

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4283531号  
(P4283531)

(45) 発行日 平成21年6月24日 (2009. 6. 24)

(24) 登録日 平成21年3月27日 (2009. 3. 27)

(51) Int. Cl.

F 1

<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/00</b>	<b>Z N A A</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>37/02</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>11/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>11/00</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>11/06</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>11/06</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	

請求項の数 9 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-373330 (P2002-373330)  
 (22) 出願日 平成14年12月25日 (2002. 12. 25)  
 (65) 公開番号 特開2004-201547 (P2004-201547A)  
 (43) 公開日 平成16年7月22日 (2004. 7. 22)  
 審査請求日 平成17年12月22日 (2005. 12. 22)

(73) 特許権者 000002956  
 田辺三菱製薬株式会社  
 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 2 番 1 〇 号  
 (72) 発明者 内藤 幸嗣  
 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号  
 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内  
 (72) 発明者 宇野 修正  
 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号  
 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内  
 (72) 発明者 朝倉 栄二  
 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号  
 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

審査官 渡邊 潤也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マスト細胞の細胞死誘発剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P T D および、M I T F 阻害活性を有する M I T F 変異体である M I T F の A タイプの N 末領域 ( 1 - 3 0 5 ) 断片から構成される融合蛋白質。

【請求項 2】

配列表の配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列で表される請求項 1 に記載の融合蛋白質。

【請求項 3】

融合蛋白質が、配列表の配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列の 1 又は複数個のアミノ酸を置換、欠失、挿入又は付加してなる融合蛋白質であり、かつその活性が配列表の配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列で構成される融合蛋白質が有する M I T F 阻害活性と同等であるアミノ酸配列で表される請求項 1 に記載の融合蛋白質。

【請求項 4】

請求項 2 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる D N A。

【請求項 5】

配列表の配列番号 2 4 で示される塩基配列からなる請求項 4 に記載の D N A。

【請求項 6】

融合蛋白質のアミノ酸配列をコードする D N A が、配列表の配列番号 2 4 で示される塩基配列の 1 又は複数個の塩基を置換してなる D N A であり、かつそのアミノ酸配列で構成される融合蛋白質が有する M I T F 阻害活性が配列表の配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列で構成される融合蛋白質が有する M I T F 阻害活性と同等であるアミノ酸配列をコード

10

20

する請求項 4 に記載の DNA。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の融合蛋白質を有効成分とする、アレルギー、喘息、自己免疫疾患、肺線維症、癌、マストサイトーマ又はマストサイトーシスから選ばれる疾患の予防及び/又は治療剤。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の融合蛋白質及び製剤学的に許容しうる担体を含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の融合蛋白質を有効成分とするマスト細胞の細胞死誘発剤。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は MITF 変異体を用いた医薬用途に関する。より詳細には MITF 変異体を構成要素とする融合蛋白質の医薬用途に関する。

【0002】

【従来技術】

MITF (microphthalmia-associated transcription factor の略) は生体内に存在する転写制御因子の一種であり、マスト細胞に特有な、c-kit 遺伝子発現調節能を有する蛋白質である。

【0003】

20

MITF は既知の物質である (非特許文献 1) が、最初に見出されたのは MITF をコードする遺伝子であった。すなわち、当該遺伝子は、mi/mi マウスの原因遺伝子として単離された。mi/mi マウスにおいては、MITF 遺伝子に突然変異、すなわち MITF 遺伝子の転写活性化領域の 1 アミノ酸欠失が生じたため、正常な MITF が発現されない。mi/mi マウスは、眼球の形成不全、メラノサイトの欠損、マスト細胞の消失、骨大理石症を主な症状とする変異マウスであり、メラノサイト、マスト細胞、網膜色素上皮細胞、破骨細胞などの組織で分化異常を呈する。mi/mi マウスにおけるこれらの細胞の分化異常は、正常 MITF が発現されず MITF による遺伝子転写活性化が行われないことに起因する。

【0004】

30

また、正常マウスの組織あるいは培養細胞株を用いたノザンプロットによる発現組織分布の解析で、MITF mRNA が、心臓、メラノサイト、マスト細胞で発現していることが認められた。近年では、MITF には cDNA の 5' 末端の配列が異なるアイソフォーム、すなわちメラノサイト型 (M タイプ)、心臓型 (H タイプ)、A タイプが存在することが報告されている (非特許文献 2)。MITF 遺伝子は 10 個 (M タイプ) あるいは 11 個 (A、H タイプ) のエクソンから構成されており、エクソン 2 以降は 3 タイプ共ほぼ共通である。M タイプにおいては、6 アミノ酸をコードする 18 塩基からなるエクソン 5 b の付加の有無によって、さらに 2 つのタイプに区別される。A と H のタイプはエクソン 1 B 以降が完全に一致しており、5' 末端のエクソン 1 が異なる。A、H タイプと M タイプとは、エクソン 2 以降は共通であるが、M タイプにはエクソン 2 の上流にエクソン 1 B がなく、特異的なエクソン 1 がつながる。また、ゲノム配列からそれぞれのタイプのプロモーターは異なっていることが明らかになっている。

40

【0005】

MITF 蛋白質は、核移行領域、転写活性化領域、DNA 結合領域、二量体形成領域および MITF 自体の活性化領域からなることが推定されており、これら領域を含むことは既知の全てのタイプで共通である。MITF 蛋白質は、その構造の中央に bHLH-Zip (basic-helix-loop-helix/leucine zipper) を有する転写制御因子であり、二量体を形成して DNA に結合し、対象となる遺伝子の転写を活性化する。A タイプと H タイプの転写活性には大きな差があることが報告されており、両タイプ間で遺伝子配列の異なるエクソン 1 に、転写活性を制御する機能があると

50

推測される。

【0006】

また、MITF蛋白質は、メラノサイトにおいては転写制御因子として作用し、メラノサイトの増殖分化、ならびにメラニン合成系等に関わっていることが報告されている。

【0007】

マスト細胞においても、MITF蛋白質はc-kit遺伝子発現を調節する転写制御因子(c-kitプロモーターを活性化する転写因子)として作用することが報告されている(非特許文献3)。c-kit遺伝子は造血前駆細胞、マスト細胞、色素細胞、生殖細胞で発現されており、これら細胞の増殖分化を、SL因子の作用により制御している。マスト細胞において、MITF蛋白質は、c-kit遺伝子発現を制御することによりマスト細胞の生存維持に関わっていると考えられる。

10

【0008】

マスト細胞はアレルギー疾病に関与していることが古くから報告されている(非特許文献4)。また、アレルギー疾病以外にマスト細胞に関わる疾病として、自己免疫疾患、肺線維症、癌、マストサイトーシス、マストサイトーマ等が挙げられる。

【0009】

一方、PTD(Protein Transduction Domainの略)は、生体膜を貫通して蛋白質を細胞内に移行させる(取り込ませる)働きを有するドメインの総称である。例えば、HIV抗原中のドメイン単位で分析したところ、TAT由来ペプチドの部分が、HIV抗原を正常なT細胞内に移行させる働きを有しており、これが細胞感染の一因であることが確認されている(非特許文献5)。こうした知見がベースとなって、TATと同じような働きを有する各種PTDが存在すること、これらのPTDと各種蛋白質を融合させることにより細胞内に移行させる手法が報告されている(非特許文献6)。

20

【0010】

しかしながら、MITFあるいはマスト細胞に関して、PTDを利用して細胞内に移行させる技術については、今までのところ報告例は見出されていない。

【0011】

【特許文献1】

国際公開第00/47765号パンフレット

【特許文献2】

国際公開第01/66735号パンフレット

【特許文献3】

特表2001-513987号公報

【特許文献4】

特表2002-505077号公報

【特許文献5】

特表平5-505102号公報

【特許文献6】

特表2002-512808号公報

【非特許文献1】

セル(Cell)、1993年、74巻、395~404頁

【非特許文献2】

生化学、1999年、71巻1号、61~64頁

【非特許文献3】

ブラッド(Blood)、1996年、88巻4号、1225~1233頁

【非特許文献4】

IgE, mast cells and the allergic response (Ciba Foundation symposium) 147、John Wiley & Sons 出版社、Chichester, UK.、1989年

【非特許文献5】

30

40

50

セル (Cell)、1988年、55巻、1179～1188頁

【非特許文献6】

カレント・オピニオン・イン・モレキュラ・セラピューティクス (Current Opinion in Molecular Therapeutics) 2000、2000年、2巻2号、162～167頁

【非特許文献7】

トレンドズ・イン・ジェネティクス (Trends in Genetics)、1995年、11巻11号、442～448頁

【非特許文献8】

プロシーディング・ネイショナル・アカデミック・ソサイアティ・USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、1988年、85巻、8998～9002頁

10

【非特許文献9】

カレント・プロトコールズ・イン・イムノロジー (ウィレイ) セクション [Current Protocols in Immunology (Wiley) Section] 7.25.2

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、MITF変異体を用いた新規な医薬用途を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

20

本発明者らは、上記の事情を考慮して研究を行った結果、MITF変異体とPTDを組合せることにより、マスト細胞の細胞死を誘発できることを見出して本発明を完成した。

【0014】

すなわち、本発明は、PTDおよびMITF変異体から構成される融合蛋白質を有効成分とするマスト細胞の細胞死誘発剤；PTDおよびMITF変異体から構成される融合蛋白質を有効成分とするマスト細胞が関与する疾患の予防治療剤；HisTag、PTDおよびMITF変異体から構成される融合蛋白質において、MITF変異体がMITFのmi変異体、wh変異体、HLH断片またはAタイプのN末領域(1-305)断片であり、PTDがTAT由来ペプチドである、当該融合蛋白質；前記の融合蛋白質および製剤学的に許容しうる担体を含む医薬組成物；前記の融合蛋白質の製造方法において、遺伝子工学的手法を用いて融合蛋白質を産生する工程を含む、当該製造方法；前記の融合蛋白質をコードするDNA、に関するものである。以下の詳細を説明する。

30

【0015】

【発明の実施の形態】

A. MITF変異体

本発明で用いられるMITF変異体は、天然型(野生型)MITFの変異体であって、MITF阻害活性を有するものであれば、特に限定されるものではない。具体的には、MITFのmi変異体、MITFのwh変異体、その他のMITF変異体、例えば、スプライシングバリエーション(A体、H体、M体、N体由来のいずれでも可)、あるいはMITFの部分構造であってMITF阻害活性を有するもの、例えば、bHLH-Zip(M体のN末196番目から285番目まで)断片、その部分を含むN末側断片、A体のN末領域(N末1番目から305番目まで)断片などが例示される。具体的には、非特許文献7、特許文献1、特許文献2などに開示されたMITF変異体などが挙げられる。特に好ましい変異体は、mi変異体、wh変異体、bHLH-Zip断片(以下、HLH断片)、A体のN末領域(1-305)断片である。これらのアミノ酸配列、塩基配列の関係は表1のとおりである。

40

【0016】

【表1】

MITF変異体	アミノ酸配列	好ましい塩基配列
mi変異体	配列番号1	配列番号2
wh変異体	配列番号3	配列番号4
HLH断片	配列番号5	配列番号6
AタイプN末領域	配列番号21	配列番号22

## 【0017】

また、これらの変異体の構造類似体であっても、当該変異体と実質的に同程度のMITF阻害活性を有するものも本発明の範疇に含まれる。例えば、上述のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸を置換、欠失、挿入または付加したものであって、当該変異体と実質的に同程度の活性を有するものであってもよい。

10

## 【0018】

## B. PTD

本発明で用いられるPTDは、細胞内に取り込まれる（移行する）性質を有するものであれば、特に限定されるものではなく、公知のものを利用できる。具体的には、前記の文献（非特許文献6）中の164頁表2に列挙された各種オリゴペプチド、特許文献3、特許文献4、特許文献5で開示されたPTD用の各種オリゴペプチドなどが例示される。より好ましいPTDは、TAT由来ペプチド（アミノ酸配列はYGRKKRRQRRR、配列番号7、好ましい塩基配列は同8で各々示される）である。PTDはMITF変異体のN末側、C末側のいずれに結合していてもよい。また、結合は直接でもよく、架橋剤（リンカー）を介して間接的なものであってもよい。リンカーとしてはグリシン残基などが例示される。

20

## 【0019】

## C. その他の構成要素（ドメイン）

本発明の融合蛋白質は、精製用アフィニティクロマトにおけるリガンドに対して親和性を有するものを結合していてもよい。当該ドメインは特に限定されるものではなく、公知のものを利用することができる。このような関係にあるものとしては、抗原とその抗体、受容体とそのリガンド、Ni-NTA（ニトリロ三酢酸）とHisTag、アビジン（またはストレプトアビジン）とビオチン、などが例示される。より好ましいのは、HisTag（アミノ酸配列はMGGSHHHHHH、配列番号9、好ましい塩基配列は同10で各々示される）である。本ドメインは融合蛋白質のN末側、C末側のいずれに結合していてもよい。また、結合は直接でもよく、架橋剤（リンカー）を介して間接的なものであってもよい。リンカーとしてはグリシン残基などが例示される。

30

## 【0020】

## D. 融合蛋白質の調製

本発明の融合蛋白質の調製方法としては、1 融合蛋白質全体を、化学的合成手法を用いて合成する方法、2 上記の各構成要素（ドメイン）を各々別個に調製した後に、化学的な反応手段を用いて結合する方法、3 各構成要素をコードする遺伝子を連結した上で遺伝子工学的手法を用いて一気に融合蛋白質として発現させる方法などが例示される。2 の場合、各構成要素の調製方法としては、化学的合成方法、細胞培養法、遺伝子工学的な手法を用いる方法などが挙げられる。PTDはHIV抗原からの切断・単離によっても調製することもできる。

40

## 【0021】

例えば、融合蛋白質を遺伝子工学手法により調製する場合で説明する。

1) 融合蛋白質をコードするDNAを調製する。当該調製は常法により行われる。まず、MITF変異体をコードする遺伝子を調製する。当該遺伝子の調製は、適当な細胞からmRNAを抽出し、逆転写酵素とDNAポリメラーゼを用いてcDNAを合成し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法で増幅することにより得ることができる。具体的には、mRNAの抽出は、市販のmRNA抽出用キットなどを用いて行い、逆転写、cDNA合成および増幅は、市販のcDNA増幅キットなどを用いた5'-RACE法（非特許文献8）ま

50

たは適当なプライマーを用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 法などにより行うことができる。また、適当な細胞からゲノムDNAを抽出し、当該遺伝子をPCRで増幅して得ることもできる。また、公知の報告例、例えば、上述の非特許文献1、特許文献2で開示されたMITFをコードする遺伝子を利用することもできる。例えば、本発明のHLH断片はMITFのMタイプから、AタイプのN末領域(1-305)断片はMITFのAタイプ(MITF A / pCDNA3)から、各々調製することかできる。

#### 【0022】

次いで、PTDをコードする遺伝子を上記と同様の方法により調製し、MITF変異体をコードする遺伝子と連結する。HisTagについても同様である。また、HisTagを担持する市販のプラスミド(pTrcHisB、インビトロジェン社)を用いて、PTD-MITF変異体からなる融合蛋白質をコードするDNAを挿入することにより、本発明の融合蛋白質をコードするDNAを調製することができる。

10

#### 【0023】

2) DNAを適当なベクターに組込んで発現用ベクターを調製する。当該ベクターは特定のプロモーターの制御下に融合蛋白質を発現するために用いる。その組込みは常法により行われる。

#### 【0024】

上記得られた目的のDNAを精製し、ベクターDNAに導入して、宿主・ベクター系を構築することができる。宿主・ベクター系は一般に宿主細胞とコンパチブルな種に由来するレプリコンと、当該宿主を組合せて使用する。ベクターDNAは、複製起点、プロモーター、制御配列(エンハンサー)、シグナル配列、リボソーム結合部位、RNAスプライス配列、ポリA付加部位、転写終結配列(ターミネーター)などを有する。また、形質転換細胞中で表現型の選択が可能となるマーカーの配列を有していてもよい。ベクターDNAとしては、例えば、染色体、エピソード由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来のベクター、またはバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、などのウイルス由来のベクター、あるいはコスミドおよびファージミドなどが挙げられる。また、目的により発現ベクターやクローニングベクターなどを用いることができる。

20

#### 【0025】

プロモーターは公知のものが挙げられ、発現のための宿主に合わせて選択することができる。例えば、大腸菌を宿主とする場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、trcプロモーター(trpプロモーターの-35領域とlacプロモーターの-10領域を連結した合成プロモーター)、T7プロモーターなどのプロモーターが例示される。また、当該発現ベクターはamp<sup>r</sup>などのマーカー遺伝子を担持していてもよい。

30

#### 【0026】

ベクターDNAに本発明に係るDNAを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。例えば、適当な制限酵素を選択し、処理して目的のDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のDNAに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。また、宿主に導入するベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、目的とする蛋白質の製造が可能である。

40

#### 【0027】

3) 発現用ベクターを宿主に導入して形質転換体を調製する。形質転換は常法により行われる。宿主としては、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞などを用いることができる。好ましくは大腸菌である。また、栄養要求性株、抗生物質感受性株を宿主とすることもできる。

#### 【0028】

形質転換体を調製する方法としては、プラスミドを直接宿主細胞内に導入する方法、プラスミドを染色体上に組込む方法などが挙げられる。前者としては、プロトプラストポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法などが例示される。後者としては、宿主

50

染色体中に存在する遺伝子の一部のDNA配列をプラスミドに含有させて、その相同な配列部分を利用して、プラスミドまたはその線状断片を相同組換えにより宿主染色体上に導入することができる。

#### 【0029】

4) 形質転換体を培養し、融合蛋白質を産生する。培養は常法により宿主に応じて適用な培地、培養条件(温度、時間など)を用いて行われる。大腸菌を用いる場合の培養条件としては通常、15~43(好ましくは30~37)程度で、1~100時間程度行う。また、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。培養形式としては、回分培養、半回分培養(フェッド・パッチ培養)、連続培養のいずれであってもよい。

#### 【0030】

5) 産生された融合蛋白質を精製する。宿主として大腸菌を用いた場合はまず菌体を超音波粉碎等の処理により当該蛋白を可溶化する。産生された融合蛋白質の精製は自体公知の手法により行うことができる(特許文献6など)。例えば、Niカラムを用いる方法、陰イオン交換体処理、透析処理などが例示される。また、本発明の融合蛋白質は変性剤(カオトロピック剤)処理後に変性剤を除去して得られたものを用いることが好ましい。変性剤としては尿素、塩酸グアニジン、チオシアン酸塩などが例示される。変性剤処理時の変性剤の添加条件としては、濃度1~10M程度が例示される。具体的には融合蛋白質と変性剤を接触させて処理した後に、変性剤の共存下にNiカラムを用いて処理を行い、さらに陰イオン交換体または透析処理により変性剤を除去する操作を行って、当該融合蛋白質を精製する。

#### 【0031】

E. 調製された融合蛋白質の性状

本発明の融合蛋白質は、細胞内、特にマスト細胞内に移行する性質を有するものである。好ましくは、HisTag、PTDおよびMITF変異体から構成される。このものは10~100キロダルトン(kDa)程度の分子量を有する。好適には、N末側からみて、HisTag、PTD、MITF変異体の順番に並んだものである。具体的な配列としては、表2に示すとおりである。

#### 【0032】

##### 【表2】

融合蛋白質	アミノ酸配列	好ましい塩基配列
HisTag-PTD-MITFのmi変異体	配列番号11	配列番号12
HisTag-PTD-MITFのwh変異体	配列番号13	配列番号14
HisTag-PTD-HLH断片	配列番号15	配列番号16
HisTag-PTD-MITFAタイプのN末領域	配列番号23	配列番号24

#### 【0033】

F. 製剤化

本発明の融合蛋白質の製剤化には、自体公知の手法を用いることができる。例えば融合蛋白質に、製剤学的に許容しうる担体を添加あるいは混合すればよい。製剤化により得られた医薬組成物において、融合蛋白質の濃度として0.1~100μg/mLまたは0.1~100nM程度が例示される。

#### 【0034】

G. 用途

本発明のMITF変異体(または、それを用いた融合蛋白質)はマスト細胞内に移行することにより内在性MITFの活性を阻害する、前駆細胞からのマスト細胞の分化を阻害する、マスト細胞の生存を阻害する、成熟マスト細胞に細胞死(アポトーシス)を誘導する、などの作用を有する。従って、本発明の製剤は、マスト細胞が関与する各種疾患の予防・治療に有用であることが期待される。当該疾患としては、例えば、アレルギー、喘息、自己免疫疾患、肺線維症、癌、マストサイトーシス、マストサイトーマ等が挙げられる。

## 【0035】

## H. 用法・用量

本発明の融合蛋白質の用法・用量としては、生体内において0.001~10 $\mu$ g/mL程度の濃度で存在するように、投与量を選択すればよい。あるいは投与量として、10 $\mu$ g~50mg程度が例示される。投与経路としては、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、経皮投与、気道内投与などが例示される。

## 【0036】

## 【実施例】

本発明をより詳細に説明するために実施例、製剤例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

10

## 【0037】

## 実施例1

## 1) 融合蛋白質発現プラスミドの構築

発現プラスミドは、大腸菌用発現ベクターpTrcHisB(インビトロジェン社、No. V360-20)のHisTag配列の上流に存在するNcoIサイトとマルチクローニングサイト中のHindIIIサイトの間に、精製用のHisTagの下流にPTD配列が接続し、その下流にMITF変異体のcDNAを接続したHisTag-PTD-MITF変異体の遺伝子を挿入することにより構築した。図1を参照のこと。

## 【0038】

MITFのcDNAへのHisTag、PTD配列の付加はPCR法を用いて行った。まず、MITF MタイプのcDNA(pSU054、MITF-M/pT7 Blue)を鋳型にして、MITFおよびBamHIサイトを含む上流部分をPCR法により増幅した。さらに4種類のプライマー(M-tat、Tat3、Tat2、Tat1)を用いてMITFの転写開始コドンの上流にHisTagと制限酵素NcoIの認識配列を付加するまで伸長させた後に、大腸菌用発現ベクターpTrcHisB(このものはlacP/OおよびAmp<sup>r</sup>を担持してなる)のNcoIサイトとBamHIサイトの間にクローニングした。

20

## 【0039】

各プライマーは以下の塩基配列を有する。

M-tat(配列番号17): GCGACGAAGAGGTTATGCTAGAAATAC  
AGTCACCTACC

30

Tat3(配列番号18): GGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGAC  
GAAGAGGTTATG

Tat2(配列番号19): ATCATCATCATGTTGGTTATGGCAG  
GAAGAAAGCGG

Tat1(配列番号20): TAAACCATGGGGGGTTCTCATCATC  
ATCATCATCATGTTG

## 【0040】

次いで、Mタイプ(pSU054)、mi変異体(pSU061、MITF-Mmi/pT7 Blue)、wh変異体(pSU062、MITF-Mwh/pT7 Blue)をそれぞれBamHIとHindIII消化することにより、MITFcDNAの下流部分を単離した。この部分に変異部分も含まれる。単離したcDNA断片を、上流部分をクローニングしたプラスミドのBamHIサイトとHindIIIサイトの間に挿入した。プラスミドpSU81は正常型MITFであるMタイプを含む融合蛋白質の遺伝子を挿入したものである。pSU082はmi変異体を、pSU083はwh変異体を含む融合蛋白質を各々挿入したものである。

40

## 【0041】

## 2) 融合蛋白質の発現

構築した発現プラスミドを大腸菌DH5(東洋紡)に導入し形質転換した。50mLのL-Broth(50 $\mu$ g/mLのアンプシリンを含む)に、大腸菌を1白金耳量となる

50



ように植菌し、37℃で17時間培養した。さらに、1 LのL - B r o t h ( 5 0 μ g / m L のアンピシリンおよび0.2%のグルコースを含む)に、培養液を1%となるように植菌した。A 6 0 0 の濁度が約0.1となるまで37℃で培養した後に、IPTG (イソプロピルチオ - β - D - ガラクトシド)を終濃度0.4 mMとなるように添加した。2時間培養後に大腸菌を集菌した。

#### 【0042】

##### 3) 融合蛋白質の精製

大腸菌を遠心分離にて回収し、8 Mの尿素、0.1 Mの塩化ナトリウム、10 mMのDTTを含む20 mMのHEPES緩衝液(pH 8.0、pHは以下同様)中で超音波粉碎し可溶化した。得られたLysateを8 Mの尿素、0.1 Mの塩化ナトリウム、10 mMのイミダゾール、1 mMのDTTを含む20 mMのHEPES緩衝液で平衡化したNi - NTAアガロース(Q i a g e n社)カラムにアプライし、同緩衝液で洗浄した。カラムに結合した蛋白をA液として同緩衝液、B液として200 mMのイミダゾールを含む同緩衝液を用いたイミダゾールの濃度直線勾配法で溶出し、SDS - PAGE (T e f c o社)で解析して目的の分子量を示す画分をプールした。

#### 【0043】

溶出液1容量に対して、20 mMのHEPES緩衝液を1容量、4 Mの尿素を含む同緩衝液を2容量、各々添加して希釈した溶液を、4 Mの尿素、25 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMのHEPES緩衝液で平衡化した四級アンモニウム塩型強陰イオン交換体(商品名Q - S e p h a r o s e、ファルマシア社)にアプライし、同緩衝液で洗浄した。次に、20 mMのHEPES緩衝液で洗浄して尿素を除去した後に、1 Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液でカラムに結合した蛋白を溶出した。溶出した融合蛋白質は10%グリセロールを含むDulbecco's PBS(等張化リン酸緩衝液)に対して透析した後に分注して-80℃で保存した。

#### 【0044】

得られた最終産物をSDS - PAGEで分析したところ、還元条件下で約50キロダルトンの分子量を示すバンドが観察された。このバンドはウサギ抗MITF抗体と反応した。なお、このウサギ抗MITF抗体は、ウサギにMITFのC末20アミノ酸残基のペプチドを免疫して得られた抗血清を、同ペプチドを結合したカラムを用いてアフィニティ精製を行うことにより、同ペプチドを特異的に認識する抗体を調製したものである。

#### 【0045】

##### 製剤例1

本発明の融合蛋白質、および、10%グリセロールを含むDulbecco's PBSからなる組成物を調製した。

#### 【0046】

##### 実験例1

1) まず、本発明の融合蛋白質が細胞内に移行しているかどうかを確認した。実施例1で調製したMITF変異体の融合蛋白質をFITC(フルオレセイン・イソチオシアネート)で常法により蛍光標識し、COS7細胞に添加した。添加1時間後にFACS(fluorescence - activated cell sorter) Calibur(ベクトン・ディキンソン社)を用いて、蛍光強度を測定した。その結果を表3に示す。

#### 【0047】

##### 【表3】

添加薬剤	蛍光強度のピーク位置 (FL1-H)
PBS (融合蛋白質無添加)	3
HisTag-PTD-MITF の mi 変異体	6
HisTag-PTD-MITF の wh 変異体	10

#### 【0048】

表3から明らかなように強い蛍光が細胞に会合(アソシエート)していることが観察され

10

20

30

40

50

、当該融合蛋白質が細胞内に効率よく移行していることが確認された。

【 0 0 4 9 】

2) 本発明の融合蛋白質が細胞内に移行して内在性 M I T F の活性を阻害するか調べる目的でルシフェラーゼ分析を行った。

【 0 0 5 0 】

発現用プラスミドとして、正常 M I T F 発現用プラスミド p S U 0 6 3 ( M I T F - M / p C D N A 3 )、c - k i t 遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を接続したプラスミドを調製するための各種ベクター、すなわち、C - k i t - R l u c 発現用ベクター p S U 0 5 3 ( C - k i t / R - l u c )、ルシフェラーゼ発現用ベクター p G L 2 ( L l u c、プロメガ社)を用いた。各プラスミドを、C O S 7 細胞に導入(トランスフェクト)した。その条件は以下のとおり。プラスミドの使用量は、6 c m のディッシュ当たり 3  $\mu$ g ( p S U 0 6 3 : p S U 0 5 3 : p G L 2 = 1 : 1 : 0 . 1 )。プラスミドの導入にはトランスフェクションキット( S t r a t a g e n e 社、# 2 0 0 3 8 5 )を用いた。

【 0 0 5 1 】

6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり  $1 \times 10^5$  個の細胞を植え込み、17 時間 C O <sub>2</sub> インキュベータに静置した。10  $\mu$ L の S o l u t i o n 1 ( 前記キットに添付されている試薬。2 . 5 M C a C l <sub>2</sub> からなる ) に 90  $\mu$ L の蒸留水と 3  $\mu$ g の D N A を添加した後に、等量の S o l u t i o n 2 [ 前記キットに添付されている試薬。2  $\times$  P B S ( p H 6 . 9 5 ) からなる ] を加え、室温で 20 分間静置した。混合した D N A 溶液を培養液に添加した。24 時間後に上記の培地を交換し、1  $\mu$ g / m L の本発明の融合蛋白質(実施例 1 で調製)を添加した。

【 0 0 5 2 】

本発明の融合蛋白質の添加 48 時間後に細胞を P B S ( - ) で洗浄し、6 穴のディッシュ当たり 0 . 5 m L の p a s s i v e l y s i s b u f f e r を添加し、スクレーパーを用いて細胞を掻き採った。細胞を 1 . 5 m L 容のチューブに移し、14000 r p m、4 で 5 分間遠心した。ルシフェラーゼ活性の測定は、D u a l l u c i f e r a s e a s s a y k i t ( プロメガ社 ) を用いて行った。96 穴プレート上で 20  $\mu$ L の遠心上清に、100  $\mu$ L の L u c i f e r a s e A s s a y R e a g e n t I I を添加・混合し、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。さらに混合液に 100  $\mu$ L の S t o p & G o R e a g e n t を添加・混合し、ウミシイタケルシフェラーゼ( R - l u c ) 活性を測定した。R - l u c の数値を p G L 2 で補正後、P B S 添加における R - l u c を 1 としたときの値に換算した。その結果を表 4 に示す。

【 0 0 5 3 】

【表 4】

添加薬剤	ルシフェラーゼ活性
p S U 0 5 3 + p S U 0 6 3 + P B S	1 とする
p S U 0 5 3 + p S U 0 6 3 + m i	0 . 9 2
p S U 0 5 3 + p S U 0 6 3 + w h	0 . 7 2

【 0 0 5 4 】

なお、表中の m i は H i s T a g - P T D - M I T F の m i 変異体からなる融合蛋白質、w h は H i s T a g - P T D - M I T F の w h 変異体からなる融合蛋白質、を各々示す。

【 0 0 5 5 】

C O S 細胞が発現するルシフェラーゼ活性も本発明の融合蛋白質存在下で阻害され、当該融合蛋白質が細胞内に移行して内在性 M I T F を阻害することが示唆された。

【 0 0 5 6 】

実験例 2

本発明の融合蛋白質が S C F で誘導されるマスト細胞の分化系にどのように影響するかを

確認した。

#### 【0057】

正常マウスから骨髓細胞を調製し、その $2 \times 10^6$ 個/穴を、10%のFCS、0.1 mMの非必須アミノ酸、1 mMのピルビン酸ナトリウム、2 mMのグルタミン、100 U/mLのペニシリン、100  $\mu$ g/mLのストレプトマイシン、50  $\mu$ Mの2-メルカプトエタノール、2  $\mu$ g/mLの本発明の融合蛋白質(His Tag-PTD-MITFのwh変異体)を含むRPMI 1640中で骨髓細胞因子(SCF、IBL社)50~100 ng/mLの存在下に24穴プレートにて培養した。週に一度培地を半量交換し、その際にSCFも添加した。37℃で21日間培養した後に、マスト細胞数、c-kitおよびIgE受容体の発現量を測定した。

10

#### 【0058】

マスト細胞数の測定はトルイジン青染色法によった。トルイジン青染色は非特許文献9に従い、pH2.7の染色液を用いて行った。

#### 【0059】

c-kitの発現量の測定はFACSを用いて行った。細胞を、0.1%のNaN<sub>3</sub>、0.1%のBSAを含むPBS 100  $\mu$ Lに懸濁し、5~10  $\mu$ g/mLのR-PE(R-phycoerythrin)標識抗マウスc-kit抗体(PharMingen社)あるいはR-PE標識ラットIgG2B, k isotype standard(PharMingen社)と水中で1時間インキュベーションした。洗浄後に1  $\mu$ g/mLのヨウ化ピリジウムを添加して、FACS Calibur(前記)で解析した。IgE受容体の発現量の測定は、5  $\mu$ g/mLのFITC標識マウスIgEを用いて同様にFITCによる解析を行った。マスト細胞数に関する結果を表5に示す。

20

#### 【0060】

##### 【表5】

本発明の融合蛋白質	マスト細胞数	
	培養14日目	培養21日目
未添加	$9 \times 10^4$	$3 \times 10^6$
添加	$3 \times 10^4$	$2 \times 10^5$

30

#### 【0061】

本発明の融合蛋白質の添加群では、培養21日目でマスト細胞数が未添加群に比べて10分の1以下に減少していた。また、c-kitの発現に関する培養21日目の結果を表6に示す。

#### 【0062】

##### 【表6】

本発明の融合蛋白質	蛍光強度のピーク位置
未添加	$1 \times 10^3$
添加	$7 \times 10^1$

40

#### 【0063】

本発明の融合蛋白質の添加群では、培養21日目でc-kitの発現量が未添加群に比べて10分の1以下に減少していた。また、IgE受容体の発現量は変化がなかった(実験データは示さず)。このように本発明の融合蛋白質はマスト細胞前駆細胞のSCF受容体c-kitの発現を特異的に阻害し、その結果、マスト細胞の分化を強く阻害することが確認された。

#### 【0064】

##### 実験例3

本発明の融合蛋白質の、成熟マスト細胞への影響を確認する目的で、線維芽細胞との共培養系でのマスト細胞生存への影響を確認した。

50

## 【 0 0 6 5 】

正常マウスから脾細胞を調製し、10%のFCS、0.1mMの非必須アミノ酸、1mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのグルタミン、100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシン、50μMの2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640中でIL-3 (GENZYME社) またはWEHI-3細胞 conditioned 培地 (WEHI-3 CM) 存在下に3週間以上培養して、脾臓由来培養マスト細胞 (SMC) を得た。6穴プレートに線維芽細胞のNIH-3T3 (理研セルバンク) をコンフルエントまで培養し、当該SMCをIL-3およびWEHI-3 CMを含まず、かつ、1μg/mLの本発明の融合蛋白質を含む、上記の培地に懸濁し、 $3 \times 10^5$  個で播種した。2~3日ごとに新鮮培地に交換した。37℃で15日間培養した後に、マスト細胞数、ヒスタミン量およびキマーゼ活性を測定した。各種実験系を表7に示す。

10

## 【 0 0 6 6 】

## 【表7】

実験系	線維芽細胞	マスト細胞	融合蛋白質
A	○	正常マスト細胞	添加せず
B	○	同上	HisTag-PTD-MITF の mi 変異体
C	○	同上	HisTag-PTD-MITF の wh 変異体
D	○	mi マスト細胞 (mi/miSMC)	添加せず

20

## 【 0 0 6 7 】

ヒスタミンの定量はRIA法 (栄研化学) によった。顆粒中のキマーゼ活性の測定は特異的な合成基質であるN-サクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (シグマ社) を用いて行った。結果を表8に示す。

## 【 0 0 6 8 】

## 【表8】

実験系	マスト細胞数 (個/穴)	キマーゼ活性 (mOD/分/穴)	ヒスタミン (ng/穴)
A	$3 \times 10^4$	14	1.05
B	$1 \times 10^4$	4	0.25
C	$7 \times 10^3$	3	0.2
D	$8 \times 10^2$	0	0.03

30

## 【 0 0 6 9 】

線維芽細胞と正常マスト細胞を共培養するとマスト細胞は長期間生存し続けた。また、MITFに異常を持つ人為的に作成したmiマスト細胞 (mi/miSMC、天然には存在しない) は線維芽細胞との共培養においてアポトーシスにより2週間以内に死滅した。正常マスト細胞と線維芽細胞の共培養に本発明の融合蛋白質 (mi変異体型、wh変異体型) を添加すると、マスト細胞の生存は阻害され、miマスト細胞と同様に2週間後にはほとんどが死滅した。マスト細胞数の低下は、ヒスタミン量の低下およびキマーゼ活性の低下によっても確認された。この結果、本発明の融合蛋白質は、成熟マスト細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。

40

## 【 0 0 7 0 】

## 実験例4

本発明の融合蛋白質の添加濃度における影響を調べた。MC/9マスト細胞株 (ATCCより入手) をFITC標識したHisTag-PTD-MITFのwh変異体からなる融合蛋白質の存在下または非存在下に、FACS染色緩衝液 (0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%アジ化ナトリウムを含むDulbecco's PBS) 中で氷上1時間

50

インキュベートした。洗浄後にヨウ化ピリジウムを添加して死細胞をゲートアウトし、FACS Calibur（前記）で解析した。結果を表9に示す。

【0071】

【表9】

融合蛋白質の添加濃度	蛍光強度のピーク位置
0 (μg/mL)	2.5
2.5	3.5
12.6	7
63	22

10

【0072】

表9の結果から、本発明の融合蛋白質の添加濃度に依存して、当該融合蛋白質が細胞内により高濃度で移行していることが判明した。

【0073】

実施例2： HisTag - PTD - HLH

1) 発現ベクターの構築

発現ベクター作成の鋳型としては正常型のMITFのMタイプ(pSU054)を用いた。HLH断片はMタイプのN末196番目から285番目のアミノ酸までの領域をPCR法により増幅した。増幅断片のN末側には、プライマー(Tat1、Tat2、Tat3およびHLHF)を用い、HisTag、PTDと制限酵素NcoIの認識配列を付加した。またC末側には制限酵素XbaIの認識配列を付加した。増幅断片をNcoI + XbaIで消化し、実施例1で作成したpSU081のNcoI - XbaI領域と置換した。当該増幅断片をTAクローニングし塩基配列が正しいことを確認した。構築したベクターpSU085はlacプロモーター、HisTag - PTD - HLH領域の融合蛋白質のDNA、amp<sup>r</sup>から構成される(図2)。

20

【0074】

プライマーHLHFは以下の塩基配列を有する。

HLHF(配列番号25): GCGACGAAGAGGTATGTTGGCTAAAGAGAGG

30

2) 実施例1に準じて融合蛋白質を産生・精製した。

【0075】

実施例3： HisTag - PTD - MITFのAタイプN末領域

1) 発現ベクターの構築

pSU064(MITFのAタイプ/pCDNA3、特許文献2を参照のこと)を鋳型に、2種類のプライマー(pTD3-MITFa、MITFR-N)を用いてPCRを行い、N末領域(N末1番目から305番目までのアミノ酸)を増幅した。pTD3-MITFaの5'末端にはSacIIサイトを、MITFR-Nの5'末端にはEcoRIサイトを付加した。増幅断片をSacII + EcoRIで消化し、pSU093(pTrcHisを基本骨格とするPTDカセット発現ベクター)の同サイト間に挿入した(図3)。構築した発現ベクターpSU087は、HisTag - PTD - AタイプのN末領域の順にDNA断片がつながり、lacプロモーターの制御下に融合蛋白質が発現する。

40

【0076】

各プライマーは以下の塩基配列を有する。

pTD3-MITFa(配列番号26): CGCCGCGGAATGCAGTCCGAATCGGGAATC

MITFR-N(配列番号27): GAATTCACTATGCTCTTGCTTCA GACTCTGTGGGG

【0077】

2) 実施例1に準じて融合蛋白質を産生した後、これを精製する際に、Ni - アガロース

50

の代わりにTALON(商品名、CLONTECH社)を用いて行った。精製物は10%グリセロール/PBS溶液として調製した。

【0078】

実施例4: pET14bを用いた発現ベクターの構築

pSU083(wh系)のNcoI-NdeI断片とpET14b(T7プロモーター、HisTag、amp<sup>r</sup>)を連結してなる。Takara)の同領域を置換して発現ベクターpSU121を構築した(図4)。このpSU121はT7プロモーターの下流に、HisTag、PTD配列、MITFのwhタイプがつながり、大腸菌の菌体内において、T7プロモーターの制御下に融合蛋白質(HisTag-PTD-MITFのwhタイプ)を発現する。

10

【0079】

実施例1に従い、大腸菌をフラスコで培養し、融合蛋白質(wh系)を産生した。Ni-NTAアガロースを用いた精製を実施例1に準じて行った後に、Slide-A-Dialyzer(Pierce)を用いて透析し脱尿素処理を行った。溶媒としては290mMソルビトール、10μM EDTA、1mMトリス緩衝液(pH8)を用いた。培養液1L当たり約10mgの融合蛋白質が精製された。

【0080】

実施例5: 精製工程(HLH)

融合蛋白質(HLH系、実施例2により調製)をQ-セファロースカラムから1M NaCl/20mM HEPES(pH8)で溶出し、回収した画分を、使用前にPD-10カラム(ファルマシア)を用いてPBSに置換した。

20

【0081】

実施例6: 高密度培養(wh系)

発現ベクターpSU083を大腸菌HB101株に導入し、形質転換体を調製した。EBM0010010培地(アンピシリン添加)を用いてジャーファーメンターで37℃16時間培養し、融合蛋白質を産生した。精製は実施例1に準じて行った。

【0082】

実施例7: 高密度培養(HLH)

pSU085を用いて実施例6に準じて融合蛋白質を産生した。精製を実施例1に準じて行うに際し以下の点を変更した。Ni-NTAアガロース処理時に8M尿素の代わりに6M塩酸グアニジンを用いたこと、陰イオン交換体処理の代わりに分子量3000カット膜を用いて濃縮した後に、0.5M NaCl/20mM HEPES(pH8)で平衡化したPD-10カラム(ファルマシア)で脱塩したこと。0.5M NaCl/20mM HEPES(pH7.4)に対して透析し分注して-80℃で保存した。インビボで使用する際にはNaCl濃度を0.15Mとなるように希釈して用いた。

30

【0083】

製剤例2

融合蛋白質、10%グリセロール、PBSからなる組成物を調製した。

【0084】

製剤例3

融合蛋白質、0.15~1M NaCl、20mM HEPES(pH7.4~8)溶液として調製した。

40

【0085】

実験例5(精製結果)

各種融合蛋白質(実施例1~3により調製)を大腸菌菌体より精製し、その分子量、収量(4Lフラスコ培養当たり)を表10に示した。なお、融合蛋白質(AタイプのN末領域)の分子量は37kDaであった。

【0086】

【表10】

融合蛋白質	分子量 (kDa)	収量 ( $\mu\text{g}$ )
mi系	50	630
wh系	50	400
HLH系	14	130

【0087】

実験例6 (インビトロ阻害)

実験例3に準じて実験した。10 nMの融合蛋白質を17日間作用させた後にマスト細胞数、ヒスタミン、トリプターゼ、キマーゼを測定した。結果を表11に示す。

【0088】

10

【表11】

	HLH系	ベヒクル (溶媒のみ)
マスト細胞数 (個/穴)	$6 \pm 1^{**}$ ( $\times 10^4$ )	$25 \pm 1$ ( $\times 10^4$ )
ヒスタミン (ng/穴)	$52 \pm 4^{**}$	$90 \pm 4$
トリプターゼ (mOD/分)	$2.3 \pm 0.4^{**}$	$10.6 \pm 1.2$
キマーゼ (mOD/分)	$0.23 \pm 0.08^{**}$	$0.78 \pm 0.10$

【0089】

表中の数値は平均 $\pm$ 標準偏差を示す。また\*\*は溶媒群との間に、student's t testにより $p < 0.05$ で有意差があることを示す。また\*は同じく $p < 0.01$ で有意差があることを示す。以下同様。

20

【0090】

実験例7 (同上)

実験例3に準じて実験した。20 nMの融合蛋白質を15日間作用させた後にマスト細胞比率を測定した。結果を表12に示す。本発明の融合蛋白質はマスト細胞の生存を抑制した。

【0091】

【表12】

30

融合蛋白質	マスト細胞比率 (%)
mi系	$0.9 \pm 0.1^{**}$
wh系	$0.7 \pm 0.2^{**}$
HLH系	$0.8 \pm 0.1^{**}$
ベヒクル	$1.4 \pm 0.1$

【0092】

実験例8 (同上)

1) 実験例2に準じて実験を行った。マウス骨髓細胞 ( $2 \times 10^6$  / ウェル) をSCFの存在下に融合蛋白質を添加して28日間培養したときのマスト細胞数を求めた。例数は3とした。結果を表13に示す。

40

【0093】

【表13】

融合蛋白質	添加濃度	マスト細胞数
ベヒクル (PBS)		$8 \times 10^6$
wh系	40 (nM)	$3 \times 10^5$
HLH系	70	$3 \times 10^5$

【0094】

2) 実験は1)に準じて行った。融合蛋白質の添加濃度は2.5 nMとした。ヒスタミン

50

濃度、キマーゼ活性を求めた。結果を表 1 4 に示す。

【 0 0 9 5 】

【表 1 4】

ヒスタミン (ng/mL)	H L H系	2 8 0 ± 4 0 **
	ベヒクル	7 4 0 ± 4 0
キマーゼ (mOD/分)	m i系	0 . 9 ± 0 . 2 *
	H L H系	0 . 6 ± 0 . 2 **
	ベヒクル	1 . 8 ± 0 . 2

10

【 0 0 9 6 】

3 ) 実験は 1 ) と同様に行った。融合蛋白質の添加濃度は 2 . 5 ~ 2 0 n Mとした。細胞数とキマーゼ活性を求めた。例数は 2 とした。結果を表 1 5 に示す。

【 0 0 9 7 】

【表 1 5】

融合蛋白質	細胞数		キマーゼ (mOD/分)	
	AタイプN末	H L H	AタイプN末	H L H
ベヒクル	10 × 10 <sup>6</sup>	10 × 10 <sup>6</sup>	10	10
2.5 (nM)	0.3 × 10 <sup>6</sup>	5 × 10 <sup>6</sup>	0.2	3
5	0.2 × 10 <sup>6</sup>	6 × 10 <sup>6</sup>	0.05	1
10	0.4 × 10 <sup>6</sup>	1 × 10 <sup>6</sup>	0.06	0.09
20	0.4 × 10 <sup>6</sup>	0.6 × 10 <sup>6</sup>	0.03	0.03

20

【 0 0 9 8 】

実験例 9 (ヒトマスト細胞への作用)

1 ) ヒト C D 3 4 陽性骨髄細胞 ( B i o W h i t t a k e r 社 ) 2 × 1 0<sup>4</sup> / ウェルを、S C F ( 1 0 0 n g / m l )、I L - 6 ( 1 0 0 n g / m l )、I L - 1 0 ( 1 0 n g / m l )、融合蛋白質 ( H L H系 ) を添加した培養液を週に一度、半量交換しながら 9 週間培養し、細胞数、回収した細胞について l y s a t e 中のキマーゼ活性、ヒスタミン含量を測定した。培養液は 5 % F C S を含む M e d i a I ( 免疫生物研究所 ) を用いた。例数は 3 とした。その結果、本発明の融合蛋白質はヒトマスト細胞分化を阻害した ( 表 1 6 )

30

【 0 0 9 9 】

【表 1 6】

	融合蛋白質	ベヒクル
細胞数 (最大時)	6 × 10 <sup>5</sup>	4 × 10 <sup>5</sup>
キマーゼ (mOD/分)	0 . 0 7 ± 0 . 0 2	0 . 2 5 ± 0 . 0 7
ヒスタミン (ng/mL)	4 0 ± 2 0	7 0 ± 1 5

【 0 1 0 0 】

2 ) ヒト C D 3 4 陽性骨髄細胞を 1 ) に準じてサイトカインの存在下に 8 週間培養し、途中まで分化した未成熟なマスト細胞を調製した。細胞を一旦回収、遠心洗浄し、新しくプレートに培養液中で 7 × 10<sup>5</sup> / ウェルずつ播種し、融合蛋白質 ( H L H系を 1 0 または 5 0 n M 添加 ) を添加した同培養液 ( 前記のサイトカインを含む ) を用いて培養を継続した。週に一度培養液を半量交換した。培養 2 週間後に細胞数、キマーゼ活性、ヒスタミン含量を測定した。また当該細胞を P E 標識抗 c - k i t 抗体 (あるいは P E 標識対照抗体) で染色し、F A C S で解析した。その結果、本発明の融合蛋白質は未成熟マスト細胞に作用して c - k i t 発現を阻害し、ヒトマスト細胞の成熟を阻害した ( 表 1 7 )。

40

【 0 1 0 1 】

【表 1 7】

50



	培養直前	融合蛋白質 50nM	融合蛋白質 10nM	ベヒクル
キラー (mOD/分)	0.08	0.03	0.06	0.15
ヒスタミン (ng/mL)	290	200	330	570
FACS ピーク位置		$8 \times 10$	$1 \times 10^2$	$2 \times 10^2$

## 【 0 1 0 2 】

3) ヒトCD34陽性骨髄細胞を1)に準じてサイトカインの存在下に12週間培養し、分化完了した成熟なマスト細胞を調製した。細胞を一旦回収、遠心洗浄し、新しくプレートに培養液中で $2.4 \times 10^4$ /ウェルずつ播種し、融合蛋白質(HLH系を2、10または50nM添加)を添加した同培養液(前記のサイトカインを含む)を用いて培養を継続した。週に一度培養液を半量交換した。培養3週間後に細胞数、ヒスタミン含量を測定した。その結果、本発明の融合蛋白質は濃度依存的にヒスタミン含量を低下させ、成熟ヒト骨髄培養マスト細胞の機能を抑制した(表18)。

10

## 【 0 1 0 3 】

## 【表18】

融合蛋白質 (nM)	ヒスタミン (ng/mL)
溶媒のみ	$600 \pm 20$
2	$520 \pm 50$
10	$370 \pm 10$
50	$300 \pm 10$

20

## 【 0 1 0 4 】

実験例10(インビボ阻害)

1) C57BL/6マウスに融合蛋白質(wh系)60 $\mu$ gを200 $\mu$ LのPBS中で週3回4週間まで腹腔内投与した。最終投与の翌日に腹腔細胞を回収し、以下の項目を測定した。例数は4とした。投与4週間の結果を表19に示す。

## 【 0 1 0 5 】

総細胞数: コールターカウンターまたは血球計数装置により測定した。

30

マスト細胞: スメア標本をトルイジンブルーで染色し、陽性の比率を算出した。

ヒスタミン: 腹腔細胞懸濁液にトリトンX100を添加してLysateを調製し、LysateについてELISAキットにより測定した。

c-kitおよびIgE受容体両陽性細胞: 回収した腹腔細胞をPE標識抗c-kit抗体およびマウスIgE/ビオチン標識抗IgE抗体/APC標識ストレプトアビジンで二重染色しFACSで解析した。

## 【 0 1 0 6 】

## 【表19】

	ベヒクル群	融合蛋白質	有意差
マスト細胞比率 (%)	0.8	0.4	0.0394
マスト細胞数	$0.3 \times 10^5$	$0.17 \times 10^5$	0.2784
c-kit <sup>+</sup> IgE <sup>+</sup> 細胞頻度 (%)	0.6	0.4	0.3080
同細胞数	$2.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	0.2214
ヒスタミン (ng/ $10^6$ cell)	42	11	0.0510

40

## 【 0 1 0 7 】

2) 10または50 $\mu$ gの融合蛋白質(wh系、いずれも200 $\mu$ Lベヒクル中で)をマウス腹腔内に2週間投与した。例数は10とした。1)と同様に各項目を測定した。結果を表20に示す。

50

【 0 1 0 8 】

【表 2 0】

	ベヒクル群	融合蛋白質 1 0 $\mu$ g	融合蛋白質 5 0 $\mu$ g
総細胞数	9 $\pm$ 1(X10 <sup>6</sup> )	11 $\pm$ 1(X10 <sup>6</sup> )	12 $\pm$ 1*(X10 <sup>6</sup> )
マスト細胞の比率(%)	0.9 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1**	0.2 $\pm$ 0.1**
両陽性のマスト細胞 の比率(%)	0.48 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.04**
c-kit の平均蛍光強度	900 $\pm$ 50	680 $\pm$ 30**	670 $\pm$ 30**

10

【 0 1 0 9 】

3) 10  $\mu$  g の融合蛋白質 (H L H系) を 3 5 0  $\mu$  L ベヒクル中でマウス腹腔内に 1 3 日間投与した。マスト細胞数、ヒスタミン含量の測定は 1) に準じて行った。結果を表 2 1 に示す。

【 0 1 1 0 】

【表 2 1】

	ベヒクル群	融合蛋白質
マスト細胞数	1.9 $\pm$ 0.6 ( $\times 10^4$ )	0.1 $\pm$ 0.1** ( $\times 10^4$ )
ヒスタミン(nM)	6.7 $\pm$ 2.0	0.7 $\pm$ 0.5*

20

【 0 1 1 1 】

本発明の融合蛋白質 (w h系、H L H系) はいずれの実験系においてもインビボでマスト細胞数を減少させた。

【 0 1 1 2 】

【発明の効果】

本発明によれば、M I T F 変異体を用いて、マスト細胞の細胞死を誘発することができる。よって、マスト細胞が関与する各種疾患の予防・治療に有用な薬剤を臨床の場に提供することができる。

30

【 0 1 1 3 】

【配列表】

配列表配列番号 1 : M I T F の m i 変異体のアミノ酸配列

配列表配列番号 2 : その塩基配列

配列表配列番号 3 : M I T F の w h 変異体のアミノ酸配列

配列表配列番号 4 : その塩基配列

配列表配列番号 5 : b H L H - Z i p 断片のアミノ酸配列

配列表配列番号 6 : その塩基配列

配列表配列番号 7 : T A T 由来ペプチドのアミノ酸配列

配列表配列番号 8 : その塩基配列

40

配列表配列番号 9 : H i s T a g のアミノ酸配列

配列表配列番号 1 0 : その塩基配列

配列表配列番号 1 1 : H i s T a g - P T D - M I T F の m i 変異体からなる融合蛋白質のアミノ酸配列

配列表配列番号 1 2 : その塩基配列

配列表配列番号 1 3 : H i s T a g - P T D - M I T F の w h 変異体からなる融合蛋白質のアミノ酸配列

配列表配列番号 1 4 : その塩基配列

配列表配列番号 1 5 : H i s T a g - P T D - M I T F の b H L H - Z i p 断片からなる融合蛋白質のアミノ酸配列

50

配列表配列番号 16 : その塩基配列

配列表配列番号 17 : プライマー M - T a t の塩基配列

配列表配列番号 18 : プライマー T a t 3 の塩基配列

配列表配列番号 19 : プライマー T a t 2 の塩基配列

配列表配列番号 20 : プライマー T a t 1 の塩基配列

配列表配列番号 21 : M I T F の A タイプ N 末領域 ( 1 - 3 0 5 ) のアミノ酸配列

配列表配列番号 22 : その塩基配列

配列表配列番号 23 : H i s T a g - P T D - M I T F の A タイプ N 末領域 ( 1 - 3 0 5 ) からなる融合蛋白質のアミノ酸配列

配列表配列番号 24 : その塩基配列

10

配列表配列番号 25 : プライマー H L H F

配列表配列番号 26 : プライマー p T D 3 - M I T F a

配列表配列番号 27 : プライマー M I T F R - N

【 0 1 1 4 】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; MITSUBISHI PHARMA CORPORATION

&lt;120&gt; AGENT FOR INDUCING APOPTOSIS OF MAST CELL

&lt;130&gt; RK02006

&lt;160&gt; 27

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

10

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 415

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; MITF mi mutant

&lt;400&gt; 1

20

Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro

1

5

10

15

Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr

20

25

30

30

Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser

35

40

45

Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly

50

55

60

Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn

65

70

75

80

40

Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu  
85 90 95

Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln  
100 105 110

10

Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn  
115 120 125

Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr  
130 135 140

Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu  
145 150 155 160

20

Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro  
165 170 175

Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu  
180 185 190

30

Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu  
195 200 205

Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly  
210 215 220

40

Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly

225	230	235	240
Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu			
245	250	255	
Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His			
260	265	270	
Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala			
275	280	285	
Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro			
290	295	300	
Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys			
305	310	315	320
Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr			
325	330	335	
Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr			
340	345	350	
Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser			
355	360	365	
Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val			
370	375	380	

10

20

30

40

Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser  
 385 390 395 400

Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys  
 405 410 415

10

<210> 2

<211> 1248

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> DNA coding MITF mi mutant

<200>

20

<221> CDS

<222> (1)..(1248)

<400> 2

atg cta gaa tac agt cac tac cag gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc 48  
 Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro  
 1 5 10 15

30

acc aag tac cac ata cag caa gct cag agg cac cag gta aag cag tac 96  
 Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr  
 20 25 30

ctt tct acc act tta gca aat aaa cat gcc agc caa gtc ctg agc tca 144  
 Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser  
 35 40 45

40

cca tgt cca aac cag cct ggc gac cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg 192  
 Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly  
           50                          55                          60

agc agc gca ccc aac agc cct atg gct atg ctc act ctt aac tcc aac 240  
 Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn  
           65                          70                          75                          80

10

tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag ttt gag gag cag agc agg gca gag 288  
 Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu  
                                   85                          90                          95

agt gag tgc cca ggt atg aac acg cac tct cga gcg tcg tgc atg cag 336  
 Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln  
                           100                          105                          110

20

atg gat gat gta att gat gac atc atc agc ctg gaa tca agt tat aat 384  
 Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn  
                           115                          120                          125

30

gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc ttg caa atg gca aat acg 432  
 Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr  
                           130                          135                          140

tta ccc gtc tct gga aac ttg atc gac ctc tac agc aac cag ggc ctg 480  
 Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu  
           145                          150                          155                          160

40



cca ccg cca ggc ctt acc atc agc aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc 528  
 Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro  
                   165                  170                  175

aac ata aaa agg gag ctc aca gcg tgt att ttc ccc aca gag tct gaa 576  
 Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu  
                   180                  185                  190

10

gca aga gca ttg gct aaa gag agg cag aaa aag gac aat cac aac ttg 624  
 Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu  
                   195                  200                  205

att gaa cga aga aga ttt aac ata aac gac cgc att aag gag cta ggt 672  
 Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly  
                   210                  215                  220

20

act ctg atc ccc aag tca aat gat cca gac atg cgg tgg aac aag gga 720  
 Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly  
 225                  230                  235                  240

acc att ctc aag gcc tct gtg gac tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa 768  
 Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu  
                   245                  250                  255

30

cag caa cga gct aag gac ctt gaa aac cga cag aag aag ctg gag cat 816  
 Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His  
                   260                  265                  270

40

gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta cag gag ctg gag atg cag gct 864

Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala  
 275 280 285

aga gcg cat gga ctt tcc ctt atc cca tcc acc ggt ctc tgc tgc cct 912  
 Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro  
 290 295 300

10

gat ctg gtg aat cgg atc atc aag caa gaa cca gtt ctt gag aac tgc 960  
 Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys  
 305 310 315 320

agc cag gaa ctt gta cag cac cag gca gac ctg aca tgt acg aca act 1008  
 Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr  
 325 330 335

20

ctg gat ctc acg gac ggt acc atc acc ttt acc aac aac ctc ggc acc 1056  
 Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr  
 340 345 350

atg ccg gag agc agc ccg gcc tac agc atc ccc agg aag atg ggc tcc 1104  
 Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser  
 355 360 365

30

aac ttg gaa gac atc ctg atg gac gat gcc ctc tca cct gtt gga gtc 1152  
 Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val  
 370 375 380

acc gac cca ctg ctg tca tca gtg tgc cca gga gct tca aaa aca agc 1200  
 Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser

40

385                      390                      395                      400

agc cgg agg agc agt atg agc gca gaa gaa acg gag cat gcg tgt tag 1248

Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys

                    405                      410                      415

10

<210> 3

<211> 410

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> MITF wh mutant

<400> 3

20

Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro

1                      5                      10                      15

Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr

20                      25                      30

30

Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser

35                      40                      45

Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly

50                      55                      60

Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn

65                      70                      75                      80

40

Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu  
                             85                            90                            95

Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln  
                             100                            105                            110

10

Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn  
                             115                            120                            125

Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr  
                             130                            135                            140

Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu  
                             145                            150                            155                            160

20

Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro  
                             165                            170                            175

Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys  
                             180                            185                            190

30

Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg  
                             195                            200                            205

Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys  
                             210                            215                            220

40

Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala

225	230	235	240
Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys			
	245	250	255
Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu			
	260	265	270
Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu			
	275	280	285
Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg			
	290	295	300
Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val			
305	310	315	320
Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp			
	325	330	335
Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser			
	340	345	350
Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile			
	355	360	365
Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu			
370	375	380	

10

20

30

40

Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser  
 385 390 395 400

Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys  
 405 410

10

<210> 4

<211> 1233

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> DNA coding MITF wh mutant

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(1233)

<400> 4

atg cta gaa tac agt cac tac cag gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc 48

Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro

1

5

10

15

30

acc aag tac cac ata cag caa gct cag agg cac cag gta aag cag tac 96

Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr

20

25

30

ctt tct acc act tta gca aat aaa cat gcc agc caa gtc ctg agc tca 144

Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser

35

40

45

40

cca tgt cca aac cag cct ggc gac cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg 192  
 Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly  
           50                          55                          60

agc agc gca ccc aac agc cct atg gct atg ctc act ctt aac tcc aac 240  
 Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn  
           65                          70                          75                          80

10

tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag ttt gag gag cag agc agg gca gag 288  
 Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu  
                                   85                          90                          95

agt gag tgc cca ggt atg aac acg cac tct cga gcg tcg tgc atg cag 336  
 Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln  
                           100                          105                          110

20

atg gat gat gta att gat gac atc atc agc ctg gaa tca agt tat aat 384  
 Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn  
                           115                          120                          125

30

gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc ttg caa atg gca aat acg 432  
 Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr  
           130                          135                          140

tta ccc gtc tct gga aac ttg atc gac ctc tac agc aac cag ggc ctg 480  
 Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu  
           145                          150                          155                          160

40

cca ccg cca ggc ctt acc atc agc aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc 528  
 Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro  
 165 170 175

aac ata aaa agg gag ctc aca gag tct gaa gca aga gca ttg gct aaa 576  
 Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys  
 180 185 190

10

gag agg cag aaa aag gac aat cac aac ttg aat gaa cga aga aga aga 624  
 Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg  
 195 200 205

ttt aac ata aac gac cgc att aag gag cta ggt act ctg atc ccc aag 672  
 Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys  
 210 215 220

20

tca aat gat cca gac atg cgg tgg aac aag gga acc att ctc aag gcc 720  
 Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala  
 225 230 235 240

tct gtg gac tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag caa cga gct aag 768  
 Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys  
 245 250 255

30

gac ctt gaa aac cga cag aag aag ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg 816  
 Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu  
 260 265 270

40

ctg ctc aga gta cag gag ctg gag atg cag gct aga gcg cat gga ctt 864



Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu  
 275 280 285

tcc ctt atc cca tcc acc ggt ctc tgc tgc cct gat ctg gtg aat cgg 912  
 Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg  
 290 295 300

10

atc atc aag caa gaa cca gtt ctt gag aac tgc agc cag gaa ctt gta 960  
 Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val  
 305 310 315 320

cag cac cag gca gac ctg aca tgt acg aca act ctg gat ctc acg gac 1008  
 Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp  
 325 330 335

20

ggt acc atc acc ttt acc aac aac ctc ggc acc atg ccg gag agc agc 1056  
 Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser  
 340 345 350

ccg gcc tac agc atc ccc agg aag atg ggc tcc aac ttg gaa gac atc 1104  
 Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile  
 355 360 365

30

ctg atg gac gat gcc ctc tca cct gtt gga gtc acc gac cca ctg ctg 1152  
 Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu  
 370 375 380

tca tca gtg tgc cca gga gct tca aaa aca agc agc cgg agg agc agt 1200  
 Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser

40

385                      390                      395                      400  
atg agc gca gaa gaa acg gag cat gcg tgt tag                      1233  
Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys  
                    405                      410

10

<210> 5  
<211> 91  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> MITF bHLH-Zip fragment  
<400> 5

20

Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu  
1                      5                      10                      15

Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr  
                    20                      25                      30

30

Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr  
                    35                      40                      45

Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln  
                    50                      55                      60

Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala  
65                      70                      75                      80

40

Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu  
                     85                    90

<210> 6

<211> 276

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding MITF bHLH-Zip fragment

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(276)

20

<400> 6

atg ttg gct aaa gag agg cag aaa aag gac aat cac aac ttg att gaa 48  
 Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu  
     1                    5                    10                    15

cga aga aga aga ttt aac ata aac gac cgc att aag gag cta ggt act 96  
 Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr  
                     20                    25                    30

30

ctg atc ccc aag tca aat gat cca gac atg cgg tgg aac aag gga acc 144  
 Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr  
                     35                    40                    45

40

att ctc aag gcc tct gtg gac tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag 192

Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln  
 50 55 60

caa cga gct aag gac ctt gaa aac cga cag aag aag ctg gag cat gcg 240  
 Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala  
 65 70 75 80

10

aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta cag gag ctg tag 276  
 Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu  
 85 90

<210> 7

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TAT-derived peptide

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

30

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> DNA coding TAT-derived peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 8

tat ggc agg aag aag cgg aga cag cga cga aga

33

10

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HisTag

<400> 9

Met Gly Gly Ser His His His His His His

1

5

10

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> DNA coding HisTag

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(30)

&lt;400&gt; 10

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat	30	
Met Gly Gly Ser His His His His His His		10
1                      5                      10		

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 439

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence 20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF mi mutant

&lt;400&gt; 11

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys	
1                      5                      10                      15	30

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln	
20                      25                      30	

Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala	
35                      40                      45	

Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys	40
50                      55                      60	

His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp  
 65 70 75 80

His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met  
 85 90 95

10

Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys  
 100 105 110

Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr  
 115 120 125

His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile  
 130 135 140

20

Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp  
 145 150 155 160

Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile  
 165 170 175

30

Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser  
 180 185 190

Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala  
 195 200 205

40

Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg

210	215	220	
Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile			
225	230	235	240
Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp			
245	250	255	10
Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp			
260	265	270	
Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu			
275	280	285	20
Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg			
290	295	300	
Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile			
305	310	315	30
Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys			
325	330	335	
Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln			
340	345	350	
Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile			
355	360	365	40



Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr  
 370 375 380

Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp  
 385 390 395 400

Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val  
 405 410 415

10

Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala  
 420 425 430

Glu Glu Thr Glu His Ala Cys  
 435

20

<210> 12

<211> 1320

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF mi mutan  
 t

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1320)

<400> 12

40

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys

1

5

10

15

aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg cta gaa tac agt cac tac cag 96

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln

20

25

30

10

gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc acc aag tac cac ata cag caa gct 144

Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala

35

40

45

cag agg cac cag gta aag cag tac ctt tct acc act tta gca aat aaa 192

Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys

50

55

60

20

cat gcc agc caa gtc ctg agc tca cca tgt cca aac cag cct ggc gac 240

His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp

65

70

75

80

cat gcc atg cca cca gtg cgg ggg agc agc gca ccc aac agc cct atg 288

His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met

85

90

95

30

gct atg ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag 336

Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys

100

105

110

ttt gag gag cag agc agg gca gag agt gag tgc cca ggt atg aac acg 384

Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr

40

115	120	125		
cac tct cga gcg tcg tgc atg cag atg gat gat gta att gat gac atc	432			
His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile				
130	135	140		
atc agc ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat	480			10
Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp				
145	150	155	160	
ccg gcc ttg caa atg gca aat acg tta ccc gtc tct gga aac ttg atc	528			
Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile				
165	170	175		20
gac ctc tac agc aac cag ggc ctg cca ccg cca ggc ctt acc atc agc	576			
Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser				
180	185	190		
aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata aaa agg gag ctc aca gcg	624			
Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala				
195	200	205		30
tgt att ttc ccc aca gag tct gaa gca aga gca ttg gct aaa gag agg	672			
Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg				
210	215	220		
cag aaa aag gac aat cac aac ttg att gaa cga aga aga ttt aac ata	720			
Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile				40
225	230	235	240	

aac gac cgc att aag gag cta ggt act ctg atc ccc aag tca aat gat 768  
 Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp  
                   245                  250                  255

cca gac atg cgg tgg aac aag gga acc att ctc aag gcc tct gtg gac 816  
 Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp  
                   260                  265                  270

10

tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag caa cga gct aag gac ctt gaa 864  
 Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu  
                   275                  280                  285

aac cga cag aag aag ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga 912  
 Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg  
                   290                  295                  300

20

gta cag gag ctg gag atg cag gct aga gcg cat gga ctt tcc ctt atc 960  
 Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile  
 305                  310                  315                  320

30

cca tcc acc ggt ctc tgc tgc cct gat ctg gtg aat cgg atc atc aag 1008  
 Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys  
                   325                  330                  335

caa gaa cca gtt ctt gag aac tgc agc cag gaa ctt gta cag cac cag 1056  
 Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln  
                   340                  345                  350

40

gca gac ctg aca tgt acg aca act ctg gat ctc acg gac ggt acc atc 1104  
 Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile  
           355                          360                          365

acc ttt acc aac aac ctc ggc acc atg ccg gag agc agc ccg gcc tac 1152  
 Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr  
           370                          375                          380

10

agc atc ccc agg aag atg ggc tcc aac ttg gaa gac atc ctg atg gac 1200  
 Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp  
           385                          390                          395                          400

gat gcc ctc tca cct gtt gga gtc acc gac cca ctg ctg tca tca gtg 1248  
 Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val  
                           405                          410                          415

20

tcg cca gga gct tca aaa aca agc agc cgg agg agc agt atg agc gca 1296  
 Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala  
                           420                          425                          430

gaa gaa acg gag cat gcg tgt tag 1320  
 Glu Glu Thr Glu His Ala Cys  
           435                          440

30

<210> 13

<211> 434

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF wh mutant

<400> 13

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10 15

10

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln  
20 25 30

Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala  
35 40 45

Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys  
50 55 60

20

His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp  
65 70 75 80

His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met  
85 90 95

30

Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys  
100 105 110

Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr  
115 120 125

40

His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile

130	135	140	
Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp			
145	150	155	160
Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile			
165	170	175	10
Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser			
180	185	190	
Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu			
195	200	205	20
Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His			
210	215	220	
Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys			
225	230	235	240
Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp			30
245	250	255	
Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu			
260	265	270	
Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys			
275	280	285	40

Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu  
 290 295 300

Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu  
 305 310 315 320

Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu  
 325 330 335

10

Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys  
 340 345 350

Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn  
 355 360 365

20

Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys  
 370 375 380

Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro  
 385 390 395 400

30

Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser  
 405 410 415

Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His  
 420 425 430

Ala Cys

40



<210> 14

<211> 1305

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF wh mutant

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1305)

<400> 14

20

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48  
Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10 15

aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg cta gaa tac agt cac tac cag 96  
Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln  
20 25 30

30

gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc acc aag tac cac ata cag caa gct 144  
Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala  
35 40 45

cag agg cac cag gta aag cag tac ctt tct acc act tta gca aat aaa 192  
Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys  
50 55 60

40

cat gcc agc caa gtc ctg agc tca cca tgt cca aac cag cct ggc gac 240  
 His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp  
 65 70 75 80

cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg agc agc gca ccc aac agc cct atg 288  
 His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met  
 85 90 95

10

gct atg ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag 336  
 Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys  
 100 105 110

ttt gag gag cag agc agg gca gag agt gag tgc cca ggt atg aac acg 384  
 Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr  
 115 120 125

20

cac tct cga gcg tgg tgc atg cag atg gat gat gta att gat gac atc 432  
 His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile  
 130 135 140

30

atc agc ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat 480  
 Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp  
 145 150 155 160

ccg gcc ttg caa atg gca aat acg tta ccc gtc tct gga aac ttg atc 528  
 Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile  
 165 170 175

40

gac ctc tac agc aac cag ggc ctg cca ccg cca ggc ctt acc atc agc 576  
 Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser  
 180 185 190

aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata aaa agg gag ctc aca gag 624  
 Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu  
 195 200 205

10

tct gaa gca aga gca ttg gct aaa gag agg cag aaa aag gac aat cac 672  
 Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His  
 210 215 220

aac ttg aat gaa cga aga aga aga ttt aac ata aac gac cgc att aag 720  
 Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys  
 225 230 235 240

20

gag cta ggt act ctg atc ccc aag tca aat gat cca gac atg cgg tgg 768  
 Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp  
 245 250 255

aac aag gga acc att ctc aag gcc tct gtg gac tac atc cgg aag ttg 816  
 Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu  
 260 265 270

30

caa cgg gaa cag caa cga gct aag gac ctt gaa aac cga cag aag aag 864  
 Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys  
 275 280 285

40

ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta cag gag ctg gag 912

Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu  
 290 295 300

atg cag gct aga gcg cat gga ctt tcc ctt atc cca tcc acc ggt ctc 960  
 Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu  
 305 310 315 320

10

tgc tgc cct gat ctg gtg aat cgg atc atc aag caa gaa cca gtt ctt 1008  
 Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu  
 325 330 335

gag aac tgc agc cag gaa ctt gta cag cac cag gca gac ctg aca tgt 1056  
 Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys  
 340 345 350

20

acg aca act ctg gat ctc acg gac ggt acc atc acc ttt acc aac aac 1104  
 Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn  
 355 360 365

ctc ggc acc atg ccg gag agc agc ccg gcc tac agc atc ccc agg aag 1152  
 Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys  
 370 375 380

30

atg ggc tcc aac ttg gaa gac atc ctg atg gac gat gcc ctc tca cct 1200  
 Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro  
 385 390 395 400

gtt gga gtc acc gac cca ctg ctg tca tca gtg tcg cca gga gct tca 1248  
 Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser

40

405	410	415		
aaa aca agc agc cgg agg agc agt atg agc gca gaa gaa acg gag cat			1296	
Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His				
420	425	430		
gcg tgt tag			1305	10
Ala Cys				
435				
<210> 15				
<211> 115				
<212> PRT				20
<213> Artificial Sequence				
<220>				
<223> Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF bHLH-Zip fragment				
<400> 15				
Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys				
1	5	10	15	30
Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys				
20	25	30		
Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn				
35	40	45		40
Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro				

50 55 60  
Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr  
65 70 75 80  
Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn  
85 90 95 10  
Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val  
100 105 110  
Gln Glu Leu  
115 20  
<210> 16  
<211> 348  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF bHLH-Zip 30  
fragment  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(345)  
<400> 16  
atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48  
Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys 40

1	5	10	15		
aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg ttg gct aaa gag agg cag aaa				96	
Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys					
20	25	30			
aag gac aat cac aac ttg att gaa cga aga aga aga ttt aac ata aac				144	10
Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn					
35	40	45			
gac cgc att aag gag cta ggt act ctg atc ccc aag tca aat gat cca				192	
Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro					
50	55	60			20
gac atg cgg tgg aac aag gga acc att ctc aag gcc tct gtg gac tac				240	
Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr					
65	70	75	80		
atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag caa cga gct aag gac ctt gaa aac				288	
Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn					
85	90	95			30
cga cag aag aag ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta				336	
Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val					
100	105	110			
cag gag ctg tag				348	
Gln Glu Leu					40
115					

<210> 17  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220> 10  
<223> Primer M-tat  
<400> 17

gcgacgaaga ggtatgctag aatacagtica ctacc 35

<210> 18 20  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer tat 3  
<400> 18

30

ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga ggtatg 36

<210> 19  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 40  
<220>



<223> Primer tat 2

<400> 19

atcatcatca tggtaggttat ggcaggaaga agcgg

35

<210> 20

10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer tat 1

<400> 20

20

taaaccatgg ggggttctca tcatcatcat catcatggtg

40

<210> 21

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> MITF A-type N-terminal region(1-305)

<400> 21

Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu

1

5

10

15

40

Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu

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

Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu  
 180 185 190

Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu  
 195 200 205

Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp  
 210 215 220

10

Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu  
 225 230 235 240

Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro  
 245 250 255

20

Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro  
 260 265 270

Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile  
 275 280 285

30

Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg  
 290 295 300

Ala  
 305

40

⟨210⟩ 22

&lt;211&gt; 918

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; DNA coding MITF A-type N-terminal region(1-305)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10

&lt;222&gt; (1)..(918)

&lt;400&gt; 22

atg cag tcc gaa tcg gga atc gtg gcg gat ttc gaa gtc ggg gag gag 48

Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu

1

5

10

15

20

ttt cac gaa gaa ccc aaa acc tat tac gaa ctc aaa agt caa cct ctg 96

Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu

20

25

30

aag agc agc agt tct gca gag cat tct ggg gcc tcc aag cct ccg tta 144

Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His Ser Gly Ala Ser Lys Pro Pro Leu

35

40

45

30

agc tcc tcc act atg aca tca cgc atc ttg cta cgc cag caa ctc atg 192

Ser Ser Ser Thr Met Thr Ser Arg Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met

50

55

60

cgt gag cag atg cag gag cag gag cgc agg gag cag cag cag aag ctg 240

Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu

65

70

75

80

40

cag gca gcc cag ttc atg caa cag aga gtg gcc gtg agt cag aca cca 288  
 Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln Arg Val Ala Val Ser Gln Thr Pro  
                     85                    90                    95

gcc ata aac gtc agc gtg ccc acc acc ctt ccc tct gcc acc cag gtg 336  
 Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val  
                     100                    105                    110

10

ccg atg gaa gtc ctt aag gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc acc aag 384  
 Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys  
                     115                    120                    125

tac cac ata cag caa gct cag agg cac cag gta aag cag tac ctt tct 432  
 Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser  
                     130                    135                    140

20

acc act tta gca aat aaa cat gcc agc caa gtc ctg agc tca cca tgt 480  
 Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys  
 145                    150                    155                    160

30

cca aac cag cct ggc gac cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg agc agc 528  
 Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser  
                     165                    170                    175

gca ccc aac agc cct atg gct atg ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa 576  
 Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu  
                     180                    185                    190

40

aaa gag gca ttt tat aag ttt gag gag cag agc agg gca gag agt gag 624  
 Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu  
 195 200 205

tgc cca ggt atg aac acg cac tct cga gcg tcg tgc atg cag atg gat 672  
 Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp  
 210 215 220

10

gat gta att gat gac atc atc agc ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa 720  
 Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu  
 225 230 235 240

att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc ttg caa atg gca aat acg tta ccc 768  
 Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro  
 245 250 255

20

gtc tct gga aac ttg atc gac ctc tac agc aac cag ggc ctg cca ccg 816  
 Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro  
 260 265 270

cca ggc ctt acc atc agc aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata 864  
 Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile  
 275 280 285

30

aaa agg gag ctc aca gcg tgt att ttc ccc aca gag tct gaa gca aga 912  
 Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg  
 290 295 300

40

gca tga 918

Ala

305

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

10

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF A-type N-terminal region(1-305)

&lt;400&gt; 23

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10 15

20

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val  
20 25 30

Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr  
35 40 45

30

Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His  
50 55 60

Ser Gly Ala Ser Lys Pro Pro Leu Ser Ser Ser Thr Met Thr Ser Arg  
65 70 75 80

40

Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu

85	90	95	
Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln			
100	105	110	
Arg Val Ala Val Ser Gln Thr Pro Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr			
115	120	125	10
Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln			
130	135	140	
Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg			
145	150	155	20
His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala			
165	170	175	
Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala			
180	185	190	
Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met			30
195	200	205	
Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu			
210	215	220	
Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser			
225	230	235	40
		240	



Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser  
 245 250 255

Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala  
 260 265 270

Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu  
 275 280 285

10

Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser  
 290 295 300

Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile  
 305 310 315 320

20

Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala  
 325

<210> 24

<211> 990

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF A-type N  
 -terminal region(1-305)

<220>

<221> CDS

40

<222> (1)..(990)

&lt;400&gt; 24

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48  
 Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys  
 1 5 10 15

aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg cag tcc gaa tcg gga atc gtc 96 10  
 Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val  
 20 25 30

gcg gat ttc gaa gtc ggg gag gag ttt cac gaa gaa ccc aaa acc tat 144  
 Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr  
 35 40 45  
 20

tac gaa ctc aaa agt caa cct ctg aag agc agc agt tct gca gag cat 192  
 Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His  
 50 55 60

tct ggg gcc tcc aag cct ccg tta agc tcc tcc act atg aca tca cgc 240  
 Ser Gly Ala Ser Lys Pro Pro Leu Ser Ser Ser Thr Met Thr Ser Arg  
 65 70 75 80  
 30

atc ttg cta cgc cag caa ctc atg cgt gag cag atg cag gag cag gag 288  
 Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu  
 85 90 95

cgc agg gag cag cag cag aag ctg cag gca gcc cag ttc atg caa cag 336  
 Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln  
 100 105 110  
 40

aga gtg gcc gtg agt cag aca cca gcc ata aac gtc agc gtg ccc acc 384  
 Arg Val Ala Val Ser Gln Thr Pro Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr  
 115 120 125

acc ctt ccc tct gcc acc cag gtg ccg atg gaa gtc ctt aag gtg cag 432  
 Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln  
 130 135 140

10

acc cac ctg gaa aac ccc acc aag tac cac ata cag caa gct cag agg 480  
 Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg  
 145 150 155 160

cac cag gta aag cag tac ctt tct acc act tta gca aat aaa cat gcc 528  
 His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala  
 165 170 175

20

agc caa gtc ctg agc tca cca tgt cca aac cag cct ggc gac cat gcc 576  
 Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala  
 180 185 190

30

atg cca cca gtg ccg ggg agc agc gca ccc aac agc cct atg gct atg 624  
 Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met  
 195 200 205

ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag ttt gag 672  
 Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu  
 210 215 220

40

gag cag agc agg gca gag agt gag tgc cca ggt atg aac acg cac tct 720  
 Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser  
 225 230 235 240

cga gcg tgc tgc atg cag atg gat gat gta att gat gac atc atc agc 768  
 Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser  
 245 250 255

10

ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc 816  
 Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala  
 260 265 270

ttg caa atg gca aat acg tta ccc gtc tct gga aac ttg atc gac ctc 864  
 Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu  
 275 280 285

20

tac agc aac cag ggc ctg cca ccg cca ggc ctt acc atc agc aac tcc 912  
 Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser  
 290 295 300

tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata aaa agg gag ctc aca gcg tgt att 960  
 Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile  
 305 310 315 320

30

ttc ccc aca gag tct gaa gca aga gca tga 990  
 Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala  
 325 330

40

<210> 25  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer HLH F  
 <400> 25

10

gagacgaaga ggtatgttgg ctaaagagag g 31

<210> 26  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer pTD3-MITFa  
 <400> 26

20

cgccgcggaa tgcagtcga atcggaatc 30

30

<210> 27  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer MITFR-N  
 <400> 27

40

gaattcacta tgctcttgc tcaactctg tgggg 35

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の融合蛋白質（mi 系、wh 系）および当該融合蛋白質を発現するプラスミド pSU082（mi 系 / pTrcHisB）、pSU083（wh 系 / pTrcHisB）

50

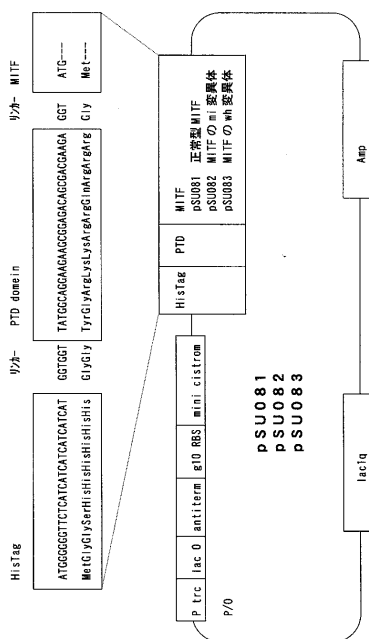
s B) の構造を概略的に示したものである。

【図2】本発明の融合蛋白質（HLH系）および当該融合蛋白質を発現するプラスミド pSU085（HLH系 / pTrcHisB）の構造を概略的に示したものである。

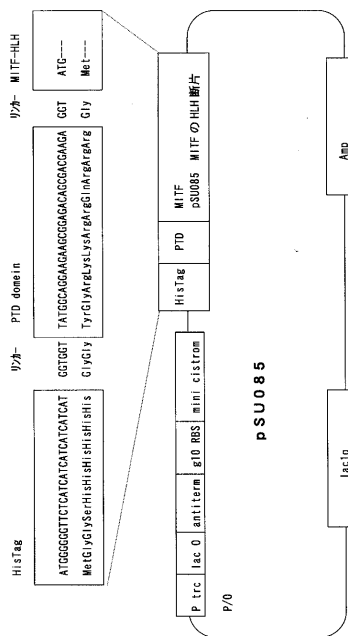
【図3】本発明の融合蛋白質（AタイプN末領域）を発現するプラスミド pSU087（AタイプN末領域 / pSU093）の構築手順を概略的に示したものである。

【図4】本発明の融合蛋白質（wh系）を発現するプラスミド pSU121（wh系 / pET14）の構築手順を概略的に示したものである。

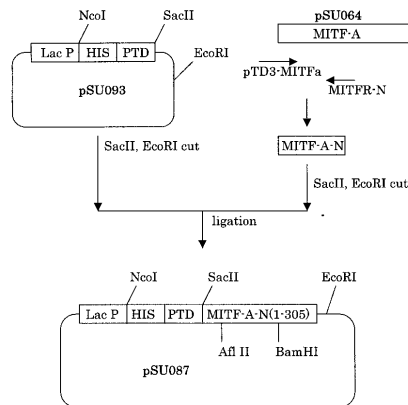
【図1】



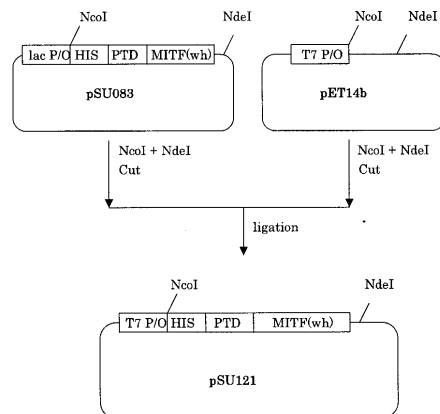
【図2】



## 【 図 3 】



## 【 図 4 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C

(56)参考文献 特開 2 0 0 3 - 0 0 9 8 8 3 ( J P , A )  
 国際公開第 0 0 / 0 6 9 8 9 8 ( WO , A 1 )  
 国際公開第 0 1 / 0 6 6 7 3 5 ( WO , A 1 )  
 国際公開第 0 0 / 0 4 7 7 6 5 ( WO , A 1 )  
 Am.J.Pathol.,1997,151(4),p.1043-51  
 Mol.Immunol.,2002 Sep,38(16-18),p.1173-6  
 Trends Genet.,1995,11(11),p.442-8

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
 CPlus(STN)  
 JSTPlus(JDreamII)