	Arg	Thr	Gly	Phe	Ser	Thr	Ser	Pro	Glu	
		275					280					285				
Ser	Pro	Tyr	Thr	His	Trp	Lys	Gln	Thr	Val	Phe	Tyr	Met	Glu	Asp	Tyr	
	290					295					300					
Leu	Thr	Val	Lys	Thr	Gly	Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Thr	Ile	Gly	Met	Arg	
305					310					315					320	
Pro	Asn	Ala	Lys	Asn	Asn	Arg	Asp	Leu	Asp	Phe	Thr	Ile	Asp	Leu	Asp	
				325					330					335		
Phe	Lys	Gly	Gln	Leu	Cys	Glu	Leu	Ser	Cys	Ser	Thr	Asp	Tyr	Arg	Met	
			340					345					350			
Arg																

10

20

30

40

50

- (2) 配列番号10に関する情報：
 - (i) 配列の特性：
 - (A) 配列の長さ：360アミノ酸
 - (B) 配列の型：アミノ酸
 - (C) 鎖の数：1本鎖
 - (D) トポロジー：直線状
 - (ii) 配列の種類：タンパク質
 - (xi) 配列：配列番号10：

Met	Glu	Asn	Phe	Val	Ala	Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	Met	Ser	Leu	Gln	Pro	
1				5					10					15		
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Cys	Gly	Gln	Ala	Glu	Ser	Ser	Glu	Lys	Pro	
			20					25					30			
Asn	Ala	Glu	Asp	Met	Thr	Ser	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Tyr	Ala	
		35					40					45				
His	Phe	Gly	Ile	His	Glu	Glu	Met	Leu	Lys	Asp	Glu	Val	Arg	Thr	Leu	
	50					55					60					
Thr	Tyr	Arg	Asn	Ser	Met	Phe	His	Asn	Arg	His	Leu	Phe	Lys	Asp	Lys	
65					70					75					80	
Val	Val	Leu	Asp	Val	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Ile	Leu	Cys	Met	Phe	Ala	
				85					90					95		
Ala	Lys	Ala	Gly	Ala	Arg	Lys	Val	Ile	Gly	Ile	Val	Cys	Ser	Ser	Ile	
			100					105						110		
Ser	Asp	Tyr	Ala	Val	Lys	Ile	Val	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu	Asp	His	Val	
		115					120					125				
Val	Thr	Ile	Ile	Lys	Gly	Lys	Val	Glu	Glu	Val	Glu	Leu	Pro	Val	Glu	
	130					135					140					
Lys	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala	Ser	Ser	Thr	
145					150					155					160	
Ser	Pro	Cys	Ser	Thr	Pro	Cys	Ser	Met	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Pro	
				165					170					175		
Asp	Gly	Leu	Ile	Phe	Pro	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Thr	Ala	Ile	
			180					185					190			
Glu	Asp	Arg	Gln	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Lys	Ile	His	Trp	Trp	Glu	Asn	Val	
		195					200					205				
Tyr	Gly	Phe	Asp	Met	Ser	Cys	Ile	Lys	Asp	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Pro	
	210					215					220					
Leu	Val	Asp	Val	Val	Asp	Pro	Lys	Gln	Leu	Val	Thr	Asn	Ala	Cys	Leu	
225					230					235					240	
Ile	Lys	Glu	Val	Asp	Ile	Tyr	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Asp	Leu	Thr	Phe	
				245					250					255		
Thr	Ser	Pro	Phe	Cys	Leu	Gln	Val	Lys	Arg	Asn	Asp	Tyr	Val	His	Ala	
			260					265					270			
Leu	Val	Ala	Tyr	Phe	Asn	Ile	Glu	Phe	Thr	Arg	Cys	His	Lys	Arg	Thr	
		275					280					285				
Gly	Phe	Ser	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser	Pro	Tyr	Thr	His	Trp	Lys	Gln	Thr	
	290					295					300					
Val	Phe	Tyr	Met	Glu	Asp	Tyr	Leu	Thr	Val	Lys	Thr	Gly	Glu	Glu	Ile	
305					310					315					320	
Phe	Gly	Thr	Ile	Gly	Met	Arg	Pro	Asn	Ala	Lys	Asn	Asn	Arg	Asp	Leu	
				325					330					335		
Asp	Phe	Thr	Ile	Asp	Leu	Asp	Phe	Lys	Gly	Gln	Leu	Cys	Glu	Leu	Ser	
			340					345					350			
Cys	Ser	Thr	Asp	Tyr	Arg	Met	Arg									
		355					360									

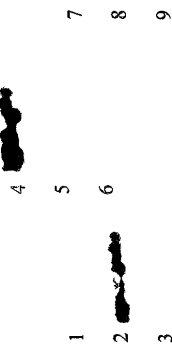
(2) 配列番号11に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：10アミノ酸

【 図 1 】

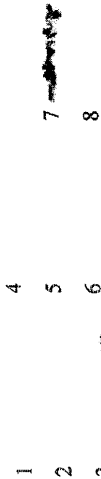
FIG. 1



Number	pACT	pAS or pGBT10	Number	pACT	pAS or pGBT10
1	IRIB1	laminin	5	IRIB1	rev
2	IRIB1	IFNARI-C	6	IRIB1	cdk
3	vector	IFNARI-C	7	IRIB1	tat
4	-lacZ	control -	8	IRIB1	p53
			9	IRIB1	vector

【 図 2 】

FIG. 2



Number	pACT	pAS or pGBT10	Number	pACT	pAS or pGBT10
1	IRIB4	vector	5	IRIB4	tat
2	IRIB4	p53	6	IRIB4	rev
3	IRIB4	IFNARI-C	7	- lacZ	control -
4	IRIB4	cdk	8	IRIB4	laminin

【 図 3 】

FIG. 3

```

CGT CTG CAG GCG AGT TGG CGG AGC TGT GCG CGC GGC GGG GCG ATG GGG GGC TCG GGC AGT 60
ARG LEU SER LYS GLU LEU LEU ALA GLU TYR GLN ASP LEU THR PHE LEU THR LYS GLN GLU 120
ATC CTC CTA GCC CAC AGG CGG TTT TGT GAG CTG CTT CCC CAG GAG CAG CGG AGC GTG GAG 180
ILE LEU LEU ALA HIS ARG ARG PHE CYS GLU LEU LEU PRO GLN GLU GLN ARG SER VAL GLU
TCG TCA CTT CGG GCA CAA GTG CCC TTC GAG CAG ATT CTC AGC CTT CCA GAG CTC AAG GCC 240
AAC CCC TTC AAG GAG GGA ATC TGC AGG GTC TTC TCC ACA TCC CCA GCC AAA GAC AGC CTT 300
ASN PRO PHE LYS GLU ARG ILE CYS ARG VAL PHE SER THR SER PRO ALA LYS ASP SER LEU
AGC TTT GAG GAC TTC CTG GAT CTC CTC AGT GTG TTC AGT GAC ACA GCC AGC CCA GAC ATC 360
SER PHE GLU ASP PHE LEU ASP LEU LEU SER VAL PHE SER ASP THR ALA THR PRO ASP ILE
AAG TCC CAT TAT GCC TTC CGC ATC TTT GAC TTT GAT GAT GAC GGA ACC TTG AAC AGA GAA 420
LYS SER HIS TYR ALA PHE ARG ILE PHE ASP PHE ASP ASP GLY THR LEU ASN ARG GLU
GAC CTG AGC CGG CTG GTG AAC TGC CTC ACC GGA GAG GGC GAG GAC ACA CGG CTT AGT GCG 480
ASP LEU SER ARG LEU VAL ASN CYS LEU THR GLY GLU GLY GLU ASP THR ARG LEU SER ALA
TCT GAG ATG AAG CAG CTC ATC GAC TAC ATC CTG GAA GAG TCT GAC ATT GAC AGG GAT GGA 540
SER GLU MET LYS GLN LEU ILE ASP TYR ILE LEU GLU LEU SER ASP ILE ASP ARG ASP GLY
ACC ATC AAC CTC TCT GAG TTC CAG CAC CTC ATC TCC CTT TCT CCA GAC TTT GCC AGC TCC 600
THR ILE ASN LEU SER GLU PHE GLN HIS VAL ILE SER ARG SER PRO ASP PHE ALA SER SER
TTT AAG ATT GTC CTG TGA CAG CAG CCC CAG CGT GTG TCC TGG CAC CCT GTC CAA GAA CCT 660
PHE LYS ILE VAL LEU
TTC TAC TGC TGA GCT GTC GCC AAG GTC AAG CCT GTG TTG CCA GTG CGG GCC AAG CTG GCC 720
CAG CCT GGA GCT GGC GCT GTG CAG CTT CAC CCC GGG CAG GGG CGG CCC TCG TGA GGG 780
CCT CTC CTC ACT GCT GTT GTC ATT GCT CCG TTT GTG GGC CTT GCT GGC CA 830

```

【 図 4 】

FIG. 4

カルシニューリン(B(Calb)およびカルトラチン(Catr)を伴うIRIB1の配列

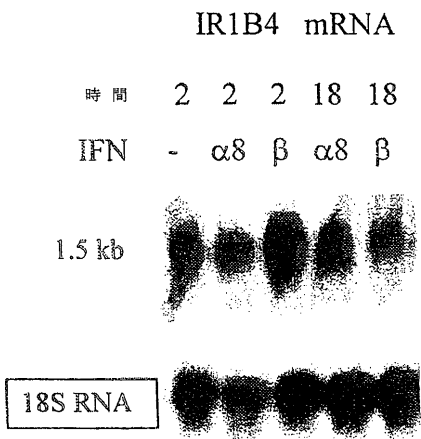
```

IRIB1 MGGSSRLSKELLAAYDYDITELTKOELLIAH
CALB CNEASYPLEMGSHFDA
CATR MASNFKKANNASSQRKRMSPKPELTE
IRIB1 32 RRFCLELPQORSVSSLRQVPEQILSLPELKANFKERICRVFTSP
CALB 17 DEIKRLGKRFKLLDMSGLSVEEF.MSLPELQQNPL...VORVIDIF.
CATR 28 EQKQEIIEAFLDFDADGTGTTIDYKELKVMRALGPEFKKEIKRMISEI.
IRIB1 82 AKDLSFEDELDDLVSFSDTAT.PDIKS...HYAFRIFFDDDGLNREGLS
CALB 62 DTDGNGEVDFKFIEGVSOFSYKQKQKURFARFRIYDMKDGYSINGELF
CATR 76 DKEGTGMNFGDFLVTMFOKMSKDKTEELKAFKLFDDDETGKISFKNLK
IRIB1 130 RLVNCLTGEGETRLSASEMKQLIDYILEESDIDRDGTINLSFFQHVI
CALB 113 QVLRMMVGNLKDQIQIVDKTIIN...ADKDGGRISFEFFCAVV
CATR 128 RVAKEL.GENLTDEELQEMIDE.....ADRDGGEVSEGEFLRIM
IRIB1 178 SRSPDFASSKIVL 191
CALB 157 GGLDIHKRMVDV 169
CATR 167 KKTSLY 172

```

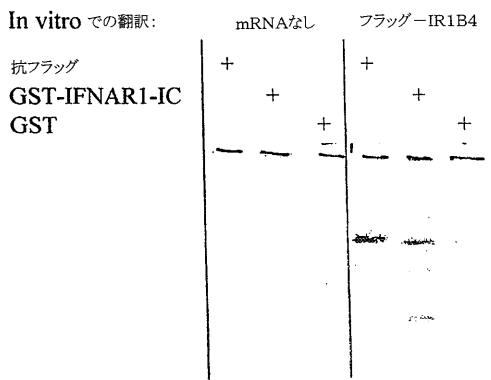
【図5】

FIG. 5



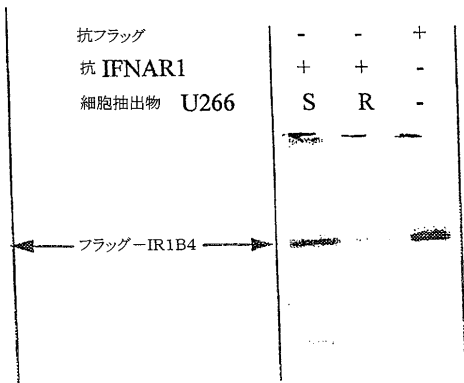
【図6A】

FIG. 6A



【図6B】

FIG. 6B



【図7】

FIG. 7

```

1 GCC GCG AAC TGC ATC ATG GAG AAT TTT GTA GCC ACC TTG GCT 42
43 AAT GGG ATG AGC CTC CAG CCG CCT CTT GAA GAA GTG TCC TGT 84
   N G M S L Q P P L E E V S C
85 GGC CAG CCG GAA AGC AGT GAG AAG CCC AAC GCT GAG GAC ATG 126
   G Q A E S S E K P N A E D M
127 ACA TCC AAA GAT TAC TAC TTT GAC TCC TAC GCA CAC TTT GGC 168
   T S K D Y Y F D S Y A H F G
169 ATC CAC GAG GAG ATG CTG AAG GAC GAG GAG CGC ACC CTC ACT 210
   I H E E M L K D E GTG CGC ACC CTC ACT
211 TAC CGC AAC TCC ATG TTT CAT AAC CGG CAC CTC TTC AAG GAC 252
   Y R N S M F H N R H L F K D
253 AAG GTG GTG CTG GAC GTC GGC TCG GCC ACC GGC ATC CTC TGC 294
   K V V L D V G S G T G I L C
295 ATG TTT GCT GCC AAG GCC GGG GCC CGC AAG GTC ATC GGG ATC 336
   M F A A K A S A R K V I G I
337 GAG TGT TCC AGT ATC TCT GAT TAT GGG GTG AAG ATC GTC AAA 378
   E C S S I S D V K I V K
379 GCC AAC AAG TTA GAC CAC GTG GTG ACC ATC ATC AAG GGG AAG 420
   A N K L D H V V T I I K G K
421 GTG GAG GAG GTG GAG CTC CCA GTG GAG AAG GTG GAC ATC ATC 462
   V E E V E L P V E K V D I I
463 ATC AGC GAG TGG ATG GGC TAC TGC CTC TTC TAC GAG TCC ATG 504
   W E H M G Y C L F Y E S M
505 CTC AAC ACC CTG CTC TAT GCC CGG GAC AAG TGG CTG GCG CCC 546
   L N T V L A R D K W L A P
547 GAT GGC CTC ATC TTC CCA GAC CGG GCC ACC CTG TAT GTG ACG 588
   D G L I F P D R A T L Y V T
589 GCC ATC GAG GAC CGG CAG TAC AAA GAC TAC AAG ATC CAC TGG 630
   A I E D R Q Y K D Y K I H W
631 TGG GAG AAC GTG TAT GGC TTC GAC ATG TCT TGC ATC AAA GAT 672
   H E N V Y G F D M S C I K D
673 GTG GCC ATT AAG GAG CCC CTA GTG GAT GTC GTG GAC CCC AAA 714
   V A I K E P L V D V V D P K
715 CAG CTG GTC ACC AAC GCC TGC CTC ATA AAG GAG GTG GAC ATC 756
   Q L V T N A C L I K E V D I
757 TAT ACC GTC AAG GTG GAA GAC CTG ACC TTC ACC TCC CCG TTC 798
   Y T V K V E D L T F T S P F
799 TGC CTG CAA GTG AAG CCG AAT GAC TAC GTG CAC GCC CTG GTG 840
   C L Q V K R N D Y V H A L G
841 GCC TAC TTC AAC ATC GAG TTC ACA CGC TGC CAC AAG AGG ACC 882
   A Y F N E F T R C H K R T
883 GGC TTC TCC ACC AGC CCC GAG TCC CCG TAC ACG CAC TGG AAG 924
   G F S T S P E GAC TAC Y T H W K
925 CAG ACG GTG TTC TAC ATG GAG GAC TAC CTG ACC GTG AAG ACG 966
   Q T V F Y M E D Y L T V K T
967 GGC GAG GAG ATC TTC GGC ACC ATC GGC ATG CGG CCC AAC GTC 1008
   G E E I F G T I G M R P N A
1009 AAG AAC AAC CCG GAC CTG GAC TTC ACC ATC GAC CTG GAC TCC 1050
   K N N R D L D F T I D L D F
1051 AAG GCC CAG CTG TGC GAG TCC TGC TCC ACC GAC TAC CCG 1092
   K G Q L C E L S C S T D Y R
1093 ATG CGC TGA GGC CCG GCT CTC CCG CCC TGC ACG AGC CCA GGG 1134
   M R
1135 GCT GAG CGT TCC TAG CCG GTT TCG GGG CTC CCC CTT CTT CTC 1176
1177 CCT CCC TCC CGC AGA AGG GGG TTT TAG GGG CCT GGG CTG GGG 1218
1219 GGA TGG GGA GGG CAC ATT GGG ACT GTG TTT TTC ATA AAT TAT 1260
1261 GTT TTT ATA TGG TTG CAT TTA ATG CCA ATA AAT CCT CAG CTG 1302
1303 GGG AAA
  
```

【 図 8 】

FIG. 8

IR1B4	10	20	30	40	50	60
	MENFVTLANGNSIQPFLIEVSCGQAESSEKFNPAEDMTSKDYFDSYAHFGIHEMLKDE					
PRMT1	10	20	30	40	50	60
	MA-----AARANCLIMEVSCGQAESSEKFNPAEDMTSKDYFDSYAHFGIHEMLKDE					
IR1B4	70	80	90	100	110	120
	VRTLYRNSFHNHLLFKDKVLDVSGTGILCMFAKAGARKVIGIECSSISDYAVKIV					
PRMT1	70	80	90	100	110	120
	VRTLYRNSFHNHLLFKDKVLDVSGTGILCMFAKAGARKVIGIECSSISDYAVKIV					
IR1B4	130	140	150	160	170	180
	KANKLDHVTIIGKVEVELPVEKVDIIISEMNGICLFESMLNLYIARQKWLADGL					
PRMT1	130	140	150	160	170	180
	KANKLDHVTIIGKVEVELPVEKVDIIISEMNGICLFESMLNLYIARQKWLADGL					
IR1B4	190	200	210	220	230	240
	IFPDRALYVAIEDRQYKDIHWENYVGFDMSCIKDVAIKFPLVDVDPKQLVTNAC					
PRMT1	190	200	210	220	230	240
	IFPDRALYVAIEDRQYKDIHWENYVGFDMSCIKDVAIKFPLVDVDPKQLVTNAC					
IR1B4	250	260	270	280	290	300
	LIKEVDIYVKEDELTFSPFCLQVRNDYVHALVAFNIEFTRCHKRTGFTSPESFT					
PRMT1	250	260	270	280	290	300
	LIKEVDIYVKEDELTFSPFCLQVRNDYVHALVAFNIEFTRCHKRTGFTSPESFT					
IR1B4	310	320	330	340	350	360
	HWKQTVFYMEDYLVKTEGIEFGTIGMRENANRRDLDTIDLDKQGLCELSCSTDYRMR					
PRMT1	310	320	330	340	350	360
	HWKQTVFYMEDYLVKTEGIEFGTIGMRENANRRDLDTIDLDKQGLCELSCSTDYRMR					

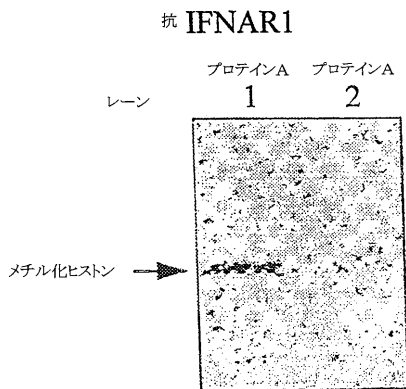
【 図 9 】

FIG. 9

IR1B4	10	20	30	40	50	60
	MENFVTLANGNSIQPFLIEVSCGQAESSEKFNPAEDMTSKDYFDSYAHFGIHEMLKDE					
HCP-1	10	20	30	40	50	60
	MENFVTLANGNSIQPFLIEVSCGQAESSEKFNPAEDMTSKDYFDSYAHFGIHEMLKDE					
IR1B4	70	80	90	100	110	120
	VRTLYRNSFHNHLLFKDKVLDVSGTGILCMFAKAGARKVIGIECSSISDYAVKIV					
HCP-1	70	80	90	100	110	120
	VRTLYRNSFHNHLLFKDKVLDVSGTGILCMFAKAGARKVIGIECSSISDYAVKIV					
IR1B4	130	140	150	160	170	180
	KANKLDHVTIIGKVEVELPVEKVDIIISEMNGICLFESMLNLYIARQKWLADPG					
HCP-1	130	140	150	160	170	180
	KANKLDHVTIIGKVEVELPVEKVDIIISEMNGICLFESMLNLYIARQKWLADPG					
IR1B4	190	200	210	220	230	240
	LIFPDRALYVAIEDRQYKDIHWENYVGFDMSCIKDVAIKFPLVDVDPKQLVTNA					
HCP-1	190	200	210	220	230	240
	LIFPDRALYVAIEDRQYKDIHWENYVGFDMSCIKDVAIKFPLVDVDPKQLVTNA					
IR1B4	240	250	260	270	280	290
	CLIKEVDIYVKEDELTFSPFCLQVRNDYVHALVAFNIEFTRCHKRTGFTSPESPY					
HCP-1	240	250	260	270	280	290
	CLIKEVDIYVKEDELTFSPFCLQVRNDYVHALVAFNIEFTRCHKRTGFTSPESPY					
IR1B4	300	310	320	330	340	350
	THWKQTVFYMEDYLVKTEGIEFGTIGMRENANRRDLDTIDLDKQGLCELSCSTDYRMR					
HCP-1	300	310	320	330	340	350
	THWKQTVFYMEDYLVKTEGIEFGTIGMRENANRRDLDTIDLDKQGLCELSCSTDYRMR					

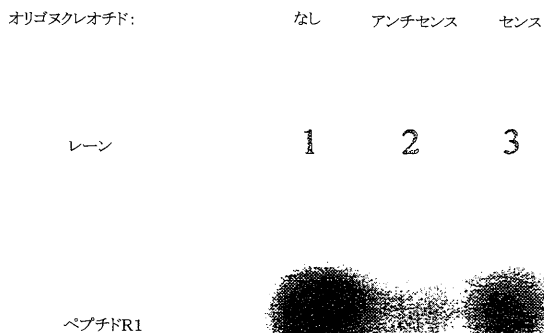
【 図 10 】

FIG. 10



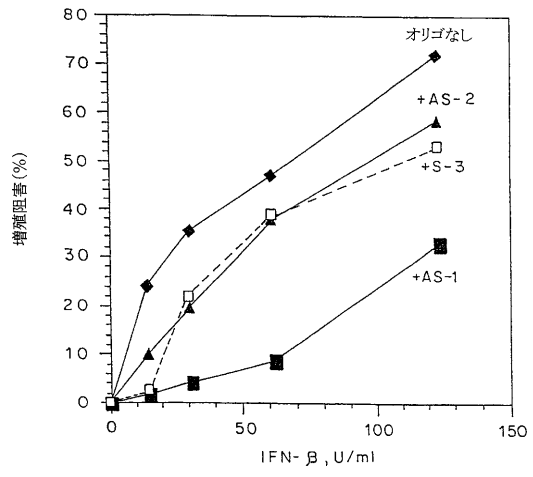
【 図 11 】

FIG. 11



【図 12】

FIG. 12



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/00 (2006.01)	C 1 2 N	5/00
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	37/66 Z
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1

- (72)発明者 レベル、マイケル
 イスラエル国、7 6 1 0 0 レホボト、ベイト ブラジル 5、ワイズマン インスティテュート
 オブ サイエンス(番地なし)
- (72)発明者 アブラモビッチ、カロライナ
 イスラエル国、ヤブネ、ハセイファン ストリート 3 2
- (72)発明者 チェバス、ジュディス イー
 イスラエル国、7 6 1 0 0 レホボト、レホブ ミラー 1 3

審査官 植原 克典

- (56)参考文献 NCBI sequence HSU83236, Human Snk interacting protein 2-28 mRNA, 1 9 9 7年 1月 2日
 NIKAWA Jun-ichi et al., Structural and functional conservation of human and yeast HCP1
 genes which can suppress the growth defect of the Saccharomyces cerevisiae ire15 muta
 nt, gene, 1 9 9 6年 1月, 171(1), pp.107-111

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00 - 15/90
 DDBJ/GenBank/EMBL/GeneSeq
 UniProt/SwissProt/BIOSIS
 MEDLINE/CA/WPIDS(STN)