

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2009年2月5日 (05.02.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/017255 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C12Q 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/064170

(22) 国際出願日: 2008年7月31日 (31.07.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-200776 2007年8月1日 (01.08.2007) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人岐阜大学 (GIFU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
5011193 岐阜県岐阜市柳戸1番1 Gifu (JP). 国立大学
法人京都大学 (Kyoto University) [JP/JP]; 〒6068501 京
都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

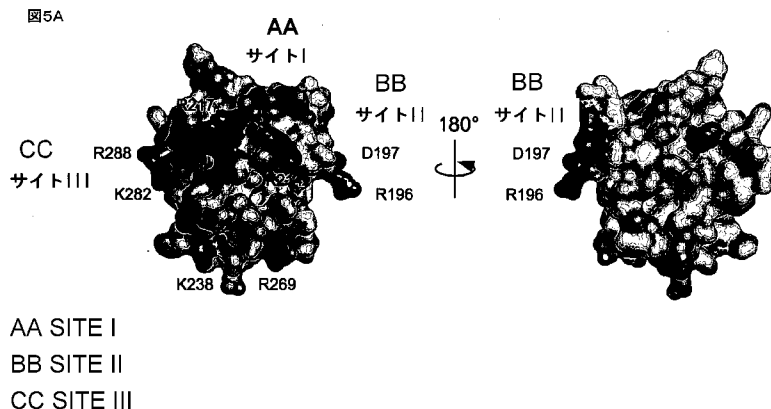
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 近藤直実
(KONDO, Naomi) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜県岐阜市柳
戸1番1 国立大学法人岐阜大学内 Gifu (JP). 加藤善
一郎 (KATO, Zenichiro) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜県岐
阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内 Gifu (JP).
大西秀典 (ONISHI, Hidenori) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜
県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内 Gifu
(JP). 白川昌宏 (SHIRAKAWA, Masahiro) [JP/JP]; 〒
6158510 京都府京都市西京区京都大学桂国立大学法
人京都大学大学院工学研究科内 Kyoto (JP). 朽尾豪人
(TOCHIO, Hidehito) [JP/JP]; 〒6158510 京都府京都市
西京区京都大学桂国立大学法人京都大学大学院
工学研究科内 Kyoto (JP).(74) 代理人: 間山世津子, 外(MAYAMA, Setsuko et al.);
〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目
30番の1 農機会展4階 Kanagawa (JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SPECIFIC REGULATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR/INTERLEUKIN-18 SIGNALING BY MU-
TATION-INTRODUCED MYD88 PROTEIN

(54) 発明の名称: 変異導入MyD88蛋白によるToll様受容体/インターロイキン18シグナルの特異的制御法



(57) Abstract: Disclosed is a technique for regulating the function of a cytoplasmic factor, an adapter molecule MyD88, in a cell in a signal-specific manner, wherein the adapter molecule MyD88 is used for a signaling common to the TLR family members (e.g., LPS) and the IL-1 receptor family members. Specifically disclosed is a MyD88 TIR mutant protein selected from the following proteins (a), (b) and (c) or a salt thereof: (a) a protein comprising an amino acid sequence having the substitution of at least one amino acid residue selected from the group consisting of a lysine residue at position-214, a lysine residue at position-238 and an arginine residue at position-269 by other amino acid residue in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2; (b) a protein which comprises an amino acid sequence having the deletion, substitution or addition of one or several amino acid residues excluding a lysine residue at position-214, an amino acid residue at position-238 and an amino acid residue at position-269 in the amino acid sequence for the protein (a), and which can inhibit a signaling induced by the stimulation by a lipopolysaccharide but cannot inhibit a signaling induced by the stimulation by interleukin-18; and (c) a protein which is encoded by DNA capable of hybridizing with DNA complementary to DNA comprising the nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:3, 5 or 7 under stringent conditions, and which can inhibit a signaling induced by the stimulation by a lipopolysaccharide but cannot inhibit a signaling induced by the stimulation by interleukin-18.

[続葉有]

WO 2009/017255 A1



BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(57) 要約: LPS等のTLRファミリーとIL-1受容体ファミリーに共通のシグナル伝達に使用される細胞内因子アダプター分子MyD88の機能を細胞内でシグナル特異的に制御する手法を提供する。以下の(a)、(b)若しくは(c)のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。(a)配列番号2のアミノ酸配列において、214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列からなるタンパク質(b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、214番目のリシン、238番目のアミノ酸及び269番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質(c)配列番号3、5又は7のヌクレオチド配列からなるDNAに相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質

明 細 書

変異導入MyD88蛋白によるToll様受容体／インターロイキン18シグナルの特異的制御法

技術分野

[0001] 本発明は、Toll様受容体／インターロイキン18シグナルの特異的制御を可能とするMyD88のToll／インターロイキン1受容体(Toll/Interleukin-1 receptor: TIR)ドメイン変異体及びその利用に関する。

背景技術

[0002] インターロイキン1(IL-1)は、自然免疫反応を迅速に活性化する主要な炎症誘発性サイトカインであり、そして獲得免疫系の強力な誘導物質である1(非特許文献1)。またインターロイキン18(IL-18)は最初IL-1ホモログの1つとして見い出され、そしてインターフェロン- γ (IFN- γ)誘導因子として同定された2(非特許文献2)。IL-1同様、IL-18も自然および獲得免疫反応において重要な役割を果たす。IL-18およびIL-1 β は、中程度の配列相同性(17%のアミノ酸が同一)を示すが、本発明者らはIL-18の立体構造がIL-1 β のそれに類似していることを明らかにしている3(非特許文献3)。IL-1およびIL-18のリガンド受容体複合体構造は、類似しているものと予測される。これらのシグナル伝達は、サイトカインリガンドおよびその受容体からなる高親和性複合体の形成によって開始される。細胞表面でこれらのリガンドがその受容体複合体に結合したとき、受容体分子の細胞質側末端が、Toll／インターロイキン1受容体ホモロジー(TIR)ドメインを介して、ミエロイド分化88(Myeloid Differentiation 88: MyD88)に結合する4(非特許文献4)。MyD88を介するシグナル伝達は、一般に、NF- κ BおよびAP-1転写因子の活性化をもたらす。

[0003] TIRドメインは、IL-1受容体、IL-18受容体、TollおよびToll様受容体(TLR)、ならびにMyD88によって例示されるいくつかの細胞内タンパク質に見い出される。ショウジョウバエのTollファミリーおよび哺乳動物TLRファミリーは、細菌、真菌およびウイルスを含む多様な微生物リガンドの群に対する細胞膜上の認識受容体として知られている。最近、それらのTLRファミリーメンバーは、微生物感染の重要なセンサーであること

が立証された。今日までに少なくとも13個のTLRが発見されているが、それらのそれぞれは異物に由来する異なる種類のリガンド(例えば、二本鎖RNA、LPS、ペプチドグリカン、等)に応答するように特殊化されている5(非特許文献5)。例えば、TLR2はグラム陽性細菌ペプチドグリカンを認識し、またTLR4はグラム陰性細菌リポ多糖(LPS)を認識する。

[0004] 今日までにTIRドメインを含む細胞内蛋白分子が5個同定され、それらはMyD88、TIRAP (Mal)、TRIF (TICAM-I)、TRAM (TICAM-II)および S-ARMである6(非特許文献6)。これらの細胞内「アダプター」タンパク質は、TLRの細胞ドメインへリクルートされ、細胞内でシグナル伝達経路を媒介することが明らかになっている。アダプタータンパク質の多様性に関しては、別個のTLRにリクルートされるアダプター分子の異なる組合せが下流シグナル伝達カスケードを決定すると考えられている7(非特許文献7)。

[0005] MyD88は最初、肺条件培地または組換えIL-6による活性化後、M1骨髓芽球性白血病細胞中に誘導された12個の異なるmRNA転写物の1つとして同定された8(非特許文献8)。MyD88のヒトホモログは、1997年に単離クローン化された9(非特許文献9)。アミノ酸配列分析は、MyD88が短いリンカーによってC末端TIRドメイン(約150アミノ酸残基)と隔てられたN末端deathドメイン(約90アミノ酸残基)からなるモジュール構成を有することを予測した。IL-1R/IL-18R/TLRのそれぞれは、それらの細胞質側末端に、MyD88のTIRドメインと結合することが公知である1個のTIRドメインを有する。ここでTIR-TIRヘテロ二量体化が起こる。MyD88はさらに、deathドメインを含む下流因子であるIRAKと、deathドメイン-deathドメインヘテロ二量体化により結合する10(非特許文献10)。TIRドメインの2つの結晶構造(TLR2およびIL-1RAPL)がホモ二量体構造として決定されている11,12(非特許文献11、12)。これらは、TIRドメインのオリゴマー的性質をおそらく示している。これらのホモ二量体構造に基づいて、コンピュータでの(in silico)ドッキングシミュレーションを含むいくつかの実験を行って、MyD88とTLRの間のTIR-TIR相互作用が特徴付けられた13-15(非特許文献13~15)。しかし、そのようなオリゴマー性相互作用の実際のところの詳細はまだ十分理解されていない。

- [0006] IL-18を含むIL-1ファミリーや病原体構成成分認識受容体であるToll様受容体(TLR)のシグナル伝達経路のシグナルを修飾するような物質の開発がなされている(非特許文献16～19)。しかし、この経路の細胞内因子であるアダプター分子MyD88の機能を制御することでシグナルの一部を遮断する手法は現在まで試みられていない。
- [0007] 非特許文献1:Sims, J. E. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol* 14, 117-22 (2002)
- 非特許文献2:Okamura, H. et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378, 88-91 (1995).
- 非特許文献3:Kato, Z. et al. The structure and binding mode of interleukin-18. *Nat Struct Biol* 10, 966-71 (2003).
- 非特許文献4:O'Neill, L. A. & Greene, C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63, 650-7 (1998).
- 非特許文献5:Underhill, D. M. & Ozinsky, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology* 14, 103-110 (2002)
- 非特許文献6:McGettrick, A. F. & O'Neill, L. A. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol Immunol* 41, 577-82 (2004).
- 非特許文献7:Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117, 979-87; quiz 988 (2006)
- 非特許文献8:Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. A. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 5, 1095-7 (1990)
- 非特許文献9:Bonnert, T. P. et al. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett* 402, 81-4 (1997).
- 非特許文献10:Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-47 (1997).

非特許文献11:Tao, X., Xu, Y., Zheng, Y., Beg, A. A. & Tong, L. An extensively associated dimer in the structure of the C713S mutant of the TIR domain of human TLR2. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 216-21 (2002).

非特許文献12:Khan, J. A., Brint, E. K., O'Neill, L. A. & Tong, L. Crystal structure of the Toll/interleukin-1 receptor domain of human IL-1RAPL. *J Biol Chem* 279, 31664-70 (2004)

非特許文献13:Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A. & Gay, N. J. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* 278, 41443-51 (2003).

非特許文献14:Li, C., Zienkiewicz, J. & Hawiger, J. Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway. *J Biol Chem* 280, 26152-9 (2005).

非特許文献15:Jiang, Z. et al. Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10961-6 (2006).

非特許文献16:*J. Biol. Chem.* 1996 Nov 29;271(48):30517-23.

非特許文献17:*J. Biochem (Tokyo)*. 2005 Oct;138(4):433-42

非特許文献18:*Biochem. Pharmacol.* 2006 Jun 28; 72(1):62-9

非特許文献19:*J. Biol. Chem.* 2005 Apr 22;280(16):15809-14

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、LPS等のTLRファミリーとIL-1受容体ファミリーに共通のシグナル伝達に使用される細胞内因子アダプター分子MyD88の機能を細胞内でシグナル特異的に制御する手法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] IL-1/IL-18/TLRシグナル伝達におけるTIRドメインの重要な役割にもかかわらず、本願の優先日(2007年8月1日)の時点で、構造データは受容体のTIRに関するものしか利用できなかった。細胞内アダプター分子のTIRについては、そのいずれについても原子構造の決定はなされていなかった。したがって、これらのアダプターのTIRド

メインの構造情報は、相互作用機構をより正確に理解するために必須である。そこで、IL-1R/IL-18R/TLRシグナル伝達のより良い理解への一歩として、本発明者らは、溶液NMR分光法を用いてヒトMyD88のTIRドメインの溶液構造を決定した。この構造は、IL-1R/IL-18R/TLRシグナル伝達におけるTIR含有アダプタータンパク質の生物学的機能をさらに研究するために必要な基礎を提供する。また、本発明者らは、培養細胞を用いてMyD88 TIRの一連の機能分析を実施した。これらの分析は、MyD88がIL-18およびTLR4シグナル伝達経路で機能するために決定的な数個のアミノ酸残基を決定することを可能とした。興味深いことに、MyD88 TIRの3つの共通な相互作用部位が同定され、そして1つのさらなる部位はIL-18シグナル伝達にのみ機能した。

[0010] MyD88はdeathドメインとToll Interleukin-1 Receptor homology (TIR)ドメインからなる2ドメイン蛋白であるが、deathドメインを欠失させTIRドメイン(148-296)のみ細胞に発現させると、IL-18を含むIL-1ファミリーやTLRのシグナル非特異的ドミナントネガティブインヒビターとして働くことが知られている。このMyD88 TIRドメインのリシン214とリシン238とアルギニン269をアラニンに置換した変異体MyD88 TIR K214AとMyD88 TIR K238AとMyD88 TIR R269Aを作製し、その機能を培養細胞上において、NF- κ B Luciferase reporter gene assayで検討した結果、TLR4を介するLPSからのシグナルは遮断できるが、IL-18からのシグナルは遮断できないことがわかった。本発明は、これらの知見に基づいて、完成されたものである。なお、本願の優先日(2007年8月1日)以降に、Rossiらにより解析されたヒトMyD88TIRの構造がPROTEIN DATA BANKに登録された(登録日:2007年6月29日、公開日:2007年10月23日、登録番号:2js7)が、その公開は本願の優先日の後であった。

本発明の要旨は以下の通りである。

- [0011] (1)以下の(a)、(b)若しくは(c)のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。
- (a)配列番号2のアミノ酸配列において、214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、214番目のアミノ酸、238番目のアミノ酸及び269番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加さ

れたアミノ酸配列からなり、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質

(c)配列番号3、5又は7のヌクレオチド配列からなるDNAに相補的なDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質

[0012] (2)(a)の他のアミノ酸がアラニンである(1)記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。

(3)ヒト由来の野生型MyD88 TIRタンパク質の変異体である(1)又は(2)記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。

(4)ヒト以外の動物由来の野生型MyD88 TIRタンパク質の変異体である(1)又は(2)記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。

(5)配列番号4又は6のアミノ酸配列からなる(1)記載のMyD88 TIR変異体蛋白質又はその塩。

[0013] (6)(1)記載のタンパク質をコードする単離されたDNA。

(7)(6)記載のDNAを含有する組換えベクター。

(8)(7)記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(9)(6)記載のDNAで形質転換した宿主を培養し、培養物からMyD88 TIR変異体タンパク質を採取することを含むMyD88 TIR変異体タンパク質の製造方法。

(10)(1)記載のMyD88 TIR変異体タンパク質若しくはその塩又は(1)記載のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAを有効成分として含有する医薬組成物。

[0014] (11)(1)記載のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAがベクターに組み込まれている(10)記載の医薬組成物。

(12)(1)記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩に対する抗体。

(13)インターロイキン18作用を特異的に修飾する薬剤をスクリーニングする方法であって、配列番号2のアミノ酸配列からなるMyD88 TIRの214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸と前記薬剤の候補物質との結合の有無を調べることを含む前記方法。

[0015] 本発明は、細胞内シグナル伝達タンパクの機能的変異導入箇所の情報を提供する

。

IL-18は、IFN- γ の産生を誘発する等、細胞性免疫機能において重要な分子であることがわかっているが、そのシグナル伝達経路は図8のようにLPSを認識する受容体であるTLR4等と共通している。LPSは、グラム陰性菌の細胞膜に由来する物質であるが、生体内においてエンドトキシンショックを誘発する等、毒性を発揮する物質である。本発明者らが作製したMyD88 TIR K214A、K238A、R269A変異体は、IL-18シグナル伝達は阻害しないが、LPSによるTLR4シグナル伝達は阻害する。従って、この変異体分子は、IL-18による細胞性免疫機能を保持したまま、LPSによる直接のエンドトキシンショック等の病態発症を抑えることが期待できる。

発明の効果

[0016] 従来では、LPSによる毒性の治療には、エンドトキシン除去や抗炎症薬等での治療が行われていたが、新たな治療アプローチとして、遺伝子レベルで細胞に組換え蛋白を発現させることで、IL-18による細胞性免疫機能を維持したままLPSによる炎症性サイトカインの産生を制御することが可能となった。

また、逆に、このMyD88 TIRドメインのK214A、K238及びR269を標的とする低分子やペプチドは、IL-18に特異的な作用をもたらす可能性がある。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2007-200776の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]ヒトMyD88、IL-1R類、およびTLR類のTIRドメインタンパク間のアミノ酸配列アライメント。

[図2A]ヒトMyD88のTIRドメインの溶液構造。2A) 計算された20個の最終構造の最もよく収束した主鎖を重ね合わせた立体図。残基157-185, 188-194および203-295の主鎖原子を重ね合わせている。

[図2B]ヒトMyD88のTIRドメインの溶液構造。2B) Molmolを用いて描いた、MyD88のNMR構造の代表的リボン図。二次構造の表示(β A- β E, α A- α C および α E)は、TLR TIRに従う。

[図2C]ヒトMyD88のTIRドメインの溶液構造。2C) および2D) MyD88 TIRと、TLR2のT

IRドメインの結晶構造(1FYW)を重ね合わせて示したもの。 β シートコアは類似しているが(RMSD=0.90オングストローム)、いくつかの領域に相違がある。

[図2D]ヒトMyD88のTIRドメインの溶液構造。2C)および2D) MyD88 TIRと、TLR2のTIRドメインの結晶構造(1FYW)を重ね合わせて示したもの。BBループ部分をクローズアップしている。 β シートコアは類似しているが(RMSD=0.90オングストローム)、この領域において両者は大きく相違がある。

[図3]TIRドメインの表面静電ポテンシャル。4つのTIRドメインの静電ポテンシャルを表したもの。赤は陰性荷電領域を示し、青は陽性荷電領域を示す。矢印は、各TIRドメインのBB-ループを示す。TIRドメインの左側の図は、それぞれ図2Aと同一の配向である。

[図4A]MyD88 TIRドメイン野生型および変異体群のレポーターアッセイの結果。4A:IL-18R β を同時トランスフェクションしたHEK293FT細胞を用いてIL-18(100 ng/mL)で刺激した際のNF- κ Bレポーター遺伝子アッセイ。このグラフにおいて、各棒グラフは刺激されていない細胞あたりの刺激された細胞の相対的ルシフェラーゼ発光単位を示す。野生型と各変異体グループの間の有意差は、ダネットの多重比較検定により分析した。グラフ上のカラーコード:野生型群と比較したNF- κ B活性が黒の棒グラフは統計的に有意なもの;白の棒グラフは、変異導入が重大な影響をなんら示さなかったことを示す。

[図4B]MyD88 TIRドメイン野生型および突然変異体のレポーターアッセイの結果。4B:補助分子MD2を同時トランスフェクションした293-hTLR4A-HA細胞を用いてLPS (1.0 μ g/mL)で刺激した際のNF- κ Bレポーター遺伝子アッセイ。このグラフにおいて、各棒グラフは刺激されていない細胞あたりの刺激された細胞の相対的ルシフェラーゼ発光単位を示す。野生型と各変異体グループの間の有意差は、ダネットの多重比較検定により分析した。カラーコード:野生型群と比較したNF- κ B活性が黒の棒グラフは統計的に有意なもの;白の棒グラフは、変異導入が重大な影響をなんら示さなかったことを示す。

[図5A]MyD88 TIRドメインの構造表面のマッピング。IL-18刺激による機能分析に用いた極性アミノ酸のみを反映する。オレンジ色のアミノ酸残基は、ルシフェラーゼアッ

セイの結果、重要であると判断されたもの。茶色のアミノ酸残基は、ドミナントネガティブ作用が不活性化しなかったものを示す

[図5B]MyD88 TIRドメインの構造表面のマッピング。LPS刺激による機能分析に用いた極性アミノ酸のみを反映する。赤色のアミノ酸残基は、ルシフェラーゼアッセイの結果、重要であると判断されたもの。茶色のアミノ酸残基は、ドミナントネガティブ作用が不活性化しなかったものを示す。特にLPS刺激と比較してIL-18刺激系では、K214A, K238A, R269Aの3つの残基が特異的に重要である。

[図6]MyD88 TIRドメインに含まれる、保存性の高い残基に対するアラニンあるいはヒスチジン置換変異体のHEK293FT細胞における発現レベルの評価。P200H、F285Aの発現レベルは、野生型やK238Aと同等であったが、W286Aは他のものより有意に低く、かつシクロヘキシミド(25 μ mol/L)と共にインキュベートしたところ、48時間のインキュベーション後、W286Aのタンパク質発現はほぼ完全に消失した。

[図7]細胞に一過性発現させた、FLAGタグを付加したTIRAPとmycタグを付加したMyD88タンパク質の免疫沈降実験による相互作用の検出。MyD88は、TIRAPと相互作用を示し、かつMyD88 TIR のK214A、K238A、R269A変異体もTIRAPと相互作用可能であった。

[図8]IL-18とLPSがそれぞれ関与する細胞内シグナル伝達経路を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0018] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

1. MyD88 TIR変異体タンパク質

本発明は、以下の(a)、(b)若しくは(c)のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩を提供する。

[0019] (a)配列番号2のアミノ酸配列において、214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、238番目のアミノ酸及び269番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグ

ナルは阻害しないタンパク質

(c)配列番号3、5又は7のヌクレオチド配列からなるDNAに相補的なDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質

[0020] (a)のタンパク質としては、配列番号2のアミノ酸配列において、214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸が他のアミノ酸(例えば、アラニン、セリン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、グリシン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、チロシン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸など)に置換されたものを例示することができる。214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンと置換する他のアミノ酸は、MyD88 TIRの立体構造を破壊しないものであるとよい。例えば、アラニンの他、セリン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、トレオニンで置換することが好ましい。

[0021] (b)のタンパク質は、(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、214番目のアミノ酸、238番目のアミノ酸及び269番目のアミノ酸以外の1若しくは数個(好ましくは、2個以上20個以下、より好ましくは2個以上10個以下)のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質である。

[0022] 本明細書において、「リポ多糖刺激のシグナルを阻害する」とは、ほ乳類細胞において、リポ多糖刺激による転写因子の活性化及び、その結果としてのサイトカイン産生等の細胞の反応の抑制を意味する。リポ多糖刺激のシグナルを阻害するか否かは、リポ多糖を認識する受容体を持ったほ乳類細胞に転写因子の結合認識部位の配列を組み込んだレポーター遺伝子ベクターを形質転換により導入した後、リポ多糖刺激を加え、レポーター遺伝子の発現量を比較検討することにより、調べることができる。例えば、リポ多糖を認識する受容体を持ったほ乳類細胞に、目的のタンパク質をコードする配列と転写因子の結合認識部位の配列を組み込んだレポーター遺伝子ベクターを形質転換により導入した後、リポ多糖刺激を加え、レポーター遺伝子の発現量を測定し、目的のタンパク質をコードする配列を組み込んでいない形質転換細胞

におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、発現量が減少していれば、リポ多糖刺激のシグナルを阻害すると判定することができる。

[0023] また、「インターロイキン18刺激のシグナルを阻害する」とは、ほ乳類細胞において、インターロイキン18による転写因子の活性化及び、その結果としてのサイトカイン産生(特にインターフェロン γ)等の細胞の反応の抑制を意味する。インターロイキン18刺激のシグナルを阻害するか否かは、インターロイキン18を認識する受容体を持ったほ乳類細胞に転写因子の結合認識部位の配列を組み込んだレポーター遺伝子ベクターを形質転換により導入した後、リポ多糖刺激を加え、レポーター遺伝子の発現量を比較検討することにより、調べることができる。例えば、インターロイキン18を認識する受容体を持ったほ乳類細胞に、目的のタンパク質をコードする配列と転写因子の結合認識部位の配列を組み込んだレポーター遺伝子ベクターを形質転換により導入した後、リポ多糖刺激を加え、レポーター遺伝子の発現量を測定し、目的のタンパク質をコードする配列を組み込んでいない形質転換細胞におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、発現量が減少していれば、インターロイキン18刺激のシグナルを阻害すると判定することができる。

[0024] (c)のタンパク質について、配列番号3、5又は7のヌクレオチド配列からなるDNAに相補的なDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAは、配列番号3、5又は7のヌクレオチド配列からなるDNAに相補的なDNAの全部又は一部と少なくとも80%(好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%)の同一性があるとよい。ハイブリダイゼーションはストリンジントな条件下で行われる。核酸二本鎖又はハイブリッドの安定性は、融解温度 T_m (プローブが標的DNAから解離する温度)で表される。この融解温度はストリンジントな条件を定義するために用いられる。1%のミスマッチにより T_m が1°C低下すると仮定すると、ハイブリダイゼーション反応の最終洗浄の温度を低くしなければならない。例えば、プローブと95%以上の同一性を有する配列を求める場合には、最終洗浄温度を5°C低くしなければならない。実際、1%のミスマッチにつき、0.5~1.5°Cの間で T_m が変わることになる。ストリンジントな条件の例としては、5x SSC/5x デンハルト溶液/1.0% SDS中68°Cでハイブリダイズさせ、0.2x SSC/0.1% SDS中室温で洗浄することである。中程度にストリンジントな条件の例としては、3x

SSC中42℃で洗浄することである。塩濃度や温度は、プローブと標的核酸との同一性の最適なレベルを達成するために変更されうる。このような条件に関するさらなる指針として、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N.Y.) at Unit 2.10を参照されたい。

[0025] 本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質としては、配列番号8のアミノ酸からなるタンパク質(MyD88 TIR K214A)、配列番号4のアミノ酸からなるタンパク質(MyD88 TIR K238A)、配列番号6のアミノ酸からなるタンパク質(MyD88 TIR R269A)などが好ましい。

本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質は、ヒト由来の野生型MyD88 TIRタンパク質の変異体であっても、ヒト以外の動物由来の野生型MyD88 TIRタンパク質の変異体であってもよい。

[0026] 本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質の塩は、薬理学的に許容される塩であるとして、特に、薬理学的に許容される酸付加塩が好ましい。薬理学的に許容される酸付加塩としては、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などを例示することができる。

[0027] 本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質及びその塩は、IL-18の作用は遮断せずに、LPSの作用を特異的に遮断することが可能である。従って、本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質及びその塩は、Toll様受容体及びIL-1/18シグナル伝達に関与する疾患、具体的には、LPSが誘発する疾患(例えば、エンドトキシンショック、SIRS (systemic inflammatory response syndrome)等の予防及び／又は治療に用いることができる。また、Toll様受容体及びIL-1/18シグナル伝達の研究などを目的とする試薬として利用することもできる。

[0028] 本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質及びその塩は、公知の方法によって製造することができる。例えば、後述の2に記載のようにしてMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAを得、得られたDNAを適当な発現ベクターに組み込んだ後、適当な

宿主に導入し、組換え蛋白質として生産させることにより、MyD88 TIR変異体タンパク質を製造することができる(例えば、西郷薫、佐野弓子共訳、CURRENT PROTOCOLSコンパクト版、分子生物学実験プロトコール、I、II、III、丸善株式会社:原著、Ausubel, F. M. 等, Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照のこと)。

[0029] あるいはまた、本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質及びその塩は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

また、当業者であれば、本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質をドメインとして含む機能性タンパク質(例えば、MyD88、TIRAP(Mal)、TRIF(TICAM-I)、TRAM(TICAM-I I)、SARMなど)を製造することが可能であり、このようなタンパク質も本発明の範囲に含まれるものとする。

[0030] 2. MyD88 TIR変異体タンパク質をコードする単離されたDNA

本発明のMyD88 TIR変異体をコードする単離されたDNAは、本発明のMyD88 TIR変異体をコードするヌクレオチド配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。本発明のMyD88 TIR変異体をコードするDNAとしては、配列番号7のヌクレオチド配列からなるDNA、配列番号8のアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸配列において、214番目のリシンがアラニンに置換されているアミノ酸配列)を有するMyD88 TIR変異体をコードするDNA(例えば、配列番号7のヌクレオチド配列からなるDNA)に相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質をコードするDNA、配列番号3のヌクレオチド配列からなるDNA、配列番号4のアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸配列において、238番目のリシンがアラニンに置換されているアミノ酸配列)を有するMyD88 TIR変異体をコードするDNA(例えば、配列番号3のヌクレオチド配列からなるDNA)に相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質をコードするDNA、配列番号5のヌクレオチド配列からなるDNA、配列番号6のアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸配列において、269番目のアルギニンがアラニンに置換されているアミノ酸配列)を有するMyD88 TIR変異体

をコードするDNA(例えば、配列番号5のヌクレオチド配列からなるDNA)に相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質をコードするDNAなどを例示することができる。

[0031] 配列番号4、6又は8のアミノ酸配列を有するMyD88 TIR変異体をコードするDNAに相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAは、配列番号4、6又は8のアミノ酸配列を有するMyD88 TIR変異体をコードするDNA(例えば、配列番号3、5又は7のヌクレオチド配列からなるDNA)に相補的なDNAの全部又は一部と少なくとも80%(好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%)の同一性があるといふ。ハイブリダイゼーションはストリンジェントな条件下で行われる。核酸二本鎖又はハイブリッドの安定性は、融解温度 T_m (プローブが標的DNAから解離する温度)で表される。この融解温度はストリンジェントな条件を定義するために用いられる。1%のミスマッチにより T_m が1°C低下すると仮定すると、ハイブリダイゼーション反応の最終洗浄の温度を低くしなければならない。例えば、プローブと95%以上の同一性を有する配列を求める場合には、最終洗浄温度を5°C低くしなければならない。実際、1%のミスマッチにつき、0.5~1.5°Cの間で T_m が変わることになる。ストリンジェントな条件の例としては、5x SSC/5x デンハルト溶液/1.0% SDS中68°Cでハイブリダイズさせ、0.2x SSC/0.1%SDS中室温で洗浄することである。中程度にストリンジェントな条件の例としては、3x SSC中42°Cで洗浄することである。塩濃度や温度は、プローブと標的核酸との同一性の最適なレベルを達成するために変更されうる。このような条件に関するさらなる指針として、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N.Y.) at Unit 2.10を参照されたい。

[0032] 本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードする単離されたDNAは、例えば、以下のようにして製造することができる。

健康なヒトの血液リンパ球からmRNAを抽出し、逆転写酵素およびオリゴdTプライマーを用いてcDNAを合成する。ヒトMyD88のTIRドメイン(148-296)のコード領域(447塩基)をPCRによって増幅する。得られたPCR産物が野生型MyD88 TIRタンパク質をコ

ードするDNAである。野生型MyD88 TIRタンパク質をコードするDNAのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列の一例をそれぞれ配列番号2および1に示す。

[0033] MyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAは、MyD88 TIRのコード領域(447塩基)を点突然変異誘発法により変異させることにより作製することができる。変異させたMyD88 TIRのコード領域(447塩基)をPCRによって増幅する。得られたPCR産物がMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAである。配列番号2のアミノ酸配列において、214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列からなるMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAのヌクレオチド配列の一例を配列番号7、3及び5に示す。

[0034] 配列番号7のヌクレオチド配列からなるDNAは、配列番号8のアミノ酸配列において、214番目のリシンがアラニンに置換されているアミノ酸配列からなるMyD88 TIR変異体タンパク質をコードする。

配列番号3のヌクレオチド配列からなるDNAは、配列番号2のアミノ酸配列において、238番目のリシンがアラニンに置換されているアミノ酸配列からなるMyD88 TIR変異体タンパク質をコードする。

配列番号5のヌクレオチド配列からなるDNAは、配列番号2のアミノ酸配列において、269番目のアルギニンがアラニンに置換されているアミノ酸配列からなるMyD88 TIR変異体タンパク質をコードする。

[0035] 3. 組換えベクター

本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAを含有する組換えベクターは、公知の方法(例えば、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法)により、本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入することにより得られる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病原ウイルスな

どを用いることができる。

- [0036] 発現ベクターには、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを付加してもよい。

また、発現ベクターは、融合タンパク質発現ベクターであってもよい。種々の融合タンパク質発現ベクターが市販されており、pGEXシリーズ(アマシャムファルマシアバイオテク社)、pET CBD Fusion System 34b-38b(Novagen社)、pET Dsb Fusion Systems 39b and 40b(Novagen社)、pET GST Fusion System 41 and 42(Novagen社)などを例示することができる。

- [0037] 組換えベクターを遺伝子ワクチン(プラスミドワクチン・ウイルスベクターワクチン)として使用する場合には、すでに遺伝子ワクチン用に開発されているプラスミドベクター又はウイルスベクター(RetroNectinTM、Adenovirus Expression Vector Kit等:ViroMedica Pacific Limited)に標的遺伝子を導入してワクチンを作製するとよい。

- [0038] 4. 形質転換体

本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAを含有する組換えベクターを宿主に導入することにより、形質転換体を得ることができる。

宿主としては、細菌細胞(例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、枯草菌など)、真菌細胞(例えば、酵母、アスペルギルスなど)、昆虫細胞(例えば、S2細胞、Sf細胞など)、動物細胞(例えば、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞など)、植物細胞などを例示することができる。

- [0039] 組換えベクターを宿主に導入するには、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法(例えば、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、トランスフェクション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、形質導入法、スクレーブローディング法、ショットガン法など)または感染により行うことができる。

- [0040] 形質転換体を培地で培養し、培養物からMyD88 TIR変異体タンパク質を採取することができる。MyD88 TIR変異体タンパク質が培地に分泌される場合には、培地を回収し、その培地からMyD88 TIR変異体タンパク質を分離し、精製すればよい。MyD88 TIR変異体タンパク質が形質転換された細胞内に産生される場合には、その細胞を

溶解し、その溶解物からMyD88 TIR変異体タンパク質を分離し、精製すればよい。

MyD88 TIR変異体タンパク質が別のタンパク質(タグとして機能する)との融合タンパク質の形態で発現される場合には、融合タンパク質を分離及び精製した後に、FactorXaや酵素(エンテロキナーゼ)処理をすることにより、別のタンパク質を切断し、目的とするMyD88 TIR変異体タンパク質を得ることができる。

[0041] MyD88 TIR変異体タンパク質の分離及び精製は、公知の方法により行うことができる。公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度の差を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

[0042] 5. 医薬組成物

本発明は、MyD88 TIR変異体タンパク質若しくはその塩又は前記MyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAを有効成分として含有する医薬組成物も提供する。本発明の医薬組成物は、Toll様受容体及びIL-1/18シグナル伝達に関与する疾患、具体的には、LPSが誘発する疾患(例えば、エンドトキシンショック、SIRS (systemic inflammatory response syndrome)の予防及び/又は治療に用いることができる。本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質は、IL-18シグナル伝達は阻害しないが、LPSによるTLR4シグナル伝達は阻害することができるので、本発明の医薬組成物は、IL-18による細胞性免疫機能を保持したまま、LPSによる直接のエンドトキシンショック等の病態発症を抑えるのに効果的である。

[0043] MyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAはベクターに組み込まれていてもよい。

MyD88 TIR変異体及びその塩、前記MyD88 TIR変異体をコードするDNA、並びに前記DNAを含有するベクターは前述の通りである。

[0044] MyD88 TIR変異体若しくはその塩、前記MyD88 TIR変異体をコードするDNA又は前記DNAを含有するベクターは、例えば、PBSなどの緩衝液、生理食塩水、滅菌水

などに溶解し、必要に応じてフィルターなどで濾過滅菌した後、注射により被験者に投与されるとよい。また、この溶液には、添加剤(例えば、不活化剤、保存剤、アジュバント、乳化剤など)などを添加してもよい。MyD88 TIR変異体、前記MyD88 TIR変異体をコードするDNA又は前記DNAを含有するベクターは、静脈、筋肉、腹腔、皮下、皮内などに投与することができ、また、経鼻、経口投与してもよい。MyD88 TIR変異体をコードするDNA又は前記DNAを含有するベクターを投与する場合には、遺伝子ワクチンの投与に適した製剤形態(例えば、水溶液、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルなど)や導入方法(例えば、注射器、シリンジ、カテーテル、遺伝子銃などを用いる方法)などを採用するとよい。

[0045] MyD88 TIR変異体、前記MyD88 TIR変異体をコードするDNA又は前記DNAを含有するベクターの投与量、投与の回数及び頻度は、被験者の症状、年齢、体重、投与方法、投与形態などにより異なるが、例えば、通常、成人一人当たり0.001~1 mg/kg体重、好ましくは、0.01~0.1 mg/kg体重のMyD88 TIR変異体を、少なくとも1回、所望の効果が持続する頻度で投与するとよい。MyD88 TIR変異体をコードするDNA又は前記DNAを含有するベクターを投与する場合には、例えば、通常、成人一人当たり0.1~100 mg、好ましくは、1~10 mgの投与量で少なくとも1回、所望の効果が持続する頻度で投与するとよい。ベクターがウイルスの場合には、成人一人当たり $10^9 \sim 10^{14}$ ウイルス粒子、好ましくは $10^{11} \sim 10^{12}$ ウイルス粒子の投与量で少なくとも1回、所望の効果が持続する頻度で投与するとよい。上記の投与量は適宜変更しうる。

[0046] 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は常法により製造することができ、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有してもよい。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどがあげられる。

[0047] 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などがあげられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤型であるとよい。かかる注射剤は常法、すなわちMyD88 TIR変異体タンパク質又はその

塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製される。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は通常適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、MyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製することができる。

[0048] 上記の経口用または非経口用医薬組成物は、有効成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されるとよい。投薬単位の製剤中における有効成分の含量は、製剤の種類により異なるが、通常1～100重量%であり、好ましくは50～100重量%である。

また、上記の医薬組成物は、MyD88 TIR変異体若しくはその塩、前記MyD88 TIR変異体をコードするDNA又は前記DNAを含有するベクターとの配合により好ましくない相互作用を生じない限り、他の有効成分を含有してもよい。

[0049] 6. 抗体

本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩に対する抗体は、本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩の検出及び／又は定量に利用することができる。

本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、本発明のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩またはそのエピトープを含む断片を動物に投与することにより得られる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体のいずれであってもよい。

[0050] ポリクローナル抗体を作製するには、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）とキャリアー蛋白質との複

合体をつくり、動物に投与(免疫)を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、免疫動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。ポリクローナル抗体の分離精製は、免疫グロブリンの分離精製法(例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従って行なうことができる。

[0051] モノクローナル抗体は、Nature (1975) 256: 495、Science (1980) 208: 692-に記載されている、G. Koehler及びC. Milsteinのハイブリドーマ法により作製することができる。すなわち、動物を免疫した後、免疫動物の脾臓から抗体産生細胞を単離し、これを骨髄腫細胞と融合させることによりモノクローナル抗体産生細胞を調製する。さらに、MyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩と特異的に反応するが、他の抗原タンパク質とは実質的に交差反応しない抗体を産生する細胞系を単離するとよい。この細胞系を培養し、培養物から所望のモノクローナル抗体を取得することができる。モノクローナル抗体の精製は、上記の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

[0052] 一本鎖抗体を作製する技法は、米国特許第4,946,778号に記載されている。

ヒト化抗体を作製する技法は、Biotechnology 10, 1121-, 1992; Biotechnology 10, 169-, 1992に記載されている。

[0053] 7. スクリーニング方法

本発明は、インターロイキン18作用を特異的に修飾する薬剤をスクリーニングする方法であって、配列番号2のアミノ酸配列からなるMyD88 TIRの214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸と前記薬剤の候補物質との結合の有無を調べることを含む前記方法も提供する。

[0054] 本明細書において、「インターロイキン18作用を特異的に修飾する」とは、インターロイキン18受容体の発現しているほ乳類細胞において、インターロイキン18による転写因子の活性化及び、その結果としてのサイトカイン産生(特にインターフェロン γ)等の細胞の反応量の増減を意味する。インターロイキン18作用を特異的に修飾するか否かは、インターロイキン18受容体の発現しているほ乳類細胞において、細胞培養培地中にインターロイキン18を添加し、細胞を刺激することによる転写因子NF- κ Bの活性化やインターフェロン γ の産生量を測定することにより、調べることができる。例えば、インターロイキン18受容体の発現しているほ乳類細胞において、細胞培養培地中にインターロイキン18と薬剤の候補物質を添加し、細胞を刺激することによる転写因子NF- κ Bの活性化やインターフェロン γ の産生量を測定し、薬剤の候補物質を添加しなかった場合と比較して、転写因子NF- κ Bの活性化やインターフェロン γ の産生量に変化していれば、その候補物質はインターロイキン18作用を特異的に修飾すると判定することができる。

[0055] 配列番号2のアミノ酸配列からなるMyD88 TIRの214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸と前記薬剤の候補物質との結合の有無を調べるには、X線結晶構造解析、核磁気共鳴(NMR)、中性子回折などの立体構造解析、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡などの複合体の形状を観察する方法や配列番号2のアミノ酸配列からなるMyD88 TIRの立体構造に対する任意の構造の被験物質との安定な結合様式をコンピュータでシミュレートするドッキングスタディなどの手法などを用いることができる。

[0056] 候補物質は、いかなる物質であってもよく、タンパク質、ペプチド、多糖、オリゴ糖、単糖、低分子化合物、核酸(DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、モノヌクレオチド等)などを例示することができる。

インターロイキン18作用を特異的に修飾する薬剤は、クローン病や関節リウマチ、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、劇症肝炎などの疾患の予防及び／又は治療に利用することができる。

実施例

[0057] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に

限定されるものではない。

[0058] [実施例1]

材料および方法

サンプルの調製

ヒトMyD88のTIRドメイン(148-296)をコードする遺伝子は、ヒトリンパ球からmRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを合成し、さらにPCR法を利用して増幅した。これをpGEX-5X-3 (Amersham)プラスミドベクター中にクローン化した。このプラスミドを大腸菌B L-21 (DE3)株 (Novagen)に形質転換した。この大腸菌のシングルコロニーを選択し、安定同位体元素で標識した栄養豊富な増殖培地(Silantes)に接種した。A600が0.45-0.5に達するまで大腸菌を37℃で培養した。次に培養物の温度を25℃まで下げ、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)を最終濃度が1 mMとなるように添加することによりタンパク質発現を誘導した。誘導16時間後に4℃で6,000 x gで10分間遠心して集菌し、細胞ペレットを精製まで-80℃で保存した。この細胞ペレットを溶菌バッファー[20 mM Tris HCl; 0.4 M KCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.05% 2-メルカプトエタノールおよび 1 mM Pefabloc (Roche)]に再懸濁し、超音波処理によって溶菌した。細胞破砕物および不溶物を遠心(4℃、6,000 x g、10分間)により除去した。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として発現したMyD88のTIRドメインをまずアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、そしてFactor Xa プロテアーゼ(Pharmacia)を用いた消化によりGSTタグを除去した。次に、GSTタグとMyD88のTIRドメインに分離したタンパク質をSephacryl S-100 HR 26/60 カラム (Pharmacia) および 20 mM リン酸カリウムバッファー (pH: 6.0) (150 mM KCl, 0.1 mM EDTAおよび 10 mM DTT 含有)を用いてゲル濾過した。MyD88タンパク質の単量体性TIRドメインをプールし、10 kDa Microsep microconcentrator (Amicon)を用いた限外濾過により濃縮した。Mono-Sカラム(Pharmacia)を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより、さらに精製を行った。この精製プロトコールを用いて、¹⁵Nで標識した、および ¹³C、¹⁵Nで二重標識した、MyD88タンパク質の野生型TIRドメインを調製した。タンパク質収量は、栄養豊富な増殖培地1リットルから約1.0 mgであった。これらのタンパク質サンプルは凝集体を形成する傾向があるように思われたので、これらのタンパク質のサンプルバッファーを20 m

M リン酸カリウムバッファー (pH: 6.0) (0.1 mM EDTA, 10 mM DTT, 50 mM 重水素化 L-アルギニンおよび50 mM 重水素化 L-グルタミン酸含有)と置換した(引用文献#1)。最終的にNMR実験に用いたタンパク質サンプルの最終濃度は、約0.3 mMであった。

[0059] NMR分光法

全てのNMRスペクトルは、CryoProbeを備えたBruker DRX500または DRX800分光計を用いて25°Cで記録した。タンパク質の主鎖および側鎖¹H, ¹³C および ¹⁵N共鳴の帰属を決定するため、三重共鳴NMRを実施した。構造計算のための距離拘束は、3D ¹⁵N edited NOESYおよび3D ¹³C edited NOESY実験(混合時間150 msec)より得た。NMRPipeソフトウェアパッケージ(引用文献#2)を用いてNMRスペクトルをプロセッシングし、Sparky(引用文献#3)を用いて分析した。¹H-¹⁵N定常状態ヘテロNOE値を得るために用いたパルスシーケンスは、以前に記述されている(引用文献#4)。

[0060] 定常状態の¹H-¹⁵NヘテロNOE値は、実験開始に先立って、3秒間の¹H飽和(a three-second ¹H saturation)を有する及び有しないスペクトルを記録することにより決定した。NOE測定のため、合計64のスキャンを行い、データを積算した。全てのデータはNMRPipeを用いてプロセッシングし、Sparkyを用いてピーク強度を計測した。定常状態NOE値は、プロトン飽和を有するピーク強度と有しないピーク強度の比より決定した: $NOE = I_{sat}/I_{unsat}$ 。

[0061] 構造計算

自動化されたNOESYクロスピーク帰属および反復構造計算は、CYANAバージョン2.1を用いて実施した(引用文献#5)。¹³C edited NOESYおよび¹⁵N edited NOESYスペクトルのピークピッキング(peak-picking)は、Sparkyを用いて実施した。あいまいでないNOESYクロスピークを手作業で帰属し、距離拘束としてCYANAによる構造計算に含めた。手作業で帰属決定したNOE値は、強い、中程度の、および弱いNOEクロスピーク強度にそれぞれ対応する3つの距離範囲1.8-2.7 オングストローム (NHプロトンを含むNOEについては、1.8-2.9 オングストローム)、1.8-3.3 オングストローム (NHプロトンを含むNOEについては、1.8-3.5 オングストローム)、および 1.8-5.0 オングストロームに分類された。水素結合拘束および二面角拘束もまたCYANAによる構造計

算に含めた。水素結合拘束($r_{\text{NH-O}} = 1.8\text{--}2.2$ オングストローム および $r_{\text{N-O}} = 2.2\text{--}3.3$ オングストロームである場合は、水素結合1個あたり2)は、NOESYパターンに基づくタンパク質の標準的二次構造および主鎖の二次ケミカルシフトから作製された。主鎖二面角拘束(ϕ および ψ 角度)は、3D HNHA実験から得た $^3J_{\text{HN}\alpha}$ 結合定数および主鎖ケミカルシフト分析プログラムTALOSに由来する(引用文献#6)。

[0062] NOE帰属および構造計算手順の各サイクルにおいて、200個のランダムな配座異性体を30,000ステップでアニーリングし、最も低い標的関数を有する20個の配座異性体を次のNOE帰属サイクルに選択した。最後に、CYANAプログラムにより作製された距離拘束を用いて、CNSバージョン1.1による構造精密化計算を行った(引用文献#7)。作製した200個の配座異性体のうち、全エネルギーが最も低い20個の配座異性体を統計分析に用いた(表1)。

[0063] ラマチャンドランプロットは、プログラムPROCHECK-NMR(引用文献#8)を用いて計算した。表面静電ポテンシャルは、ソフトウェアMOLMOL 2K.2(引用文献#9)を用いて計算した。

[0064] 細胞およびベクターの調製

ヒト胎児由来腎臓(HEK)細胞293FTをInvitrogenより購入し、また293-hTLR4A-HA細胞をInvivogenより購入した。これらの細胞を、10% 熱不活性化ウシ胎児血清(Sigma)、ペニシリン(100 U/mL)およびストレプトマイシン(100 pg/mL)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(高グルコース含有D-MEM;Invitrogen)で培養した。全ての細胞は37°Cで5% CO₂の混合気下でインキュベートした。N末端にc-mycタグを付加したMyD88のTIRドメイン(146-296)をコードする遺伝子をpcDNA3.1+plasmid (Invitrogen)ベクターにクローン化した。MyD88のTIRドメインの突然変異させた配列は、GeneEditor in vitro Site-Directed Mutagenesis System (Promega)を用いて作製し、配列分析をして突然変異の存在を確認した。C末端にAU1タグを付加したIL-18R β およびMD2をコードする遺伝子を、pcDNA3.1+plasmidベクターにクローン化した。4個のkB結合部位を含むpGL3-Basic Vector (Promega)であるNF- κ Bルシフェラーゼレポーターベクター、およびpcDNA3-Rlucである細胞数を補正するためのコントロールルシフェラーゼベクターは、Sewon Ki博士および古久保哲朗教授(横浜市立大学)から寄贈を受けた。

- 。
- [0065] 作製したMyD88 TIRの突然変異の説明は以下の通りである。極性残基からアラニンへ:全ての荷電アミノ酸(Thr, Ser, Glu, ArgおよびHis)をそれぞれアラニンに置換した。Phe285, Trp286からAlaへ:Phe285およびTrp286は保存されたBox(ボックス)3配列中に存在し、機能的に重要であることが示唆されているので(引用文献#10, 11)、アラニンに置換した。MyD88のPro200から Hisへ:マウスTLR4のTIRドメインのこの位置における点突然変異(Pro712His:Lps^d 突然変異)は宿主のリポ多糖(LPS)への免疫応答にとって決定的であることが示されたので(引用文献#12)、この置換体を作製した。TLR2のTIRドメインにおけるこの部位のプロリンの重要性もまた指摘されている(引用文献#13)。
- [0066] 一過性トランスフェクションおよびNF- κ Bレポーター遺伝子ルシフェラーゼアッセイ
- MyD88 TIRの機能的アミノ酸を検索するため、本発明者らはHEK293細胞系を用いて、NF- κ Bの活性化がレポータータンパク質ルシフェラーゼの発現と結びついてい
- るアッセイ系を設計した。IL-18またはLPSを用いた刺激の結果、細胞中のNF- κ BはMyD88の下流で活性化され、これは細胞中にルシフェラーゼの発現をもたらす。MyD88は、N末端deathドメインおよびC末端TIRドメインを含んでなる。MyD88のTIRドメインのみが単独で外因性に発現されると、それは内因性MyD88と競合してIL-1R、IL-18RおよびTLRと相互作用することが可能であり、細胞中でドミナントネガティブな阻害剤として働くことが知られている(引用文献#14)。トランスフェクションの1日前に、HEK293FT 細胞または 293-hTLR4A-HA 細胞を 1.0×10^5 個/mL の密度で6-ウェルプレートSUMILON CELLTIGHT C-1 (SUMITOMO BAKELITE)に播いた。Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を使用する方法に従って用いて、 $1.0 \mu\text{g}$ のpcDNA3.1+ コントロールベクターまたは $1.0 \mu\text{g}$ のpcDNA3.1+ myc-MyD88 TIR ドメイン野生型または突然変異体、 $1.0 \mu\text{g}$ のpcDNA3.1+ IL-18R β -AU1 または $1.0 \mu\text{g}$ のpcDNA3.1+ MD2-AU1、 $0.5 \mu\text{g}$ のNF- κ B ルシフェラーゼレポーターベクター、および $0.1 \mu\text{g}$ のpcDNA3-Rlucをトランスフェクションした。全てのプラスミドベクターは、EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)を用いて精製した。12時間後、各培養培地を組換えIL-18 (100 ng/mL:本研究室で自作したもの(引用文献#15)) または LPS O127 ($1.0 \mu\text{g/mL}$, SIGM

A)を含有する新鮮な培地と交換し、6時間インキュベートした。次に、細胞をPBSで洗浄し、受動的溶菌バッファー(Promega)を用いて集菌した。Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて、NF- κ Bレポーター遺伝子活性化アッセイを実施した。そして、TECAN INFINIT 200マルチウェルプレートリーダーを用いて、これらのルシフェラーゼ活性を測定した。NF- κ B依存性ホタル・ルシフェラーゼ活性を細胞数で補正するためのコントロールの活性(ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性)に対して規準化した。コントロール、野生型およびMyD88の全て突然変異体について、これらの各アッセイを4回以上実施した。このレポーターアッセイにおいて観察されたドミナントネガティブ抑制作用の喪失は、アラニンまたはヒスチジン置換によって引き起こされたタンパク質の不安定性によるものでも起こりうる。これらの可能性を除外するため、本発明者らは次に突然変異体タンパク質の発現レベルをチェックした。同量のタンパク質を含む細胞抽出物をLowry法によってチェックし、そしてMyD88 TIRタンパク質の全突然変異体は培養細胞中におけるそれらの発現レベルを、抗myc抗体 (Invitrogen)を用いたウエスタンブロッティングによって確認した。ECL-plus (Amersham)および発光撮影機AE6970CP (ATTO)によって検出を実施した。mycタグを付加したMyD88タンパク質の定量には、濃度測定スキャニングを用いた。そして、細胞中で発現が乏しいものはこれらのアッセイから除外した。また、決定された構造情報から考えて側鎖がこのタンパク質表面に露出され得ないアミノ酸残基もこれらのアッセイから除外した。これらの実験に用いた全ての試薬およびサンプルは、Endospecy ES-24S(生化学工業)を用いてエンドトキシン汚染をチェックした。これらの実験に用いた全ての装置は、パイロジェンを含んでいなかった。

[0067] 統計学的分析

NF- κ Bレポーター遺伝子ルシフェラーゼアッセイにおける野生型と各突然変異体群との間の有意差は、ダネットの多重比較検定によって分析した。P<0.05で統計学的に有意と推定した。

[0068] アミノ酸配列分析

MyD88タンパク質の等電点(pI)は、MacVector ver. 9.0 (Accelrys)を用いて計算した。MacVectorに含まれているClustalW ver.1.4プログラムを用いて得た、MyD88、IL

-1受容体ファミリーおよびTLRファミリー間の配列アライメントを図1に示す。相同性および同一性スコアもまた、このプログラムを用いて計算した。

[0069] シクロヘキシミドを用いた、MyD88 TIRドメイン突然変異体のタンパク質発現および安定性の評価

トランスフェクションの1日前に、HEK293FT 細胞 1.0×10^5 個/mL の密度で6-ウェルプレートに播いた。1.0 μ g のpcDNA3.1+ コントロールベクターまたは 1.0 μ g のpcDNA3.1+ myc-MyD88 TIR ドメイン野生型または突然変異体を、Lipofectamine 2000を用いてトランスフェクションした。24時間後、各培養培地を25 μ mol/Lシクロヘキシミドを含有する新鮮な培地と交換し、37°Cで、5% CO₂の混合気下で、0または48時間インキュベートした(引用文献#16)。これらの細胞を、CytoBuster Protein Extraction Reagent (Novagen)を用いて溶解した。細胞抽出物の全タンパク質濃度をLowry法によって決定した。同量のタンパク質を含む細胞抽出物を、抗myc抗体 (Invitrogen)を用いたウエスタンブロッティングでチェックした。ECL-plus (Amersham) および 発光撮影機AE6970CP (ATTO)を用いて検出を実施し、Mycタグを付加したMyD88タンパク質の発現量を評価した。

[0070] 結果

溶液NMRを用いたMyD88 TIRドメインの構造決定

TIRドメイン間の配列保存は、3個の短いモチーフ(図1のBox1、2および3²⁹)に絞られ、そしてこれらのモチーフに焦点をあてた機能研究が各TIRドメインについて行われている(引用文献#10、11、17、18、19、20)。TIRドメインの構造的コアは、保存された(F/Y) DAアミノ酸モチーフから始まる(引用文献#19)。本研究においては、溶液NMRによる構造決定のために、ヒトMyD88の残基148-296からなる構築物が作製された。ヒトMyD88のTIRドメイン(残基157-296)の立体構造を図2に示す。最も低い全エネルギーを有する20個の構造の統計値を表1に要約する。上記20個の構造の主鎖重原子(N、C α およびC')の距離二乗平均根偏差値(rmsd)は0.45オングストロームである(残基157-185、188-194および 203-295を用いて重ね合わせた)。N末端の9個のアミノ酸(148-156)は、この領域における中程度～長距離範囲のNOESYクロスピークの欠失によって示される、ランダムコイル傾向を示した。よって、これらの残基は図から

除外した。2D ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルにおいて、G201を除くD195からC203までの残基についてアミドクロスピークが欠失しており、これはBB-ループと対応している(図1)。側鎖プロトンの一部が観察され、このBB-ループ領域に帰属されたが、NOESYクロスピークの数是不十分で、この領域については構造収束(convergence)が比較的悪かった。 ^1H - ^{15}N ヘテロ核NOE実験は、これらの欠失した残基G201、V204およびS206の近くに存在する残基のアミド基が比較的低いNOE値を示す(それぞれ0.67、0.55および0.67)ことを示した。これは、BB-ループがおそらく堅固なコンホメーションをとっておらず、溶液状態では緩やかに構造が保たれていることを意味する(図2A)。

[0071] MyD88 TIRドメインの構造説明および他のTIRとの比較

MyD88 TIR(157-296)の構造は、4本の α ヘリックス(α A- α C、および α E)に囲まれた、中心部に位置する5本のストランドからなるパラレル β シート(β A- β E)を構成する。予測されたように、全体的な折りたたみは、以前に決定されたTIRドメインの結晶構造と本質的に同一であった(PDBコード: 1FYV, 1FYW および 1T3G) (図 2B)。MyD88 TIRは、他のTIRタンパク質と比較して、TLR2 TIRのアミノ酸配列と最も相同性が高い(MyD88 TIRおよびTLR2 TIR間の同一性スコアは22%で、相同性スコアは48%である)。図2Cおよび2Dは、MyD88 TIRおよびTLR2 TIRを重ね合わせて表したものである(PDBコード: 1FYW)。 β シートコアの構造は、相互に類似している(この部分の主鎖N、C α およびC'に対するrmsd値は0.90オングストロームである)が、いくつかの領域では注目すべき非類似性が示された。BB-ループ(MyD88 TIRのSer194-Cys203)およびそれに続く α Bまでの残基には、大きな構造的不一致が存在する(図2D)。MyD88およびTLR2の両方においてBB-ループは溶液に露出されているが、ループが向いている方向は大きく異なる。これは、MyD88の α Bに先行する残基(MyD88のTrp205-Ser209)の構造的相違によって主として引き起こされる。これらの残基は、MyD88において伸長された β ストランド様構造をとっているが、他方TLR2において対応する残基は α ヘリックス(α B)内に存在し、MyD88の α Bを有意に短くしている。この β ストランドは、BB-ループをTLR2 TIRにおいて見られる方向とは全く異なる方向へ向けることになる。

[0072] この伸長された β ストランドは、 ^{15}N edited 3D NOESYスペクトルにおけるクロスピーク

のパターンによって十分支持される。この3D NOSEYスペクトルにおいて、一連のNOEクロスピークの強度($H\alpha(i)$ から $HN(i+1)$)は、残基内強度($H\alpha(i)$ から $HN(i)$)よりも有意に強かった。 $C\alpha$ および $C\beta$ のケミカルシフト値もまた、この二次構造を支持した。

[0073] MyD88はTLR2に存在する α Dヘリックスの代わりに長いループ(DD-DEロングループ)を有する。配列アライメントにおいて、 α Dが存在する領域に多数のギャップが見出されたため、 α Dの欠失は予測された。(図1)。しかし、この長いループには、 α ヘリックスに類似した短いヘリックスコイルコンホメーション(P265-I271)が存在する。

[0074] TIRドメインの表面特性の比較: MyD88 TIRおよび他のTIR

図3は、TIRドメインの表面静電ポテンシャルを示す。MyD88 TIRの全体的な蛋白構造の折りたたみは他のTLR TIRドメインに類似しているにもかかわらず、表面静電ポテンシャルには顕著な相違が見られる。特に、MyD88 TIRのBox3には大きな陽性ポテンシャル領域が認められる。実際、MyD88 (148-296) TIRドメインの計算された等電点(pI)は9.25 (全長MyD88では5.79)なので、このドメイン自体が陽性に荷電されている。MyD88は細胞の細胞質に存在する(引用文献#21)。MyD88 TIRの大きい陽性ポテンシャル領域は、このドメインが陰性に荷電された細胞膜を標的とするのを容易にするであろう。それは、シグナルリガンドがIL-1R/IL-18R/TLR等の膜受容体と結合したときに、このドメインがそれら膜受容体と結合するのを促進するであろう。Box3とは対照的に、BB-ループを含むBox2領域は、狭い陰性ポテンシャルに覆われる領域を形成している。

[0075] NF- κ B活性化アッセイ

MyD88 TIRの機能に関する洞察を得るため、本発明者らはIL-18およびLPSで刺激した後、NF- κ Bレポーター遺伝子アッセイを実施した。本発明者らは、以前に刊行されたデータに基づいて、myc-MyD88 TIRに単一アミノ酸置換を組織的に導入し、IL-18またはLPS刺激後のルシフェラーゼ活性を定量した。NF- κ B活性は、細胞中のMyD88の機能に対する突然変異の作用を反映するであろう。選択された25個の荷電極性アミノ酸と3個の疎水性アミノ酸からなるアラニン置換突然変異体を評価した(表2)。IL-18を用いたNF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を図4Aに示す。この図に示すように、ドミナントネガティブ遺伝子をトランスフェクトしなかった対照細

胞では、IL-18刺激の結果、ルシフェラーゼ活性が約3倍に増大した。対照的に、野生型myc-MyD88 TIRを細胞中で過剰発現させると、NF- κ B活性の重大な増加は見られず、これは当該タンパク質のドミナントネガティブ阻害作用を示している。いくつかの突然変異体(例えば、R196A, K238A, R288A)は、NF- κ B活性の重大な増加を示した。これは、ドミナントネガティブ阻害作用の喪失を意味し、突然変異させた残基のタンパク質-タンパク質相互作用における重要性を示している。突然変異体のドミナントネガティブ阻害作用は、統計学的分析により野生型と各変異体とを比較してから有意と判定された。MyD88は一般に、IL-1R/IL-18R/TLRシグナル伝達およびさらに多種類の分子(ただし、MyD88に結合可能なIRFファミリー等のTIRドメイン含有受容体を除く)にリクルートされる(引用文献#22、23、24)。

[0076] ひとつの分子が複数の蛋白と相互作用可能であることおよびそのようなシグナル多様性の土台をなす機構は、非常に興味深い。IL-18の場合と同様に、LPS/TLR4シグナル伝達もまたMyD88によって媒介され、NF- κ B活性化をもたらす。それゆえ、本発明者らのレポーターアッセイ系をTLR4シグナル伝達の研究に適用することができる。レポーターアッセイの結果を図4Bに示す。ドミナントネガティブ阻害作用は、IL-18で刺激した場合もLPSで刺激した場合も、突然変異体R196A、D197A (BB-ループの突然変異)、R217A (BC-ループ)および K282A、R288A (α E)において共通して消失した。さらに、IL-18に特異的なドミナントネガティブ阻害作用の消失は、K214A (BC-ループ)、K238A (α C')および R269A (DD-DE 長ループ)に観察された。これらのレポーターアッセイの結果およびTIRタンパク質の機能に関する以前のレポートを以下に要約する。

[0077] Box1: 保存された Box1 領域は、IL-18 および TLR4 シグナル伝達の両方において重要な役割を果たすものではない。なぜなら、レポーターアッセイにおいて何ら重要な変化が検出されなかったからである。最近、IRF-1/4/5とのある相互作用が、この領域を含むMyD88の一部について報告された(引用文献#22、23、24)。この領域はNF- κ Bではなく、インターフェロン産生のシグナル伝達系に寄与しているのかもしれない。また、Box1領域に隣接して、R217Aは顕著なドミナントネガティブ阻害作用の喪失を示し、機能的に重要である。

- [0078] Box2 (BB-ループおよびPro200): 初期の研究は、TLRのTIRドメインのBB-ループに存在する保存されたプロリンの重要性を示した(引用文献#12、18)。Li らもまた、MyD88のBox2における突然変異が、TIRドメインを介する同型なMyD88オリゴマー化を阻止したと報告している(引用文献#10)。BB-ループの重要性は、本発明者らのレポーターアッセイで確認された。なぜなら、R196AおよびD197A において重大な効果が観察されたからである(図5A)。また、この領域がTIRドメイン蛋白の機能に重要であることを示唆する情報として、TLR2のArg677 (MyD88のR196に対応する)は、ハンセン病患者においてTrpに変わることが見い出されたからである(引用文献#13)。MyD88 TIRのBB-ループ領域の構造は、TLR1およびTLR2のTIRドメインの結晶構造に見られるものとは全く異なっていた(図2Cおよび2D)。NMR実験は、MyD88 TIRドメインのBB-ループにおけるフレキシビリティの存在を提案した。このことが当該ドメインに機能的多様性をもたらすのかもしれない。なぜなら、フレキシブルな構造は、相互作用のパートナーに比較的広い特異性を許すからである。実際、MyD88 TIRは多数の異なるTIRドメインと相互作用することが知られている。P200H突然変異の効果もまた、われわれの研究で試験した。興味深いことに、この突然変異はIL-18シグナル伝達に特異的に影響するが(R.L.U. 値: mean $\pm$ s.d., 1.79 ± 0.21)、TLR4シグナル伝達には影響しない(R.L.U. 値: mean $\pm$ s.d., 1.24 ± 0.26)。このことは、この保存されたプロリンが、TIRタンパク質間の相互作用に必要ではあるが十分ではないことを意味する。Brown および Dunneは、このプロリンがTIR相互作用に常に必須な訳ではないと述べた(引用文献#17、25)。
- [0079] α B and BC loop: この領域に存在する数個のアミノ酸の重要性もまたRonni et al. (引用文献#20)によってTLR4 TIRについて提案されている。この領域では、MyD88の詳細な構造は、他のTIR構造と比較して特徴的である。 α Bヘリックスは他のTIR構造と比較して短く(構造説明の項を参照)、そしてこのヘリックスに続くBC-ループはより長い。本発明者らはBC-ループ領域で、K214A、R215A および R217Aについてアラニン置換変異体を作製した。この領域で、K214AはIL-18シグナル伝達に特異的な効果を示した。R217Aは、上記刺激の両方に対して重大な効果を示した。古典的には、Box1、Box2およびBox3と呼ばれるTIRドメインの間で保存されたアミノ酸配列は、

TIRドメインの機能的に重要な部位であると言われていた。R217は、Box1のF/YDAモチーフを構成するD162の隣接アミノ酸であるが、本発明者らはこのBC-ループ領域が、MyD88 TIRの新しい相互作用部位の1つであることを決定した。さらに、この領域におけるこれらのアミノ酸の選択性は、MyD88と直接相互作用する膜受容体におけるアミノ酸残基の違いに由来するかもしれない。

- [0080] $\alpha C'$: TLR2のBB-ループ、 $\alpha C'$ および DD-ループに突然変異を数個導入すると、ペプチドグリカンによって刺激されたNF- κ B活性が失われると報告されている(引用文献#26)。さらに、ヒトIL-1RAPL のTIRドメインの二量体構造において、TLR2のCys713に対応するSer488は、二量体界面の中心に位置する他の一量体の等価なSer488'と堅固な水素結合を形成する(引用文献#27)。本発明者らの研究において、 $\alpha C'$ におけるK238 から Alaへの置換の効果は、IL-18シグナル伝達に特異的な効果を示し、LPSシグナル伝達には影響しなかった(図5)。ただし、K231A、E232Aおよび D234Aは NF- κ B 活性の重大な効果を示すことが出来なかった。
- [0081] αD : 他のTIRドメインの αD に対応する α ヘリックスは、MyD88 TIRには認められなかった。このヘリックスの欠如は、TIRドメインの配列アライメント(図1)によれば驚くにあたらない。このアライメントでは、 βD と βE 間の領域の多数のギャップが見い出される。DD-DEロングループのArg269をAlaに置換した場合、ドミナントネガティブ作用の喪失がIL-18刺激に特異的に観察されたが、LPS刺激に対しては観察されなかった(図5B)。TLR2において同じ部分に相当するArgがGlnに置換された突然変異は、ブドウ球菌感染に対する免疫不全を引き起こすことが報告されている(引用文献#28)。
- [0082] Box3 (αE helix): αE もまた、TIRドメインの間でアダプター-アダプターおよび受容体-受容体オリゴマー化を媒介することが報告されている(引用文献#10, 11)。 αE に含まれる極性残基をアラニンに置換させた場合(K282A および R288A)、本発明者らの研究ではIL-18刺激およびLPS刺激の両方とも重大な効果をきたした(図5)。F285およびW286はTIRドメインの間で保存されており、FWモチーフと呼ばれている。このFWモチーフにおけるアラニン置換は二量体形成にとって決定的であると以前に報告されていることは注目に値する。しかし、F285Aはレポーターアッセイにおいて、ドミナントネガティブ作用に対して何ら影響を示さなかった(R.L.U. 値: mean $\pm$ s.d., IL-18:

1.04±0.10, LPS: 1.17±0.13)。そして、本発明者らはW286について全く情報を得ることができなかった。なぜなら、W286A変異体タンパクは細胞中で非常に不安定だったからである。本発明者らは、シクロヘキシミド法を用いて、W286Aタンパク質発現レベルおよび安定性を確認した(図6)。

[0083] 考察

TLR TIRおよびMyD88 TIRの構造

TIRドメインは、典型的には135～160アミノ酸によって構成される。TIRドメイン間の配列保存は一般に20から30%の間であり、そして保存された残基のほとんどは、5本のストランドからなるパラレルβシートによって構成される疎水性コア内に存在する。その長さの違い、およびTIRドメイン間のアミノ酸配列におけるかなりの変化は、このドメインの構造的および機能的多様性を示唆する。現在、TIRドメインについて3つの構造(TLR1, TLR2 および IL-1RAPL)が入手可能であるが、これらはすべて受容体のものである。本研究は、細胞アダプタータンパク質由来のTIRドメインの最初の構造決定である。MyD88 TIRは、受容体TIRに対しかなりの類似性を示す(図2Cおよび2D)。しかし、「結果」の項に記述したように、構造には相違点が認められる。BB-ループに認められる構造上の不一致は、顕著でかつ興味深い(図2D)。これはTIRドメインの機能的多様性を意味する。なぜなら、多数の研究がこれらの領域(Box2に対応する(引用文献#10、11、18、19、20))の機能的重要性を提案しているからである。他の構造不一致領域(αB, BC-ループおよび DD-DE長ループ)もまた、機能的に重要である。さらに、MyD88 TIRの表面における大きい陽性荷電領域の存在は興味をそそるものであり、これはMyD88の機能と関連しているのかもしれない。

[0084] MyD88のマルチ相互作用部位およびMyD88 TIR: IL-18 vs LPS/TLR4 MyD88に関して示された受容体特異的シグナル伝達

MyD88は、細胞中のIL-1R/IL-18R/TLR媒介シグナル伝達経路に通常使用されている。しかし、細胞の応答はどの受容体が刺激されたかによって異なる。したがって、MyD88のもとで細胞の運命を分ける、ある種の作用機構が存在するはずである。IL-1R/IL-18R/TLR媒介シグナル伝達におけるMyD88のシグナル伝達機構を解明する目的で、本発明者らは培養細胞を用いてMyD88の機能分析を実施した。その結果

に基づいて、本発明者らはIL-18刺激およびLPS刺激の両方にとって重要な数個の残基を同定することができた。図5においては、MyD88 TIR構造の表面にレポーターアッセイの結果がマッピングされている。この図には荷電残基のみをマッピングしたことに注意されたい。緑色に着色したアミノ酸残基は、IL-18およびLPSシグナル伝達に重要であると判断された。茶色に着色したアミノ酸残基は、活性に何ら影響を及ぼさない残基を示す。3つの相互作用部位(保存されたBox2、Box3およびBC-ループの終末)は、IL-18およびLPS/TLR4経路の両方で同定された。さらに、IL-18シグナル伝達において1つの特異的な表面が同定された。BC-ループの一部、 α C' ヘリックスおよびDD-DEロングループは、MyD88 TIRドメインの分子表面でごく近位に存在した。TLR2 TIRに関する別の研究もまた、C713S、L717E (これらは α C' に存在する) および R748E、R748S (これらはDDループに存在する) がNF- κ B 活性をダウンレギュレーションすることを示した。その著者らは、このダウンレギュレーションは変異導入によって引き起こされるこの領域でのTLR2ホモ二量体化の抑制によるものであると提案した(引用文献#26)。本発明者らのレポーターアッセイは、これらの報告とよく一致した。 α C' 近傍に群がる3個の塩基性残基(Lys214, Lys238, および Arg269) は、IL-18シグナルに対して重大な効果を示した。しかし、これらの残基はLPS-TLR4シグナル伝達には関与しない。本発明者らは、IL-18またはLPSに対する特定の細胞応答は、MyD88 TIRドメインの異なる相互作用表面と関連しているらしいと推定する。MyD88下のシグナル多様性の理由の一部は、この表面パッチに帰するかもしれない。

[0085] 本研究において、本発明者らは溶液NMR分光法を用いて、ヒトMyD88 TIRドメインの溶液構造を決定した。これは、細胞アダプター分子のTIRドメインとして初めて明らかにされた構造である。本発明者らはまた、培養細胞系を用いてMyD88 TIRドメインの機能アッセイを実施した。これらのデータは、このドメインの保存されたBox1、Box2およびBox3領域は、IL-18およびLPS経路の両方にとって重要な相互作用部位であることを明らかにするものである。さらに、 α C' およびその近傍に群がる3個の塩基性残基からなる1つの表面は、もっぱらIL-18シグナル伝達のために機能しており、TLR4シグナル伝達のためには機能しない。最近、IL-18の広範な免疫調節機能(IFN- γ の誘導およびTh1分化の増強のみならず、IgE抗体の誘導およびアレルギー性反応

との関連を含む(引用文献#29、30、31、32、33))が報告されている。特に興味深いのは、IL-18シグナル伝達を正確にコントロールすることである。なぜなら、それは慢性炎症性疾患およびアレルギー性疾患の治療に寄与すると考えられるからである。本研究によりMyD88について得られた構造情報および機能情報は、受容体とMyD88との相互作用を調節することができる、免疫不全疾患のための薬剤の開発に寄与する。種々のTIRドメインの複合体の構造決定に関して今後さらなる研究が期待される。さらに、MyD88 TIRドメインと他の分子(IRF-1、IRF-4、IRF-5 および IFN- γ R1)との相互作用が最近報告されている(引用文献#22、23、24、34)。これらの相互作用の解明もまた将来期待されている。

[0086] [表1]

表1 MyD88 の TIR ドメインの NMR 及び統計的精密化パラメーター

タンパク質	
NMR 距離及び二面角制限	
距離制限	
全 NOE	3119
残基内	773
残基間	
連鎖(i-j =1)	937
中位(i-j <4)	663
遠位(i-j >5)	746
水素結合	66
全二面角制限	172
phi	84
psi	88
構造統計	
バイオレーション(平均及び s.d.)	
距離制限値(Å)	0.0109 ± 0.0002
二面角制限値(°)	0.1089 ± 0.0162
最大二面角制限値(°)	< 3.0
最大距離制限値(Å)	< 0.3
理想的ジオメトリーからの逸脱	
結合長(Å)	0.0018 ± 0.00004
結合角(°)	0.3436 ± 0.0039
不適切角(°)	0.2116 ± 0.0055
平均構造からの平均 r.m.s.d.** (Å)	
残基 157-296	
重原子	1.34
主鎖	0.71
残基 157-185, 188-194, 203-295	
重原子	1.02
主鎖	0.45

**平均 r.m.s.d. は、平均構造と 20 個の精密化構造の逸脱度合いを計算したもの。

[表2]

表2 MyD88 TIR ドメイン内のアミノ酸置換を行った28種類のアミノ酸一覧		
変異導入残基	三次元構造上の配置	
E159A/R160A	deathドメインとTIRドメインの間のリンカー領域のC末端	
R180A	α Aヘリックス	
R188A	ABループ	
R196A/D197A及びP200H	ボックス2 (BBループ)	
K214A/R215A/R217A	MyD88構造とTLR2結晶構造との主要相違部位	
R218A	BCループ(R217はボックス1モチーフのDI62に構造上非常に近い)	
D226A	β Cストランド	
K231A/E232A/D234A/K238A	α Cヘリックス	
H248A/K250A/R251A	α C'ヘリックス	
K261A/K262A/E263A/R269A	TLR2 C713SのTIRドメイン及びIL-1RAPL ホモ二量体形成部位	
K282A/R288A/K291A及びF285A/W286A	CDループ	
	DD-DE長ループ	
	MyD88構造とTLR2結晶構造との主要相違部位	
	ボックス3 (α E 及び α E'ヘリックス)	

[0087] [引用文献]

1. Golovanov, A. P., Hautbergue, G. M., Wilson, S. A. & Lian, L. Y. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. J Am Chem Soc 126,

8933-9 (2004).

2. Delaglio, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6, 277-93 (1995).
3. Goddard, T. D. & Kneller, D. G. (University of California, San Francisco, 1999).
4. Farrow, N.A. et al. Backbone Dynamics of a Free and a Phosphopeptide-Complexed Src Homology-2 Domain Studied by N-15 Nmr Relaxation. *Biochemistry* 33, 5984-6003 (1994).
5. Guntert, P. Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol* 278, 353-78 (2004).
6. Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13, 289-302 (1999).
7. Brunger, A. T. et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-21 (1998).
8. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular Nmr* 8, 477-486 (1996).
9. Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics* 14, 51-& (1996).
10. Li, C., Zienkiewicz, J. & Hawiger, J. Interactive sites in the MyD88 Toll/inte rleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling path way. *J Biol Chem* 280, 26152-9 (2005).
11. Jiang, Z. et al. Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by g erm-line mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10961-6 (2006).
12. Poltorak, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr

mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085–8 (1998).

13. Kang, T. J. & Chae, G. T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31, 53–8 (2001).

14. Adachi, O. et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143–50 (1998).

15. Kato, Z. et al. The structure and binding mode of interleukin-18. *Nat Struct Biol* 10, 966–71 (2003).

16. Fukao, T. et al. ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 94, 1998–2006 (1999).

17. Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A. & Gay, N. J. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* 278, 41443–51 (2003).

18. Xu, Y. et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408, 111–5 (2000).

19. Slack, J. L. et al. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 4670–8 (2000).

20. Ronni, T. et al. Common interaction surfaces of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain stimulate multiple nuclear targets. *Mol Cell Biol* 23, 2543–55 (2003).

21. Nishiya, T., Kajita, E., Horinouchi, T., Nishimoto, A. & Miwa, S. Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Lett* (2007).

22. Negishi, H. et al. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15989–15994 (2005).

23. Takaoka, A. et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243–9 (2005).

24. Negishi, H. et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulator

- y factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15136-41 (2006).
25. Brown, V., Brown, R. A., Ozinsky, A., Hesselberth, J. R. & Fields, S. Binding specificity of Toll-like receptor cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 36, 742-53 (2006).
 26. Tao, X., Xu, Y., Zheng, Y., Beg, A. A. & Tong, L. An extensively associated dimer in the structure of the C713S mutant of the TIR domain of human TLR2. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 216-21 (2002).
 27. Khan, J. A., Brint, E. K., O'Neill, L. A. & Tong, L. Crystal structure of the Toll/interleukin-1 receptor domain of human IL-1RAPL. *J Biol Chem* 279, 31664-70 (2004).
 28. Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C. & Schwartz, D. A. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 68, 6398-401 (2000).
 29. Hidenori Ohnishi, Z. K., Mizuho Watanabe, Osamu Fukutomi, & Ryosuke Inoue, T. T. a. N. K. Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis. *Allergology International* 52, 123-130 (2003).
 30. Tanaka, H. et al. IL-18 might reflect disease activity in mild and moderate asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 107, 331-6 (2001).
 31. Konishi, H. et al. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11340-5 (2002).
 32. Pizarro, T. T. et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 162, 6829-35 (1999).
 33. Gracie, J. A. et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 104, 1393-401 (1999).
 34. Sun, D. & Ding, A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induc

ed cytokine and chemokine mRNA. Nat Immunol 7, 375-81 (2006).

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0088] 本発明は、抗エンドトキシンショック療法の一つとしての臨床応用の可能性がある。

また、本発明は、研究目的の遺伝子試薬として、Toll様受容体及びIL-1/18シグナル伝達の研究を行う上で有益である。

さらに、タンパク立体構造に基づいた変異導入部分の情報は、IL-18作用を特異的に修飾する創薬ターゲットとしても有用である。

配列表フリーテキスト

[0089] <配列番号1>

配列番号1は、ヒトMyD88 TIRドメインのヌクレオチド配列を示す。

<配列番号2>

配列番号2は、ヒトMyD88 TIRドメインのアミノ酸配列を示す。

<配列番号3>

配列番号3は、MyD88 TIR K238Aのヌクレオチド配列を示す。

<配列番号4>

配列番号4は、MyD88 TIR K238Aのアミノ酸配列を示す。

<配列番号5>

配列番号5は、MyD88 TIR R269Aのヌクレオチド配列を示す。

<配列番号6>

配列番号6は、MyD88 TIR R269Aのアミノ酸配列を示す。

<配列番号7>

配列番号7は、MyD88 TIR K214Aのヌクレオチド配列を示す。

<配列番号8>

配列番号8は、MyD88 TIR K214Aのアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

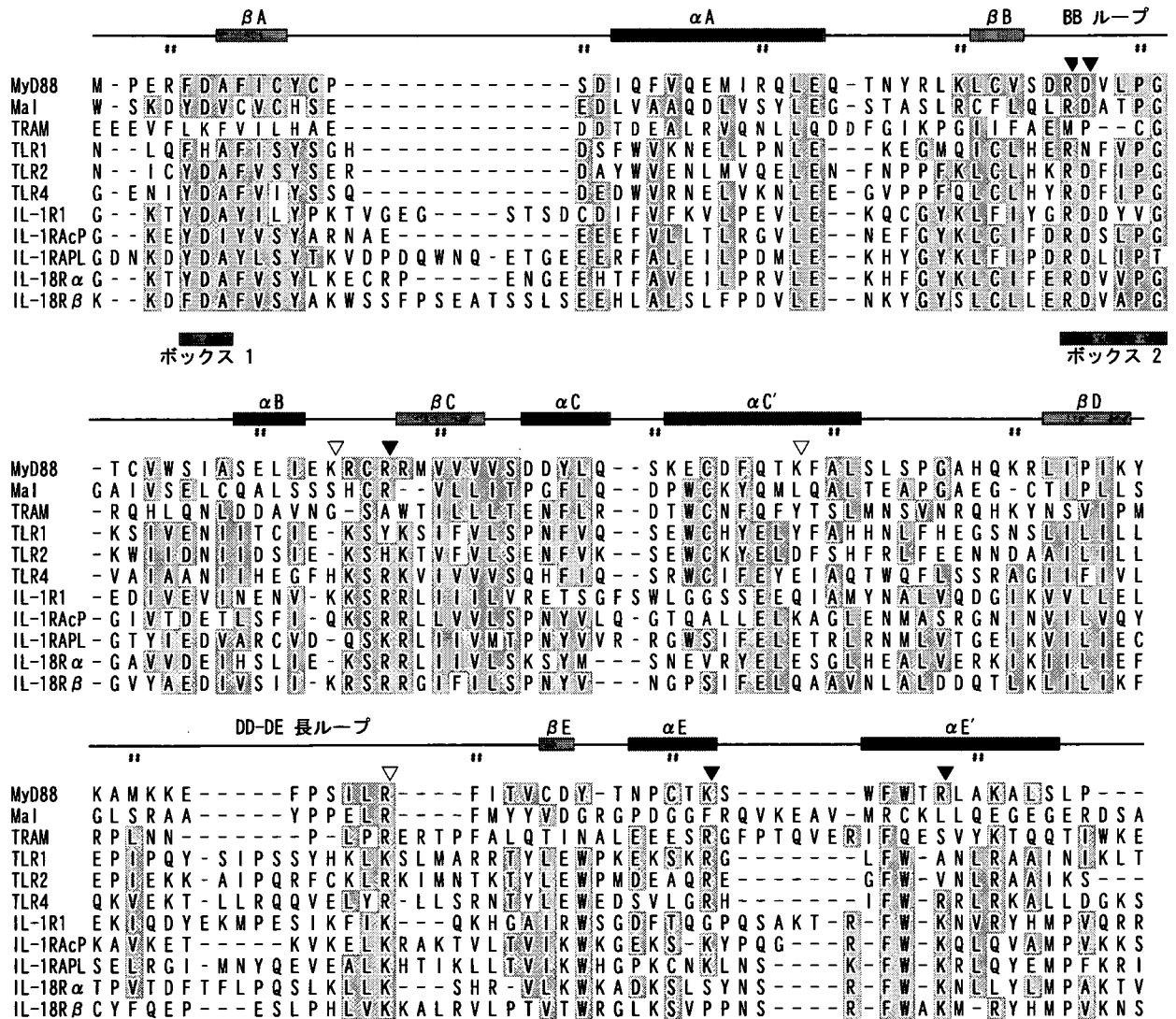
- [1] 以下の(a)、(b)若しくは(c)のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。
- (a)配列番号2のアミノ酸配列において、214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列からなるタンパク質
- (b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、214番目のアミノ酸、238番目のアミノ酸及び269番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質
- (c)配列番号3、5又は7のヌクレオチド配列からなるDNAに相補的なDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつリポ多糖刺激のシグナルは阻害するが、インターロイキン18刺激のシグナルは阻害しないタンパク質
- [2] (a)の他のアミノ酸がアラニンである請求項1記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。
- [3] ヒト由来の野生型MyD88 TIRタンパク質の変異体である請求項1又は2記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。
- [4] ヒト以外の動物由来の野生型MyD88 TIRタンパク質の変異体である請求項1又は2記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩。
- [5] 配列番号4又は6のアミノ酸配列からなる請求項1記載のMyD88 TIR変異体蛋白質又はその塩。
- [6] 請求項1記載のタンパク質をコードする単離されたDNA。
- [7] 請求項6記載のDNAを含有する組換えベクター。
- [8] 請求項7記載の組換えベクターを含む形質転換体。
- [9] 請求項6記載のDNAで形質転換した宿主を培養し、培養物からMyD88 TIR変異体タンパク質を採取することを含むMyD88 TIR変異体タンパク質の製造方法。
- [10] 請求項1記載のMyD88 TIR変異体タンパク質若しくはその塩又は請求項1記載のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAを有効成分として含有する医薬組成物。
- [11] 請求項1記載のMyD88 TIR変異体タンパク質をコードするDNAがベクターに組み込

まれている請求項10記載の医薬組成物。

- [12] 請求項1記載のMyD88 TIR変異体タンパク質又はその塩に対する抗体。
- [13] インターロイキン18作用を特異的に修飾する薬剤をスクリーニングする方法であって、配列番号2のアミノ酸配列からなるMyD88 TIRの214番目のリシン、238番目のリシン及び269番目のアルギニンからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸と前記薬剤の候補物質との結合の有無を調べることを含む前記方法。

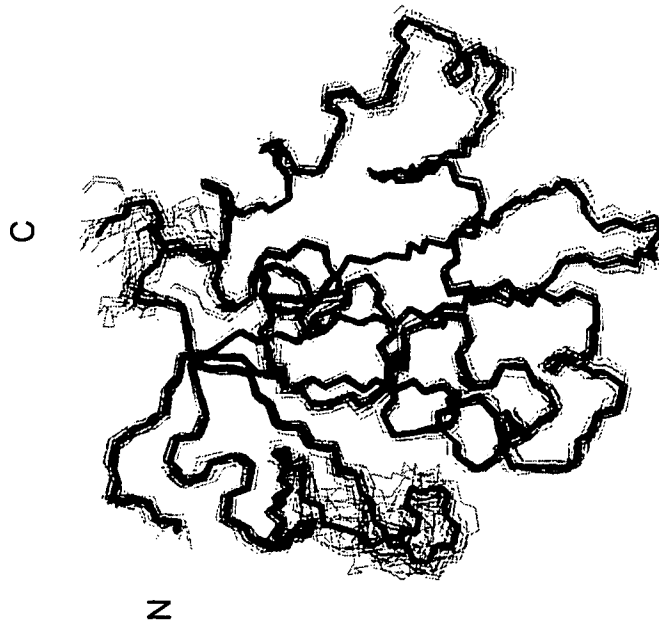
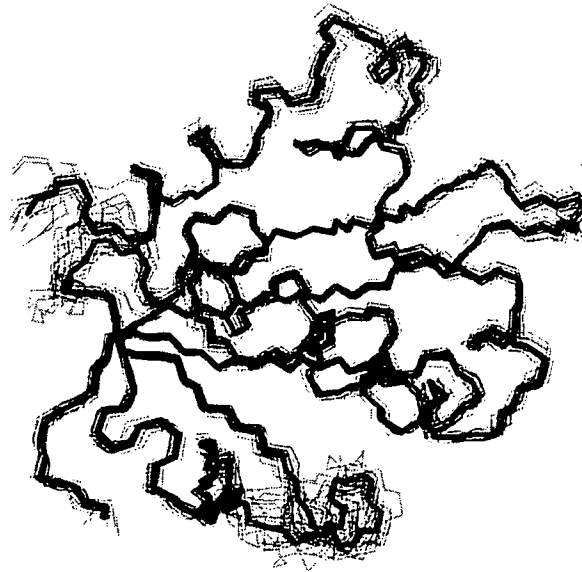
1/13

図1



ボックス 3

図2A



2B

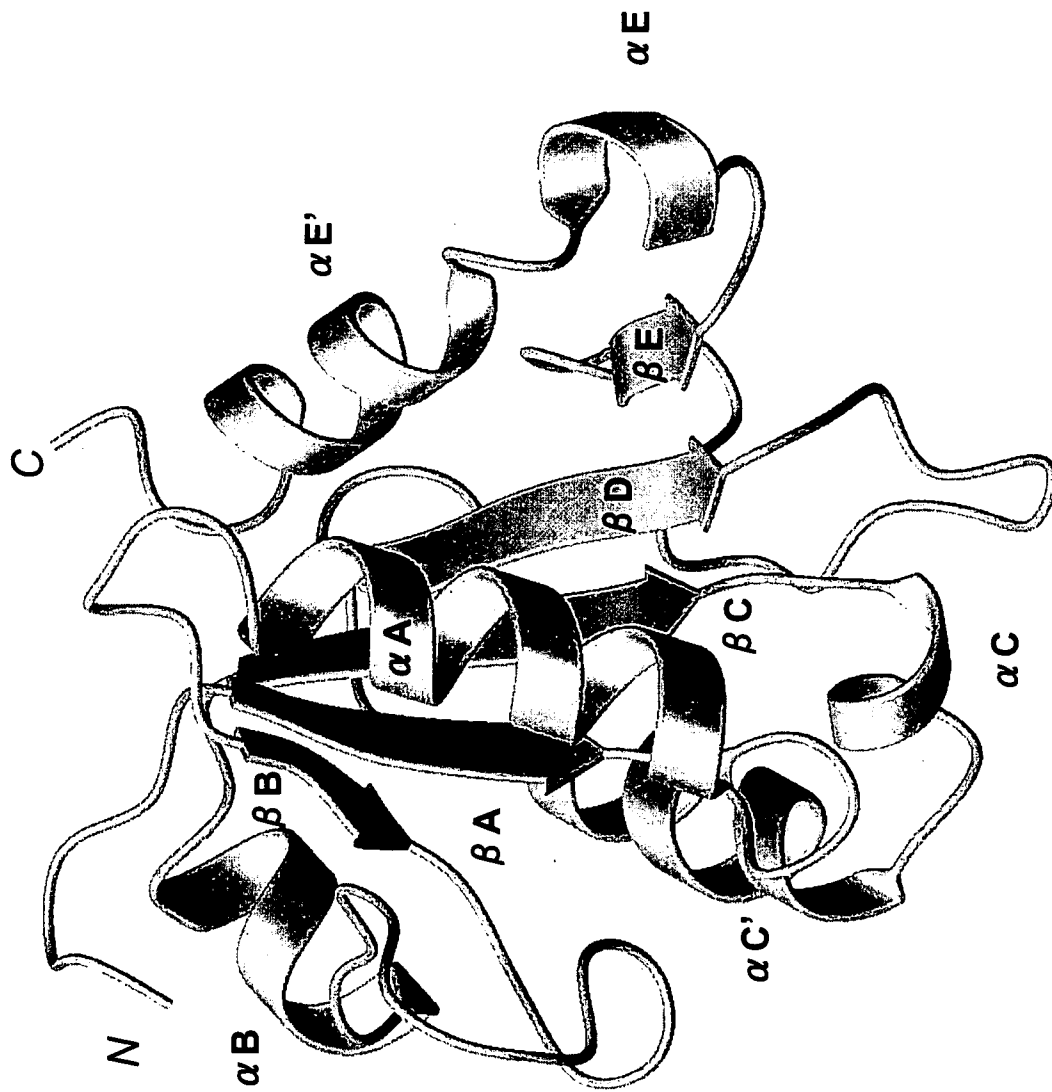


図2C

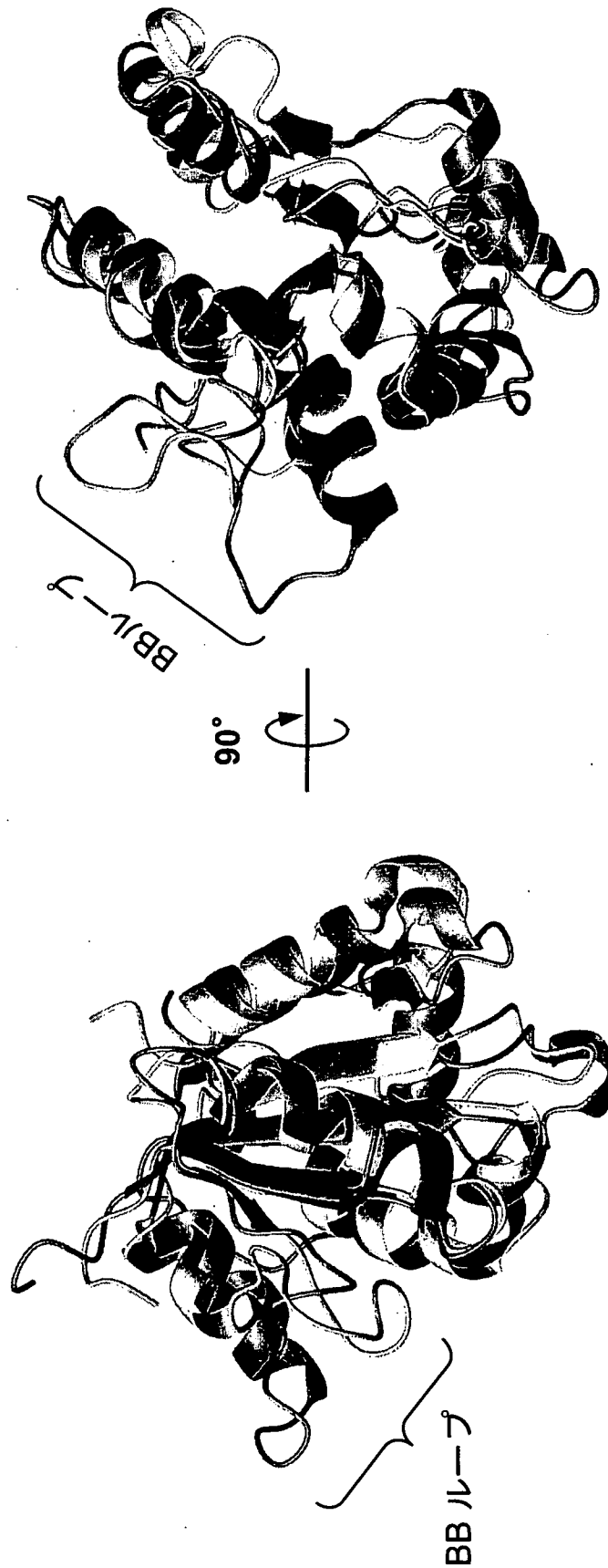


図2D

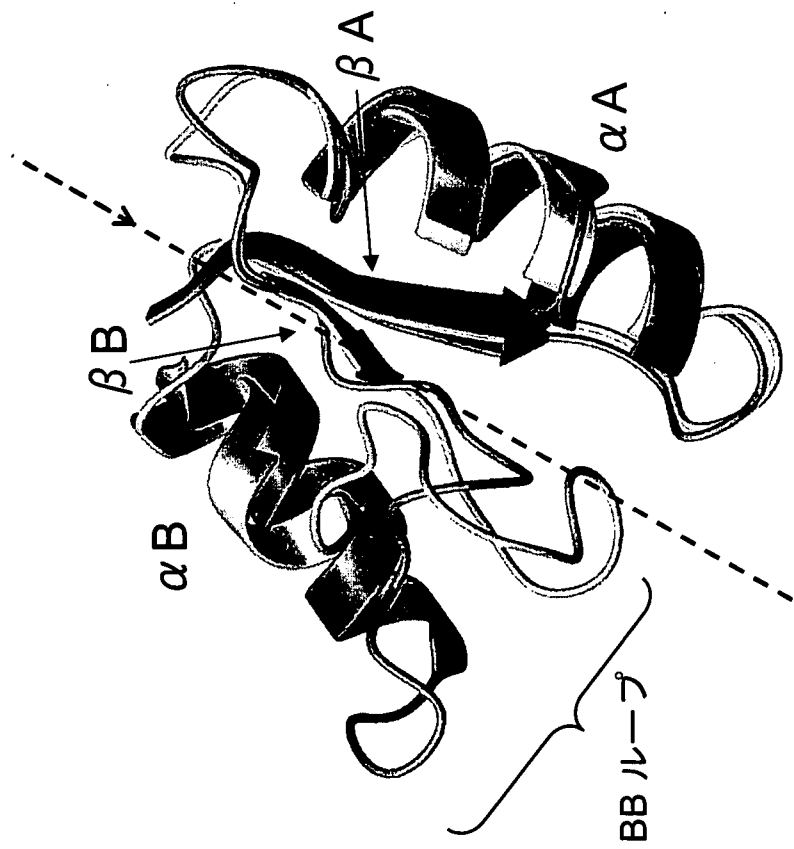
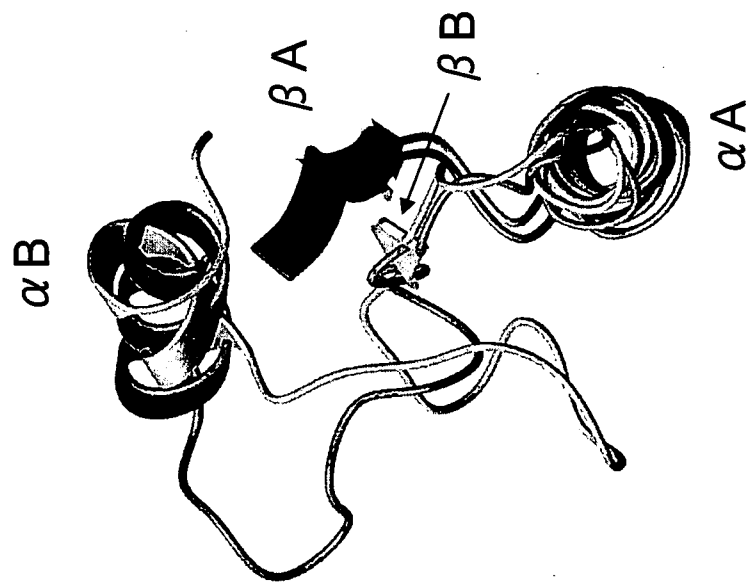


図3

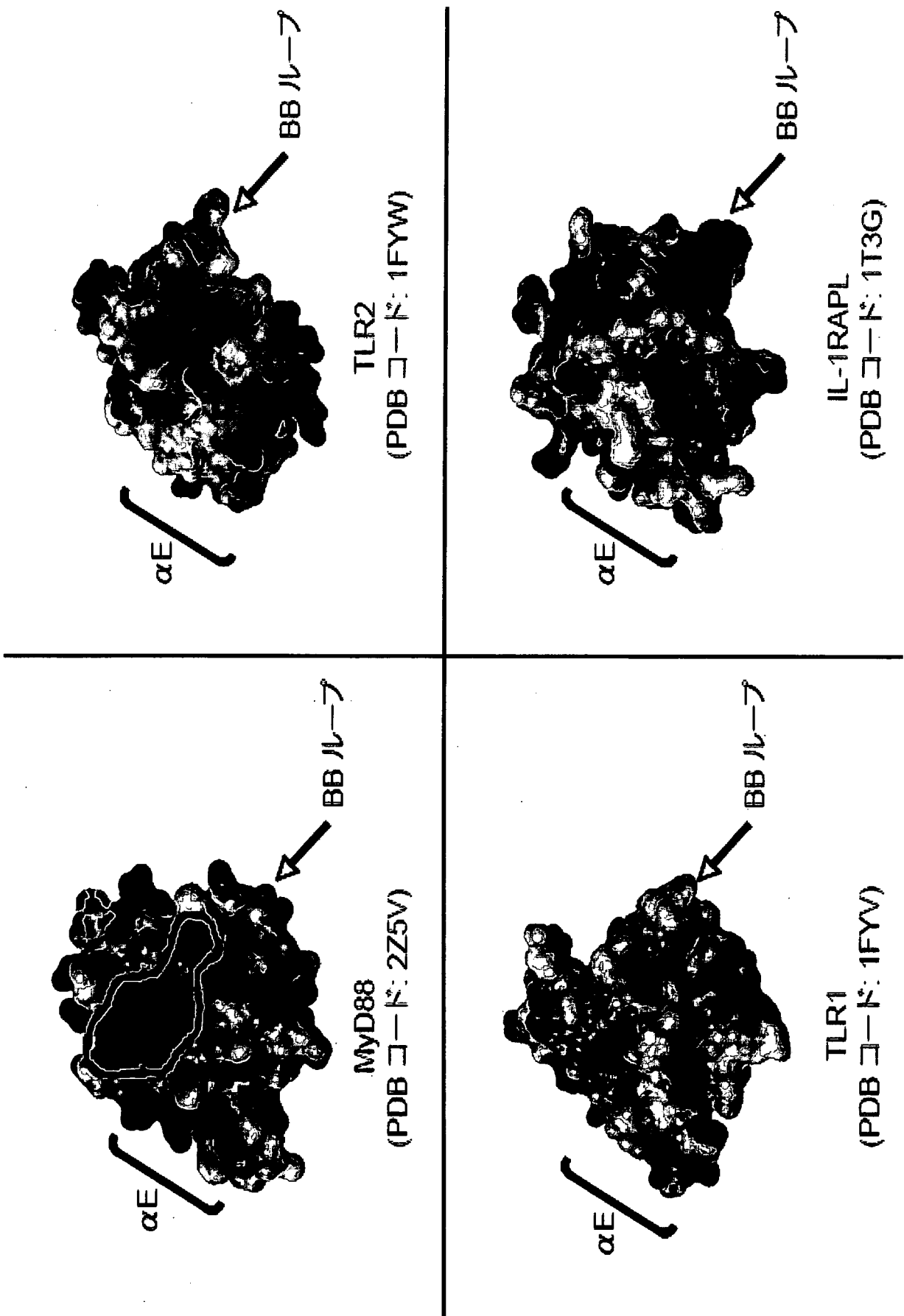


図4A

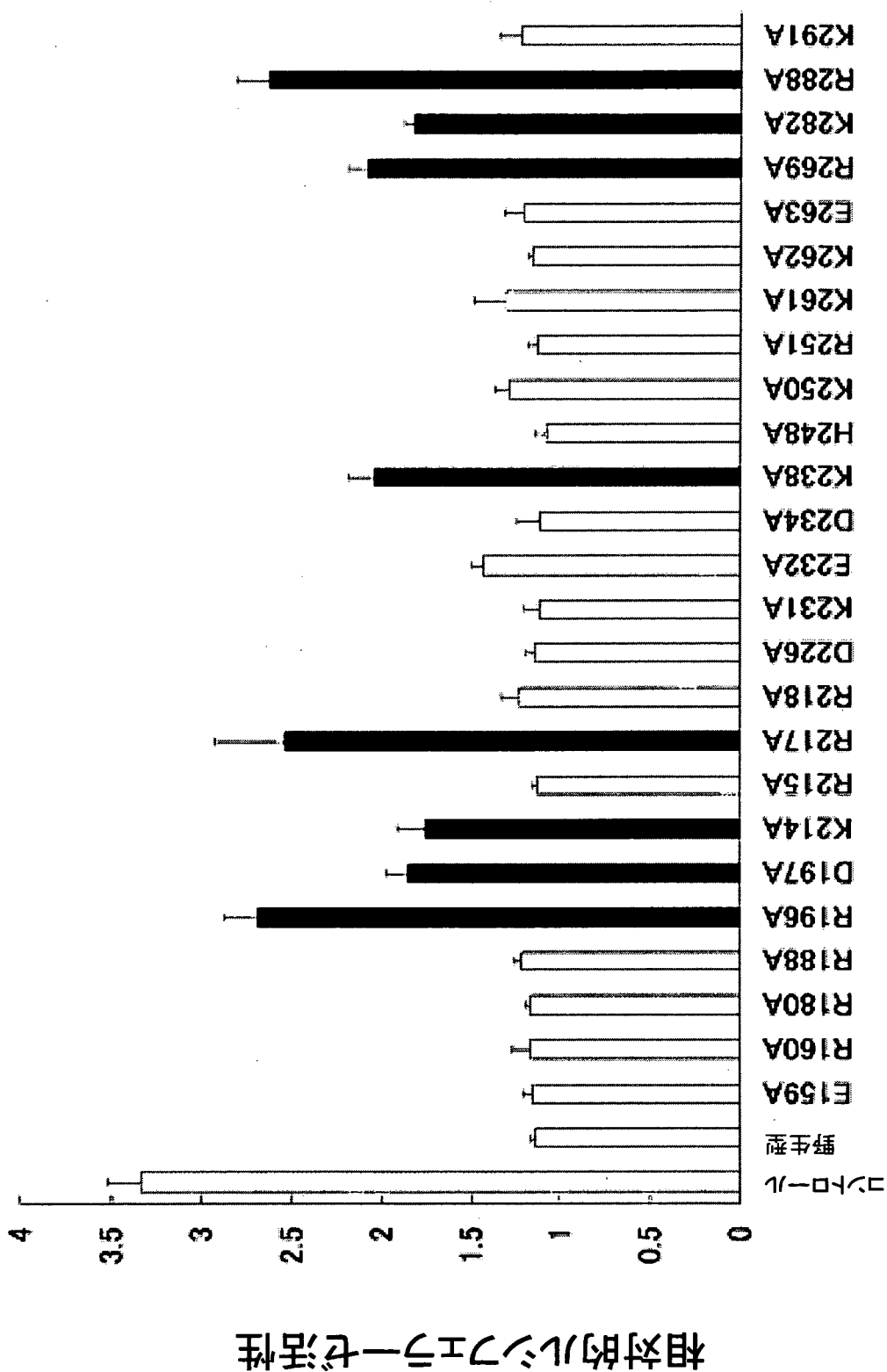


図4B

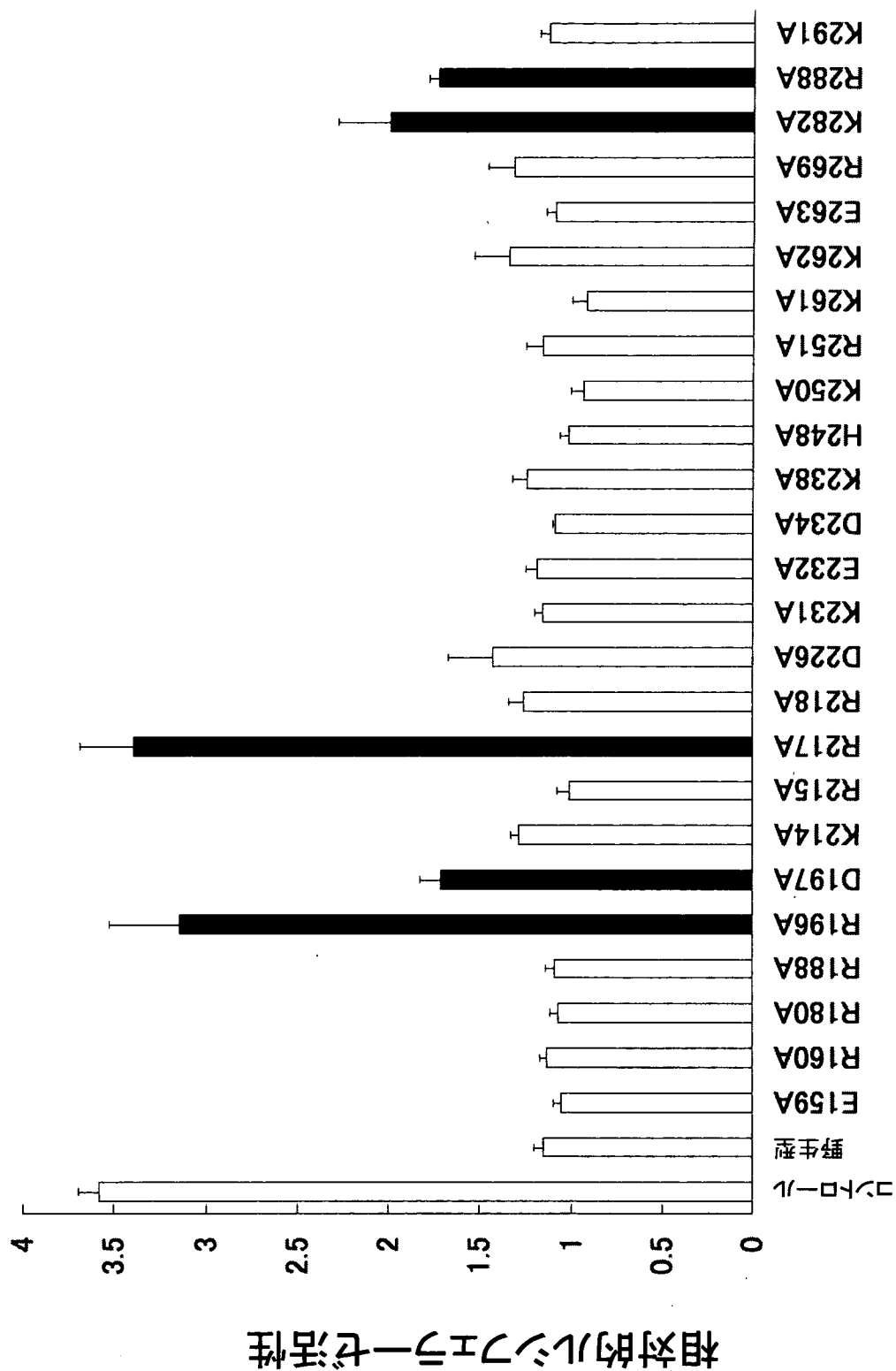


図5A

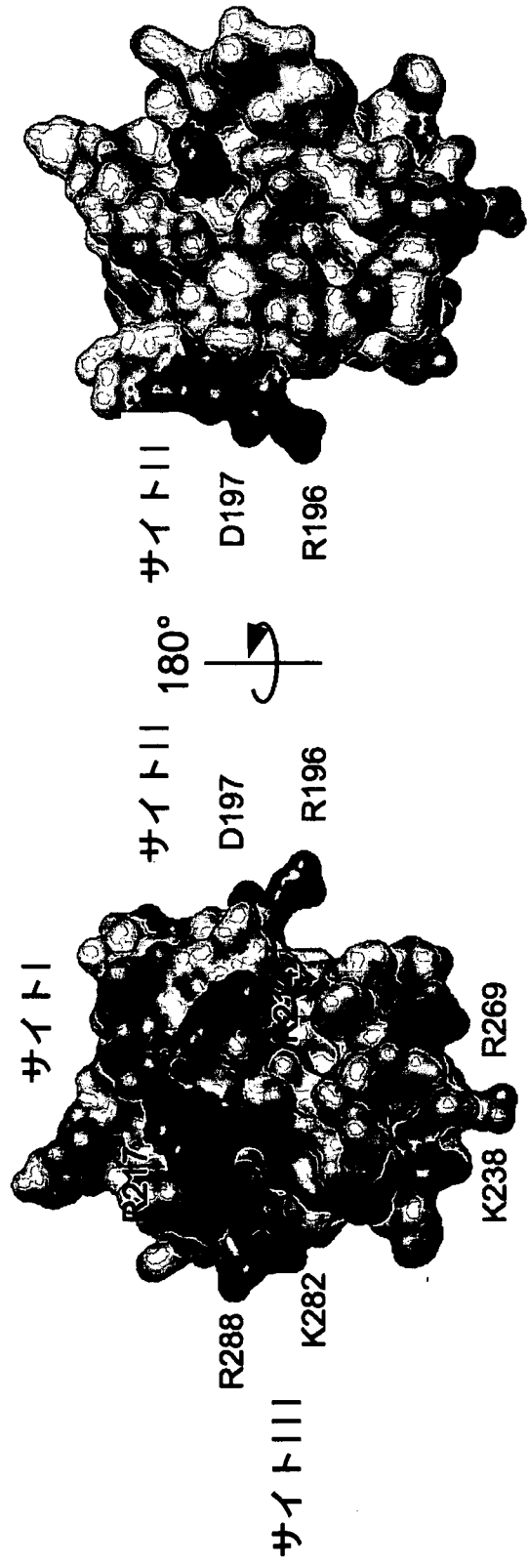


図5B

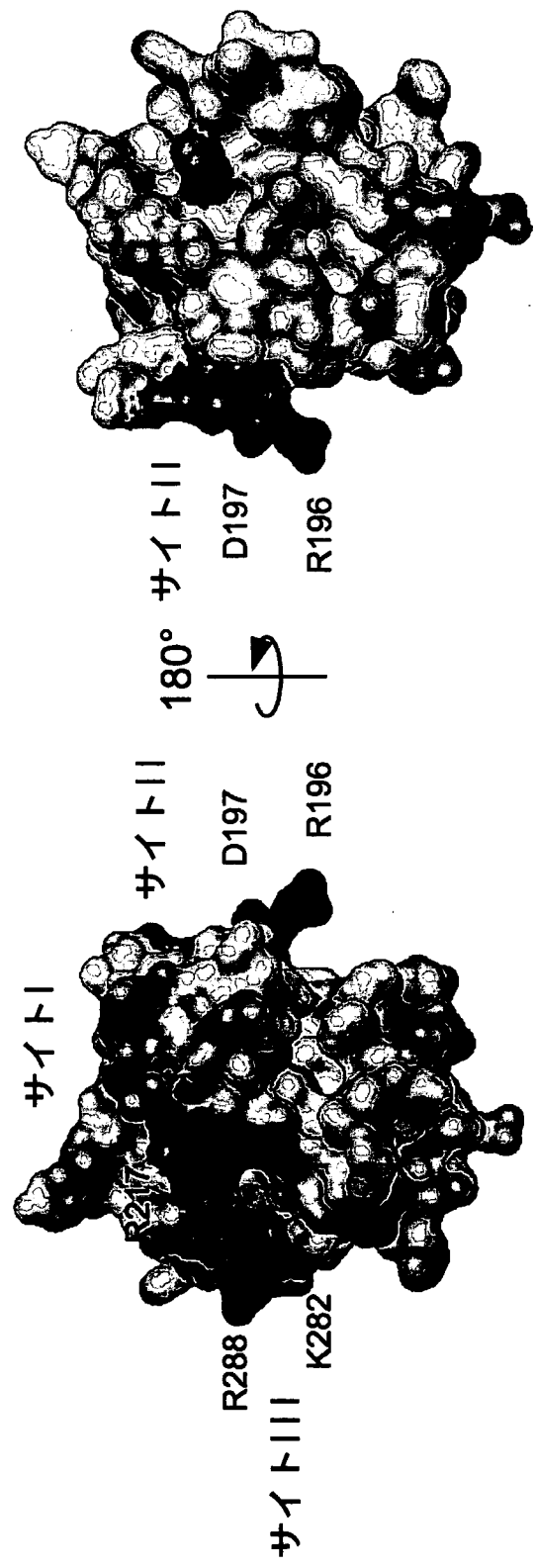


図6

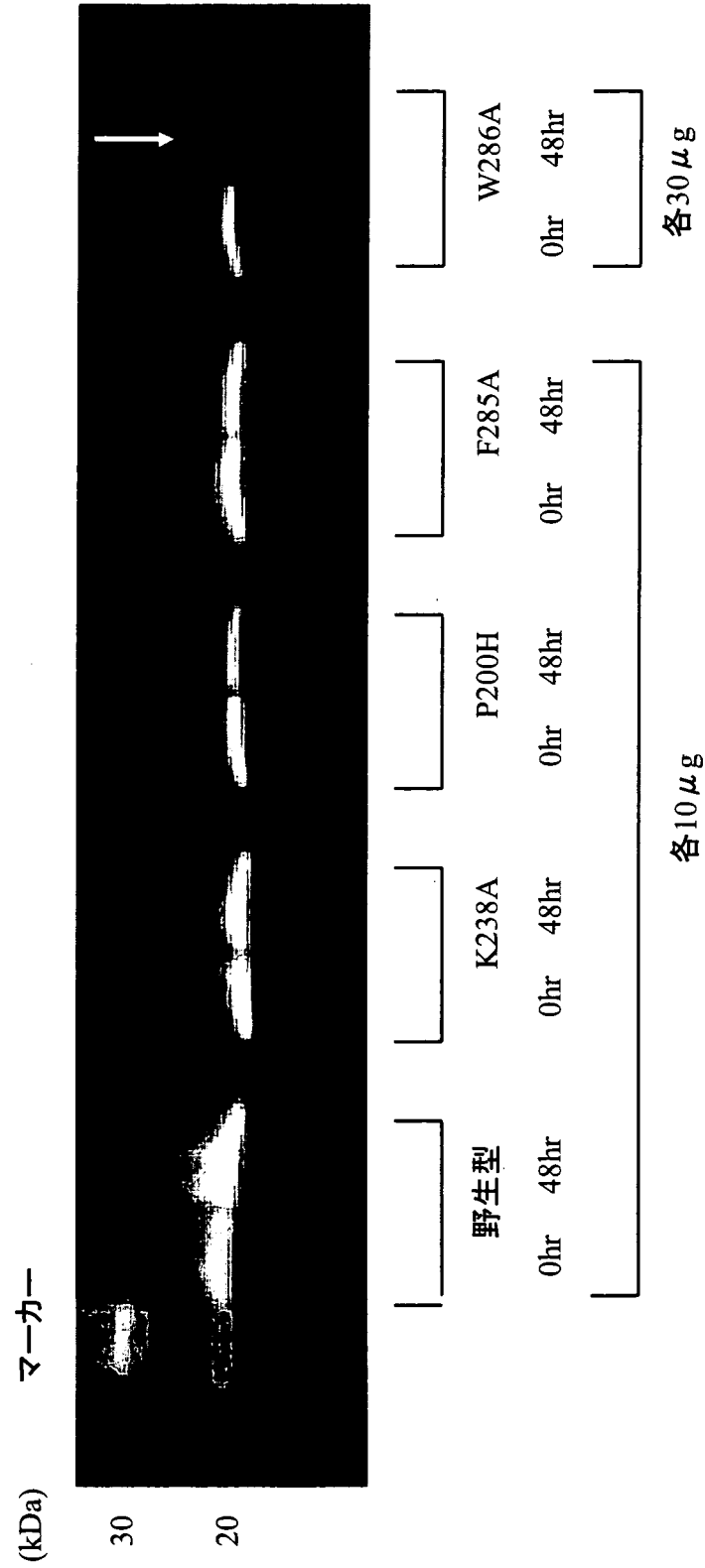


図7

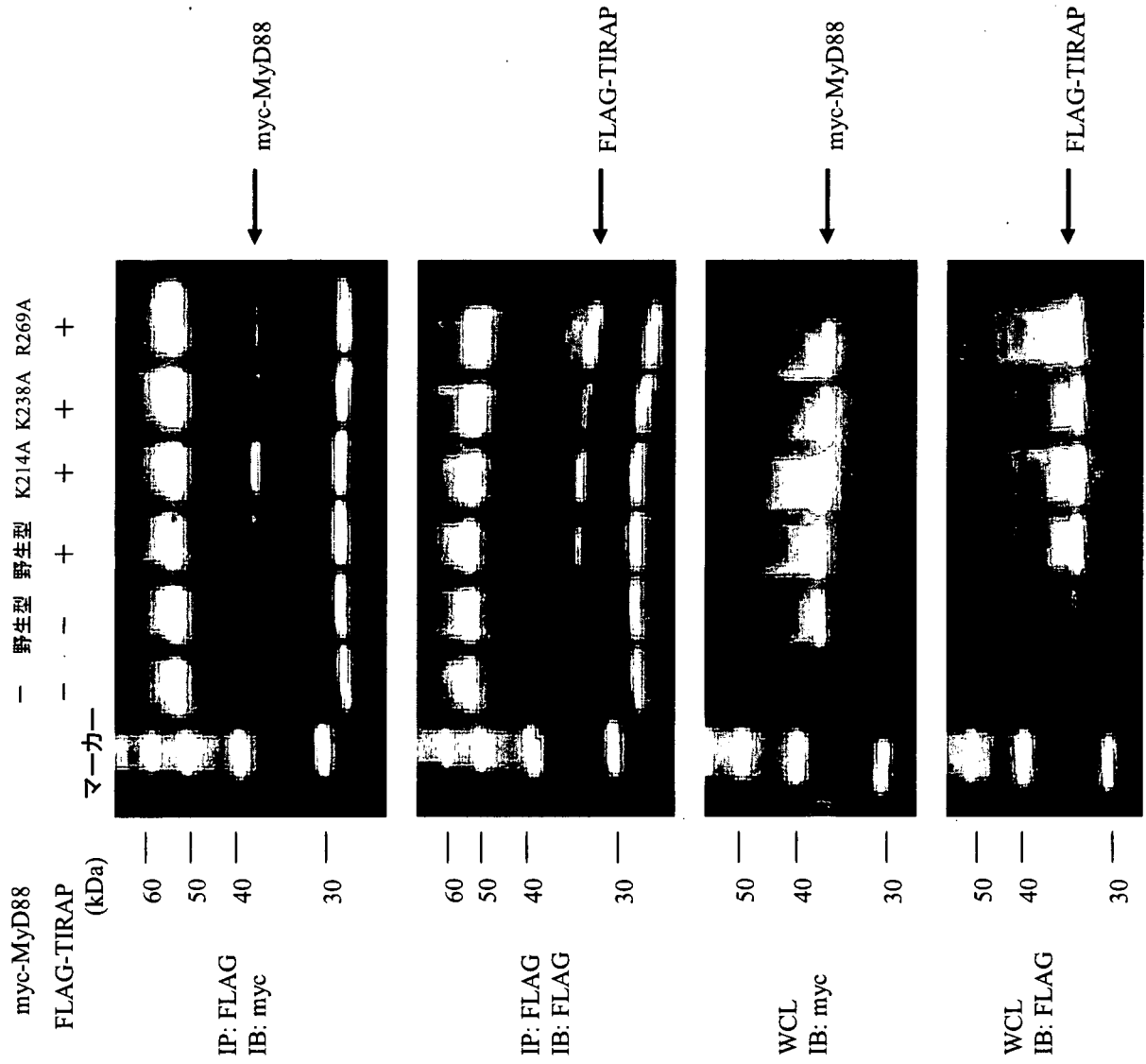
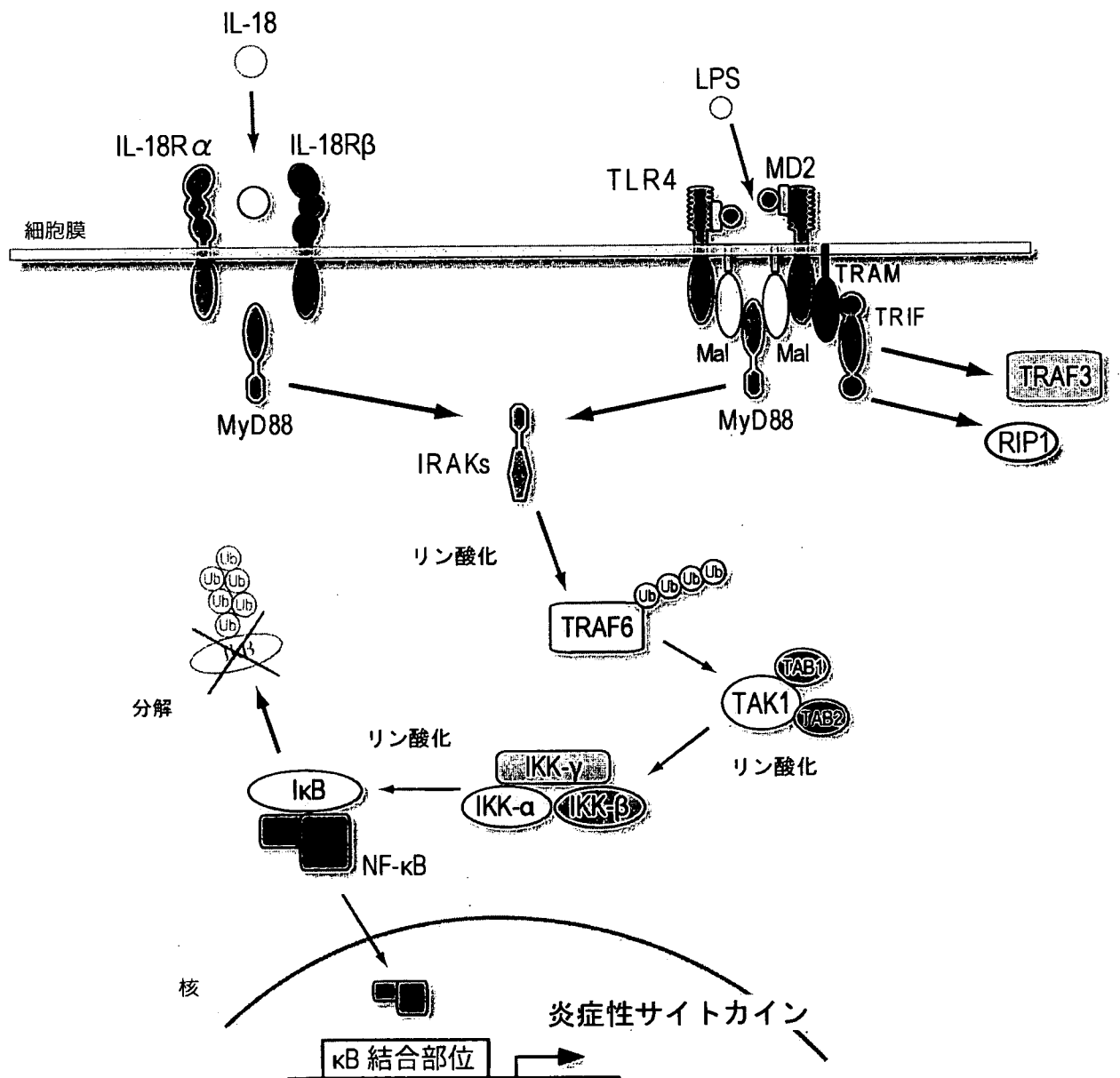


図8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/064170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90, C07K14/00-14/825, C12P21/00-21/02, C12Q1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream II)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masatoshi NADA et al., "Shizen Men'ekikei Saibonai Adapter Bunshi no Kozo Seibutsugakuteki Kino Kaiseki to Rinsho Oyo eno Tenbo", Japanese Journal of Allergology, 2007 April, Vol.56, No.3-4, page 316 [lecture No. MS4-9]	1-13
Y	LI, C. et.al., Interactive Sites in the MyD88 Toll/Interleukin (IL)1 Receptor Domain Responsible for Coupling to the IL1 β Signaling Pathway., J. Biol. Chem., 2005, vol.280, no.28, p.26152-26159	1-13
A	Hidenori ONISHI et al., "Allergy Byotai ni Okeru Saibonai Signal Dentatsu Kiko no Tanpaku Kozogakuteki Kiban", Japanese Journal of Allergology, 2006, Vol.55, No.8-9, page 1153 [lecture No. 122]	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 August, 2008 (28.08.08)

Date of mailing of the international search report
09 September, 2008 (09.09.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/064170

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hidenori ONISHI et al., "Men'eki Allergy Byotai ni Okeru Saibonai Signal Dentatsu Kiko no Tanpaku Kozogakuteki Kaiseki", The Journal of the Japan Pediatric Society, 2007 February, Vol.111, No.2, page 177 [lecture No. 01-019]	1-13
P,Y	Masatoshi NADA et al., "Lipopeptide o Ninshiki suru TLR to Adapter Bunshikan Sogo Sayo no Kozo Seibutsugakuteki Kaiseki", The Journal of the Japan Pediatric Society, 2008 February, Vol.112, No.2, page 288 [lecture No. 0-389]	1-13
P,Y	Hidenori ONISHI et al., "MyD88 Tanpaku Rittai Kozo Kaiseki ni yoru Shinki Signal Dentatsu Seigy Bunshi no Kaihatsu", Allergy, 2007 September, Vol.56, No.8-9, page 1156 [lecture No. 317]	1-13
P,Y	Hidenori ONISHI et al., "Adaputer Bunshi MyD88 no Tanpaku Kozo·Kino Kaiseki to Sono Soyaku ni Muketa Oyo", The Journal of the Japan Pediatric Society, 2008 February, Vol.112, No.2, page 201 [lecture No. 0-041]	1-13
P,A	Hidenori ONISHI et al., "Bunshi Seibutsugakuteki Approach no Rinsho eno Impact IL-18 Oyobi Signal Dentatsukei Tanpakushitsu Kozo Kaiseki ni Motozuku Soyaku eno Approach", Japanese Journal of Pediatric Allergy and Clinical Immunology, 2008 March, Vol.22, No.1, pages 63 to 70	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/064170

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12P21/02(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C07K14/00-14/825, C12P21/00-21/02, C12Q1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 年

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

UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDream II)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	名田匡利他, 自然免疫系細胞内アダプター分子の構造生物学的機能解析と臨床応用への展望. アレルギー, 2007 年 4 月, vol.56, no.3-4, p.316 [講演番号:MS4-9]	1-13
Y	LI, C. et.al., Interactive Sites in the MyD88 Toll/Interleukin (IL)1 Receptor Domain Responsible for Coupling to the IL1 β Signaling Pathway. J. Biol. Chem., 2005, vol.280, no.28, p.26152-26159	1-13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 8 . 0 8 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 9 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

戸来 幸男

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 9 6 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	大西秀典他, アレルギー病態における細胞内シグナル伝達機構のタンパク構造学的基盤. アレルギー, 2006 年, vol. 55, no. 8-9, p. 1153 [講演番号: 122]	1-13
A	大西秀典他, 免疫アレルギー病態における細胞内シグナル伝達機構のタンパク構造学的解析. 日本小児科学会雑誌, 2007 年 2 月, vol. 111, no. 2, p. 177 [講演番号: 01-019]	1-13
P, Y	名田匡利他, リポペプチドを認識する TLR とアダプター分子間相互作用の構造生物学的解析. 日本小児科学会雑誌, 2008 年 2 月, vol. 112, no. 2, p. 288 [講演番号: 0-389]	1-13
P, Y	大西秀典他, MyD88 タンパク立体構造解析による新規シグナル伝達制御分子の開発. アレルギー, 2007 年 9 月, vol. 56, no. 8-9, p. 1156 [講演番号: 317]	1-13
P, Y	大西秀典他, アダプター分子 MyD88 のタンパク構造・機能解析とその創薬に向けた応用. 日本小児科学会雑誌, 2008 年 2 月, vol. 112, no. 2, p. 201 [講演番号: 0-041]	1-13
P, A	大西秀典他, 分子生物学的アプローチの臨床へのインパクト IL-18 及びシグナル伝達系タンパク質構造解析に基づく創薬へのアプローチ. 日本小児アレルギー学会誌, 2008 年 3 月, vol. 22, no. 1, p. 63-70	1-13