

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3869092号
(P3869092)

(45) 発行日 平成19年1月17日(2007. 1. 17)

(24) 登録日 平成18年10月20日(2006. 10. 20)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 K 14/47 (2006. 01)	C O 7 K 14/47	
C O 7 K 16/40 (2006. 01)	C O 7 K 16/40	
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00	B
請求項の数 15 外国語出願 (全 219 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平9-286182	(73) 特許権者	595161223
(22) 出願日	平成9年10月1日(1997. 10. 1)		ジェロン・コーポレーション
(65) 公開番号	特開平10-234384		GERON CORPORATION
(43) 公開日	平成10年9月8日(1998. 9. 8)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
審査請求日	平成10年1月30日(1998. 1. 30)		25, メンロ パーク, コンスティテュー
審査番号	不服2002-1663(P2002-1663/J1)		ション ドライブ 230
審査請求日	平成14年2月4日(2002. 2. 4)	(73) 特許権者	597147706
(31) 優先権主張番号	08/724, 643		ユニバーシティ ライセンス エクイティ
(32) 優先日	平成8年10月1日(1996. 10. 1)		ホールディングス, インコーポレイテッ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ド
(31) 優先権主張番号	08/844, 419		アメリカ合衆国 80303 コロラド州
(32) 優先日	平成9年4月18日(1997. 4. 18)		ボールダー ディスカバリー ドライブ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		4001 スイート 390
(31) 優先権主張番号	08/846, 017	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成9年4月25日(1997. 4. 25)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトテロメラーゼ触媒性サブユニット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

テロメラーゼRNAと会合するときテロメラーゼ触媒活性を有するポリペプチドをコードする、単離された、合成の、実質的に純粋な、または組換えのポリヌクレオチドであって

:

(a) 配列番号1に示される配列を有するポリヌクレオチド; または

(b) 該(a)に正確に相補的なポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド; または

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中に単一のアミノ酸または低い割合のアミノ酸の置換、付加、または、欠失を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである、

ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号1に示される配列の少なくとも14の連続するヌクレオチドの対をポリヌクレオチドプライマーとして含む、配列番号1の部分の特異的に増幅するための組成物。

【請求項 3】

配列番号1に示される配列の50ヌクレオチドから3kbを標識されたプローブとして含む、配列番号1またはその相補物に特異的にハイブリダイズするための組成物。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドプライマーまたは標識されたプローブが1またはそれ以上の天然に

10

20

存在しない合成ヌクレオチドを含む、請求項 2 または 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中に単一のアミノ酸または低い割合のアミノ酸の置換、付加、または、欠失を含むアミノ酸配列を有する組換えポリペプチドであって、テロメラーゼ RNA と会合した場合にテロメラーゼ触媒活性を有する組換えポリペプチド。

【請求項 6】

テロメラーゼ RNA 成分、および請求項 5 に記載のポリペプチドの組合せを含む組成物であって、ここで該組合せがテロメラーゼ触媒活性を有する、組成物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む細胞。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを発現するようにトランスフェクションされた、単離されたヒト細胞。

【請求項 9】

筋肉細胞；肝細胞；神経細胞、膠星状細胞、神経膠；脂肪細胞；線維芽細胞；血管内皮細胞；インスリン分泌細胞；上皮細胞；血液細胞、T 細胞、B 細胞、肥満細胞、好酸球、単球；骨芽細胞；軟骨細胞；または成体幹細胞である、請求項 8 に記載の細胞。

【請求項 10】

単離された抗体であって、配列番号 2 の配列を有するタンパク質と特異的に結合する、抗体。

【請求項 11】

試験化合物がヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T R T) 活性のモジュレーターであるかどうかを決定する方法であって、

a) 請求項 5 に記載の h T R T タンパク質及びテロメラーゼ RNA を含む組成物を提供する工程；

b) 該組成物中の該 h T R T タンパク質を該試験化合物と接触させる工程；および

c) 該 h T R T タンパク質の逆転写酵素活性を測定する工程であって、該試験化合物の非存在下での逆転写酵素活性と比較して、該試験化合物の存在下で測定された逆転写酵素活性の変化が、該試験化合物がテロメラーゼ逆転写酵素活性を調節することの決定を提供する、工程、

を包含する、方法。

【請求項 12】

テロメラーゼ触媒活性を有するタンパク質 - RNA 複合体を調製する方法であって、

a) 請求項 5 に記載のポリペプチドを、テロメラーゼ RNA 成分と、該ポリペプチドおよび該テロメラーゼ RNA 成分が会合してテロメラーゼ基質へのヌクレオチドの付加を触媒するテロメラーゼ酵素を形成する条件下で接触させる工程；または

b) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを、テロメラーゼ RNA 成分もまた発現する細胞中で発現させる工程、

のいずれかを包含する、方法。

【請求項 13】

サンプル中のヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T R T) をコードする核酸を検出する方法であって：

a) 該サンプルを、配列番号 1 に示される配列の 50 ヌクレオチドから 3 k b を含むポリヌクレオチドプローブと組み合わせる工程であって、ここで該工程は該プローブが該サンプル中の該 h T R T 核酸に特異的にハイブリダイズする条件下で行われる、工程；および結果として形成された任意のハイブリッドを検出する工程；または

b) 該サンプルを、配列番号 1 に示される配列の少なくとも 14 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプライマーと組み合わせる工程であって、ここで該工程は該プライマーが該サンプル中の該 h T R T 核酸を特異的に増幅する条件下で行われる、工程；および結果

10

20

30

40

50

として形成された任意の増幅産物を検出する工程；
のいずれかを包含し、

ここで、該複合体または増幅産物の存在を、該生物学的サンプル中の該 h T R T 遺伝子産物の存在と関連づける、方法。

【請求項 1 4】

生物学的サンプル中の h T R T ポリペプチドを検出する方法であって、

a) 該サンプルを、該 h T R T ポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させて複合体を形成する工程；および

b) 該複合体を検出する工程であって、該複合体の存在を、該生物学的サンプル中の h T R T ポリペプチドの存在と関連づける工程を包含し、

10

ここで、該 h T R T ポリペプチドが、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされる配列を有する、方法。

【請求項 1 5】

前記サンプルがガン細胞を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、テロメラーゼの触媒サブユニットおよび関連するポリペプチドをコードする新規な核酸に関する。特に、本発明は、ヒトのテロメラーゼ触媒サブユニットに関する。本発明は、医学、分子生物学、化学、薬理学、ならびに医学的診断および予後の技術に関する方法および組成物を提供する。

20

【0002】

【発明の背景】

以下の議論は、読者に本発明の分野を紹介することを意図する。

【0003】

真核生物染色体の末端の完全な複製には特定の細胞成分が必要であると、長く認識されてきた (Watson、1972、Nature New Biol.、239:197；Olovnikov、1973、J. Theor. Biol.、41:181)。従来のDNAポリメラーゼによる線状DNA鎖の複製は、RNAプライマーを必要とし、そして 5'末端から 3'末端へのみ進行し得る。真核生物の染色体DNA鎖の 5'最末端に結合したRNAがはずれるとき、ギャップが挿入される。これは、複製が繰り返されるたびに、娘鎖の連続的短鎖化を導く。テロメア (染色体の末端に物理的に位置しているタンパク質 - DNA構造体) のこの短鎖化は、インビトロおよびインビボでの正常なヒトの体細胞の細胞老化または加齢現象を説明すると考えられている (例えば、Goldstein、1990、Science 249:1129；Martinら、1979、Lab. Invest. 23:86；Goldsteinら、1969、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、64:155；およびSchneiderおよびMitsui、1976、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、73:3584を参照のこと)。

30

【0004】

従って、テロメアの長さおよび完全性 (integrity) は、老化段階 (すなわち、増殖能の欠如) への細胞の進入と関係する。さらに、細胞がテロメアの長さを維持 (または増大) する能力によって、細胞が老化するのを免れる、すなわち細胞を不死化させる。

40

【0005】

テロメアおよびテロメリックDNAの構造は、数多くの系において研究されてきた (例えば、HarleyおよびVilleponteau、1995、Curr.Opin.Genet.Dev. 5:249を参照のこと)。ほとんどの生物において、テロメリックDNAは、タンデム (tandem) 配置の非常に単純な配列からなる；ヒトおよび他の脊椎動物では、テロメリックDNAは、配列TTAGGGが数百から数千のタンデム反復からなる。細胞中でのテロメアの長さを決定および調節する方法は、PC T公開WO 93/23572およびWO 96/41016に記載されている。

【0006】

テロメアの維持は、テロメラーゼとして知られるテロメアに特異的なDNAポリメラーゼの機能である。テロメラーゼは、そのRNA部分の一部をテロメア反復のDNA合成のための鋳型

50

として用いるリボ核タンパク質 (RNP) である (Morin、1997, Eur. J. Cancer 33:750; Yuら、1990, Nature 344:126; SingerおよびGottschling、1994, Science 266:404; AutexierおよびGreider、1994, Genes Develop., 8:563; Gilleyら、1995, Genes Develop., 9:2214; McEachernおよびBlackburn、1995, Nature 367:403; Blackburn、1992, Ann. Rev. Biochem., 61:113; Greider、1996, Ann. Rev. Biochem., 65:337)。ヒトおよび他のテロメラーゼのRNA成分は、クローン化および特徴付けされている (PCT公開W0 96/01835 およびFengら、1995, Science 269:1236を参照のこと)。しかしながら、テロメラーゼのタンパク質成分の特徴付けは困難であった。これは、テロメラーゼRNP (これは、発現される細胞中で、極めて低レベルで存在する) の精製が困難であることが証明されたことが一因である。例えば、高レベルのテロメラーゼ活性を発現すると知られているヒト細胞は、1細胞当たりわずか約100分子の酵素しか有しないと見積もられている。

10

【0007】

テロメアおよびテロメラーゼと細胞の増殖能 (すなわち、細胞が無限に分裂する能力) との関係に一致して、テロメラーゼ活性は、不死の細胞株および非常に多様なセットの腫瘍組織中に検出されるが、正常な体細胞培養物または腫瘍に隣接する正常な組織中には検出されない (すなわち、存在しないか、またはアッセイの閾を下回った) (米国特許第5,629,154号; 同第5,489,508号; 同第5,648,215号; および同第5,639,613号参照のこと; また、Morin、1989, Cell 59:521; ShayおよびBacchetti 1997, Eur. J. Cancer 33:787; Kimら、1994, Science 266:2011; Counterら、1992, EMBO J. 11:1921; Counterら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 2900; Counterら、1994, J. Virol. 68:3410も参照のこと)。さらに、腫瘍中のテロメラーゼ活性のレベルと、患者の適切な臨床結果との相関関係が報告されている (例えば、米国特許第5,639,613号 (前出); Langfordら、1997, Hum. Pathol. 28:416)。テロメラーゼ活性はまた、ヒトの生殖細胞、増殖中の幹細胞または始原細胞、および活性化されたリンパ球で検出されている。体細胞の幹細胞または始原細胞、および活性化されたリンパ球では、テロメラーゼ活性は、典型的には、非常に低いか、または一時的にのみ発現されるかのいずれかである (Chiuら、1996, Stem Cells 14:239; Bodnarら、1996, Exp. Cell Res. 228:58; Taylorら、1996, J. Invest. Dermatology 106:759を参照のこと)。

20

【0008】

ヒトテロメラーゼは、細胞の増殖および老化に関連するヒトの疾患 (例えば、ガン) の診断および処置のための理想的な標的である。ヒトにおけるガンおよび他のテロメラーゼ関連の疾患を診断および処置する方法は、米国特許第5,489,508号、同第5,639,613号および同第5,645,986号に記載されている。テロメラーゼをモニターすることにより、腫瘍の進行を予想するための方法は、米国特許第5,639,613号に記載されている。ヒトテロメラーゼの触媒タンパク質サブユニットの発見および特徴付けは、テロメラーゼ、ならびに疾患の診断および治療のためのさらなる有用なアッセイを提供する。さらに、触媒タンパク質サブユニットの一次配列のクローニングおよび決定は、ヒトのガンおよび細胞増殖能および老化に関連した他の疾患のためのより効果的な治療を可能にする。

30

【0009】

【発明の要旨】

本発明は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) タンパク質、その変異体またはそのフラグメントの、単離された、実質的に純粋な、または組換えタンパク質調製物を提供する。

40

【0010】

本発明は、hTERTタンパク質の、単離された、実質的に純粋な、または組換えのタンパク質調製物であって、該タンパク質が、図17のhTERTタンパク質と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列、その変異体またはそのフラグメントを有することにより特徴づけられる、タンパク質調製物を提供する。

【0011】

1つの実施態様において、上記hTERTタンパク質は図16の配列またはそのフラグメントを有する。

50

【 0 0 1 2 】

1つの実施態様において、上記hTRTタンパク質、変異体またはフラグメントはテロメラーゼ触媒活性を有する。

【 0 0 1 3 】

1つの実施態様において、上記タンパク質、変異体またはフラグメントは、テロメラーゼ触媒活性を有さない。

【 0 0 1 4 】

1つの実施態様において、上記タンパク質フラグメントは、少なくとも6アミノ酸残基を含む。

【 0 0 1 5 】

本発明は、本発明のhTRTタンパク質およびRNAを含む組成物を提供する。

10

【 0 0 1 6 】

この組成物の1つの実施態様において、上記RNAはテロメラーゼRNAである。

【 0 0 1 7 】

この組成物の1つの実施態様において、上記RNAはヒトテロメラーゼRNA(hTR)である。

【 0 0 1 8 】

この組成物の1つの実施態様において、上記hTRTタンパク質およびhTRは、テロメラーゼ活性を有するリボ核タンパク質複合体を形成する。

【 0 0 1 9 】

この組成物の1つの実施態様において、上記hTRTタンパク質は図17に記載の配列を有する。

20

【 0 0 2 0 】

本発明は、hTRTおよびhTRを含む、実質的に純粋なヒトテロメラーゼを提供する。

【 0 0 2 1 】

1つの実施態様において、このテロメラーゼは少なくとも約95%の純度である。

【 0 0 2 2 】

1つの実施態様において、このヒトテロメラーゼは細胞から単離される。

【 0 0 2 3 】

本発明は、hTRTタンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸配列を含む、単離された、合成の、実質的に純粋な、または組換えのポリヌクレオチドを提供する。

30

【 0 0 2 4 】

本発明は、図17に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1またはそれ以上の保守的置換を含む配列を有するhTRTタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された、合成の、実質的に純粋な、または組換えのポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 5 】

このポリヌクレオチドの1つの実施態様において、上記hTRTタンパク質は図17に記載のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 6 】

本発明は、hTRTタンパク質、フラグメントまたは変異体をコードする組換えポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、デフォルトパラメータを使用するBLASTアルゴリズムを使用して図16に記載のヌクレオチド配列と比較した場合、約0.5未満の最小合計確率(smallest sum probability)を有する、組換えポリヌクレオチドを提供する。

40

【 0 0 2 7 】

1つの実施態様において、このポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で、図16に記載の配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズする。

【 0 0 2 8 】

1つの実施態様において、このポリペプチドは、上記hTRTタンパク質をコードする配列に、作動可能に連結したプロモーター配列を含む。

【 0 0 2 9 】

50

ポリヌクレオチドの1つの実施態様において、上記プロモーターは天然に存在するhTRTプロモーター以外のプロモーターである。

【0030】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【0031】

本発明は、長さが少なくとも10ヌクレオチドから3 kbであり、そして天然に存在するhTRT遺伝子またはhTRT mRNA中の連続配列と同一かまたは正確に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの連続配列を含む、単離された、合成の、実質的に純粋な、または組換えのポリヌクレオチドを提供する。

【0032】

10

1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドはDNAである。

【0033】

1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドはRNAである。

【0034】

1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドは、1またはそれ以上の天然に存在しない合成ヌクレオチドを含む。

【0035】

1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドは、天然に存在するhTRT遺伝子またはhTRT mRNA中の前記連続配列と同一である。

【0036】

20

1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドは、天然に存在するhTRT遺伝子またはhTRT mRNA中の前記連続配列と正確に相補的である。

【0037】

1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドは、アンチセンスポリヌクレオチドである。

【0038】

1つの実施態様において、このアンチセンスポリヌクレオチドは、少なくとも約20ヌクレオチドを含む。

【0039】

本発明は、本発明の組換えポリヌクレオチドを含む細胞を提供する。

30

【0040】

1つの実施態様において、この細胞はヒト細胞である。

【0041】

1つの実施態様において、この細胞は、増殖能以外は同一であるが前記組換えポリヌクレオチドを含まない細胞に対して増加した増殖能を有する。

【0042】

1つの実施態様において、この細胞は、テロメラーゼ活性以外は同一であるが前記組換えポリヌクレオチドを含まない細胞に対して増加したテロメラーゼ活性レベルを有する。

【0043】

1つの実施態様において、この細胞は不死である。

40

【0044】

本発明は、hTRTポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む非ヒト生物を提供する。

【0045】

この生物の1つの実施態様において、上記生物はマウス、酵母または細菌である。

【0046】

本発明は、単離された抗体または組換え抗体、あるいはそのフラグメントであって、該抗体またはフラグメントがhTRTタンパク質と特異的に結合する、抗体またはフラグメントを提供する。

【0047】

50

1つの実施態様において、上記抗体は少なくとも約 10^8 M^{-1} のアフィニティーで結合する。

【0048】

本発明は、本発明の抗体を分泌し得る細胞を提供する。

【0049】

1つの実施態様において、この細胞はハイブリドーマである。

【0050】

本発明は、本発明の抗体を含む組成物を提供する。

【0051】

この組成物の1つの実施態様において、上記抗体はモノクローナル抗体である。

10

【0052】

本発明は、化合物または処置がhTERTの活性または発現のモジュレーターであるかどうかを決定する方法であって、該化合物または処置の施行後に、hTERTタンパク質またはポリヌクレオチドを含む細胞、動物、または組成物において、活性または発現の変化を検出する工程を包含する方法を提供する。

【0053】

本発明は、試験化合物がテロメラーゼ逆転写酵素活性のモジュレーターであるかどうかを決定する方法を提供する。この方法は、以下の工程を包含する：

a) hTERTタンパク質を含む組成物を提供する工程；

b) このhTERTタンパク質を上記試験化合物と接触させる工程；および

20

c) このhTERTの活性を測定する工程であって、上記試験化合物の非存在下でのhTERT活性と比較して上記試験化合物の存在下で測定されたhTERT活性の変化が、上記試験化合物がテロメラーゼ逆転写酵素活性を調節することの決定を提供する、工程。

【0054】

この方法の1つの実施態様において、上記組成物は組換えhTERTタンパク質を含む細胞である。

【0055】

この方法の1つの実施態様において、上記組成物はhTERTタンパク質を含む非ヒト生物である。

【0056】

30

この方法の1つの実施態様において、上記hTERTタンパク質はインビトロ発現の産物である。

【0057】

この方法の1つの実施態様において、上記hTERT活性は、テロメラーゼの基質中へのヌクレオチド標識の組み込みをモニターすることによって測定される。

【0058】

この方法の1つの実施態様において、上記hTERT活性は、拡張されたテロメラーゼ基質へのプローブのハイブリダイゼーションをモニターすることによって測定される。

【0059】

この方法の1つの実施態様において、上記hTERT活性は、拡張されたテロメラーゼ基質の増幅をモニターすることによって測定される。

40

【0060】

この方法の1つの実施態様において、上記hTERT活性は、前記試験化合物に曝された細胞のテロメア長をモニターすることによって測定される。

【0061】

この方法の1つの実施態様において、上記hTERT活性は、テロメラーゼが染色体に結合する能力の喪失をモニターすることによって測定される。

【0062】

本発明は、hTERT活性を調節する化合物を同定する方法であって、hTERTを該化合物と接触させる工程、および該hTERTの特性または活性の変化を測定する工程を包含し、ここで、統計

50

的に有意な変化が、該化合物をhTRT活性を調節するものとして同定する方法を提供する。

【0063】

本発明は、組換えテロメラーゼを調製する方法であって、組換えhTRTタンパク質とテロメラーゼRNA成分とを、該組換えタンパク質と該テロメラーゼRNA成分が会合して、テロメラーゼ基質へのヌクレオチドの付加を触媒し得るテロメラーゼ酵素を形成する条件下で接触させる工程を包含する方法を提供する。

【0064】

この方法の1つの実施態様において、上記hTRTタンパク質は図17に記載の配列を有する。

【0065】

この方法の1つの実施態様において、上記hTRTタンパク質はインビトロ発現系において産生される。

【0066】

この方法の1つの実施態様において、テロメラーゼRNAはインビトロ発現系において共発現する。

【0067】

この方法の1つの実施態様において、上記テロメラーゼRNAはhTRである。

【0068】

この方法の1つの実施態様において、上記テロメラーゼRNAはhTRTと混合される。

【0069】

この方法の1つの実施態様において、上記接触させる工程は細胞中で生じる。

【0070】

この方法の1つの実施態様において、上記テロメラーゼRNAは前記細胞により天然に発現する。

【0071】

この方法の1つの実施態様において、上記細胞は、前記接触させる工程の前には、テロメラーゼ活性を発現しない。

【0072】

この方法の1つの実施態様において、上記細胞は、前記接触させる工程の後に、テロメラーゼ活性を発現する。

【0073】

この方法の1つの実施態様において、上記細胞はヒト細胞である。

【0074】

本発明は、サンプル中のhTRT遺伝子産物を検出する方法であって、

a) 上記サンプルを、上記遺伝子産物に特異的に結合するプローブと接触させる工程であって、ここで、このプローブおよび上記遺伝子産物が複合体を形成する、工程、およびこの複合体を検出する工程；または

b) 上記生物学的サンプル中の上記遺伝子産物を特異的に増幅する工程であって、ここで、上記遺伝子産物が核酸である、工程、およびこの増幅産物を検出する工程

を包含し、ここで、この複合体または増幅産物の存在を、上記生物学的サンプルにおける上記hTRT遺伝子産物の存在と相関づける、方法を提供する。

【0075】

この方法の1つの実施態様において、上記遺伝子産物はRNAである。

【0076】

この方法の1つの実施態様において、上記プローブは核酸である。

【0077】

この方法の1つの実施態様において、上記遺伝子産物はポリペプチドである。

【0078】

この方法の1つの実施態様において、上記プローブは抗体である。

【0079】

10

20

30

40

50

この方法の１つの実施態様において、上記サンプルはヒト由来である。

【００８０】

この方法の１つの実施態様において、上記サンプルは少なくとも１つの細胞を含む。

【００８１】

この方法の１つの実施態様において、上記接触させる工程または増幅させる工程はインタクトな細胞中で生じる。

【００８２】

この方法の１つの実施態様において、上記接触させる工程または増幅させる工程は細胞抽出物中で生じる。

【００８３】

この方法の１つの実施態様において、上記細胞はヒト細胞である。

【００８４】

本発明は、ヒト細胞を含む生物学的サンプル中の少なくとも１つのテロメラーゼ陽性ヒト細胞の存在を検出する方法であって、

a) 上記サンプル中のhTERT遺伝子産物の量を測定する工程、

b) この測定した量をテロメラーゼ陽性細胞を欠くサンプルに相関するコントロールと比較する工程

を包含し、ここで、このコントロールと比較して、上記サンプルにおける上記hTERT遺伝子産物のより高いレベルの存在を、上記生物学的サンプルにおけるテロメラーゼ陽性細胞の存在と相関づける、方法を提供する。

【００８５】

この方法の１つの実施態様において、上記テロメラーゼ陽性細胞はガン細胞である。

【００８６】

この方法の１つの実施態様において、上記テロメラーゼ陽性細胞は不死細胞である。

【００８７】

この方法の１つの実施態様において、上記テロメラーゼ陽性細胞は胎児細胞である。

【００８８】

本発明は、患者におけるテロメラーゼ関連状態を診断するための方法であって、 a) 上記患者から細胞または組織サンプルを得る工程；

b) この細胞または組織中のhTERT遺伝子産物の量を測定する工程；および

c) この細胞または組織中のhRTR遺伝子産物の量を、同じタイプの健常な細胞または組織中の量と比較する工程

を包含する方法を提供し、ここで、上記患者由来のサンプル中のhTERT遺伝子産物の量と、健常な細胞または組織中の量との差異が、テロメラーゼ関連状態の診断である。

【００８９】

この方法の１つの実施態様において、上記サンプル中の量は、前記健常細胞または組織中の量より高く、そして前記テロメラーゼ関連状態はガンである。

【００９０】

本発明は、患者においてガンを診断する方法であって、この方法は以下の工程：

a) 上記患者から生物学的サンプルを得る工程；および

b) 上記患者のサンプルにおいてhTERT遺伝子産物を検出する工程

を包含する方法を提供し、ここで、上記サンプルにおけるhTERT遺伝子産物の検出を、ガンの診断に相関づける。

【００９１】

本発明は、患者においてガンを診断する方法であって、この方法は以下の工程：

a) 患者のサンプルを得る工程；

b) 上記患者のサンプル中のhTERT遺伝子産物の量を測定する工程；および

c) hTERT遺伝子産物の量を正常値と比較する工程

を包含する方法を提供し、ここで、この正常値より高い、患者における上記hTERT遺伝子産物の量が、ガンの診断である。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

本発明は、患者においてガンを診断する方法であって、この方法は以下の工程：

- a) 少なくとも1つの細胞を含む患者サンプルを得る工程；
 - b) 上記サンプル中の細胞におけるhTERT遺伝子産物の量を測定する工程；および
 - c) この細胞中のhTERT遺伝子産物の量を、この細胞の正常値と比較する工程
- を包含する方法を提供し、ここで、この正常値より多い上記サンプル中のhTERT遺伝子産物の量が、ガンの診断である。

【 0 0 9 3 】

この方法の1つの実施態様において、上記サンプルは少なくとも1つの悪性細胞を含む。

【 0 0 9 4 】

10

本発明は、ガン患者に予後を提供する方法であって、この方法は以下の工程：

- a) 上記患者から得たガン細胞中のhTERT遺伝子産物の量を測定する工程；および
 - b) このガン細胞中のhTERTの量を、このガンの予後と一致する、1つのガン細胞あたりのhTERTの予後値と比較する工程
- を包含する方法を提供し、これによって、この予後値である、上記サンプル中の1細胞あたりのhTERTの量が特定の予後を提供する。

【 0 0 9 5 】

本発明は、抗ガン処置が、患者におけるガン細胞の増殖能を減少させる能力をモニターする方法であって、

- a) 上記患者由来の少なくとも1つのガン細胞中のhTERT遺伝子産物の量の第1の測定を行う工程；
 - b) 上記患者由来の少なくとも1つのガン細胞中のhTERT遺伝子産物のレベルの第2の測定を行う工程であって、ここで、この抗ガン処置が該第2の測定の前に上記患者に施行される、工程；および
 - c) この第1および第2の測定値を比較する工程であって、この第2の測定値におけるhTERT遺伝子産物のより低いレベルを、抗ガン処置が上記患者におけるガン細胞の増殖能を減少させる能力と相関づける、工程
- を包含する方法を提供する。

20

【 0 0 9 6 】

本発明は、hTERT遺伝子または遺伝子産物の検出のためのキットであって、hTERT核酸またはその部分配列(subsequence)、hTERTポリペプチドまたはその部分配列、および抗hTERT抗体から選択される分子を含む容器を含む、キットを提供する。

30

【 0 0 9 7 】

1つの実施態様において、このキットは、hTERT遺伝子またはhTERT mRNAの部分を増幅するために使用され得る一対のプライマーを含む。

【 0 0 9 8 】

1つの実施態様において、このキットは、hTERT mRNAに特異的にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドプローブを含む。

【 0 0 9 9 】

本発明は、脊椎動物細胞中に組換えhTERTポリヌクレオチドを導入することによって、上記脊椎動物細胞の増殖能を増大させるための方法であって、ここで、この配列がプロモーターに作動可能に連結される方法を提供する。

40

【 0 1 0 0 】

この方法の1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドによりコードされるhTERTは、テロメラーゼ触媒活性を有する。

【 0 1 0 1 】

この方法の1つの実施態様において、上記hTERTポリペプチドは、図17に記載の配列を有する。

【 0 1 0 2 】

この方法の1つの実施態様において、上記細胞は哺乳動物細胞である。

50

【 0 1 0 3 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記細胞はヒト細胞である。

【 0 1 0 4 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記細胞はヒト患者由来である。

【 0 1 0 5 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記細胞はインビトロで培養される。

【 0 1 0 6 】

1 つの実施態様において、この方法は、上記細胞をヒト患者に再導入する工程をさらに包含する。

【 0 1 0 7 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記組換えポリヌクレオチドは、遺伝子治療ベクターを使用して患者の少なくとも 1 つの細胞に導入される。

【 0 1 0 8 】

1 つの実施態様において、この方法は、上記細胞に、プロモーターに作動可能に連結された、hTR をコードする配列を含むポリヌクレオチドを導入する工程をさらに包含する。

【 0 1 0 9 】

本発明は、脊椎動物細胞の増殖能を増大させる方法であって、上記細胞中に有効量の hTRT ポリペプチドを導入する工程を包含する、方法を提供する。

【 0 1 1 0 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記 hTRT ポリペプチドはテロメラーゼ触媒活性を有する。

【 0 1 1 1 】

本発明は、薬学的に受容可能なキャリア、ならびに hTRT ポリペプチド、hTRT 抗体、hTRT ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および hTRT 核酸またはその部分配列から選択される分子を含む、薬学組成物を提供する。

【 0 1 1 2 】

本発明は、細胞内のテロメラーゼ活性レベルの上昇に関連する状態を治療する方法であって、上記細胞中に、治療有効量の上記テロメラーゼ活性のインヒビターを導入する工程を包含し、ここで、このインヒビターが hTRT ポリペプチド、hTRT に結合する抗体、または hTRT ポリヌクレオチドである、方法を提供する。

【 0 1 1 3 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記インヒビターは、図 16 に記載の配列、またはその部分配列または変異体を含むポリペプチドである。

【 0 1 1 4 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記ポリペプチドは、非標準的なまたは誘導体化された残基を含む。

【 0 1 1 5 】

この方法の 1 つの実施態様において、上記ポリペプチドは、内因性 hTRT の hTR への結合を阻害する。

【 0 1 1 6 】

この方法の 1 つの実施態様において、前記細胞に前記インヒビターを導入する上記工程は、前記 hTRT ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは hTRT ポリヌクレオチドで、前記細胞または祖先を形質転換する工程を包含する。

【 0 1 1 7 】

本発明は、hTRT ポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチンを提供する。

【 0 1 1 8 】

本発明は、hTRT 遺伝子を含むトランスジェニック非ヒト生物を提供する。

【 0 1 1 9 】

本発明は、hTRT タンパク質の配列またはその部分配列を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

10

20

30

40

50

【0120】

本発明は、hTRTプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。

【0121】

このポリヌクレオチドの1つの実施態様において、上記hTRTプロモーター配列は、タンパク質コード配列に作動可能に連結される。

【0122】

このポリヌクレオチドの1つの実施態様において、上記タンパク質コード配列は、hTRT以外のタンパク質をコードする。

【0123】

本発明は、より大きな核酸中に含まれている未知の配列の選択された核酸を単離するための方法であって、

(a) 上記核酸を一对のオリゴヌクレオチドプライマーと、このプライマーが上記核酸中の相補配列とハイブリダイズし、そしてこのプライマーの3'末端へのヌクレオチドの付加によって伸長して、上記核酸にハイブリダイズする伸長プライマーを形成する条件で接触させて反応混合物を形成させる工程であって、ここで、この一对のオリゴヌクレオチドプライマーは、異なる配列のプライマーの混合物である少なくとも1つのプライマーを含み、そして該プライマーのうち少なくとも1つは結合部分で標識されている、工程；

(b) 工程(a)において形成された反応混合物を加熱するかまたはそうでなければ処置して、上記核酸とハイブリダイズする伸長プライマーを変性させ、次いで上記接触させる工程(a)を繰り返す工程；

(c) 工程(b)を少なくとも1回から10回繰り返す工程；

(d) この反応混合物を固体支持体上に固定された薬剤と、二本鎖核酸が上記接触させる工程の間変性しない条件下で接触させる工程であって、この薬剤は上記結合部分と特異的に結合し、したがって上記結合部分を含む上記伸長プライマーに結合する、工程；

(e) 非特異的に結合した物質を該固体支持体から除去して、支持体に結合した核酸混合物を調製する工程；

(f) 上記薬剤は該結合部分に結合したままであり、そして二本鎖核酸は変性されて一本鎖核酸を形成する条件下で、上記支持体に結合した核酸混合物を加熱またはそうでなければ変性させる工程；および

(g) 加熱する工程(e)の後、上記支持体に結合していない任意の一本鎖核酸を単離する工程

を包含する、方法を提供する。

【0124】

この方法の1つの実施態様において、本法は、工程(g)で単離された一本鎖核酸を使用する第2の増幅反応を行う工程をさらに包含する。

【0125】

この方法の1つの実施態様において、上記結合部分はビオチンであり、そして上記薬剤はアビジンまたはアビジン化分子である。

【0126】

本発明は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTRT)タンパク質またはその変異体またはそれらのフラグメントの、単離された、実質的に純粋な、または組換えタンパク質調製物を提供する。

【0127】

本発明は、図17に記載のhTRTタンパク質と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列またはその変異体またはそのフラグメントを有することによって特徴付けられる、単離された、実質的に純粋な、または組換えhTRTタンパク質を提供する。

【0128】

1つの実施態様において、このタンパク質は図17に記載の配列を有する。

【0129】

10

20

30

40

50

本発明は、hTRTタンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸配列を含む、単離された、合成の、実質的に純粋な、または組換えポリヌクレオチドを提供する。

【0130】

1つの実施態様において、このポリヌクレオチドは図16に記載された配列を有する。

【0131】

本発明は、hTRT遺伝子配列またはhTRT mRNAをアッセイまたはスクリーニングすることにおいて、長さが少なくとも10ヌクレオチドから10kbであり、そして天然に存在するhTRT遺伝子またはhTRT mRNA中の連続配列と同一かまたは正確に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの連続配列を含むポリヌクレオチドの使用を提供する。

【0132】

本発明は、組換え宿主細胞を調製することにおいて、長さが少なくとも10ヌクレオチドから10kbであり、そして天然に存在するhTRT遺伝子またはhTRT mRNA中の連続配列と同一かまたは正確に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの連続配列を含むポリヌクレオチドの使用を提供する。

【0133】

本発明は、本発明において規定されるポリヌクレオチドを含む細胞を提供する。

【0134】

本発明は、hTRTタンパク質に特異的に結合する、抗体またはその結合フラグメントを提供する。

【0135】

本発明は、化合物または処置がhTRTの活性または発現のモジュレーターであるかどうかを決定する方法であって、上記化合物または処置の施行後に、hTRT組換えタンパク質またはポリヌクレオチドを含む細胞、動物、または組成物において、活性または発現の変化を検出する工程を包含する、方法を提供する。

【0136】

本発明は、試験化合物がhTRT活性のモジュレーターであるかどうかを決定する方法を提供し、この方法は以下の工程：

(a) 本発明のhTRTタンパク質を上記試験化合物と接触させる工程；および

(b) 上記hTRTタンパク質の活性を測定する工程であって、上記試験化合物の非存在下でのhTRT活性と比較して上記試験化合物の存在下で測定されたhTRT活性の変化が、該試験化合物がテロメラーゼ逆転写酵素活性を調節することの決定を提供する、工程を包含する。

【0137】

本発明は、組換えテロメラーゼを調製する方法を提供し、この方法は以下の工程：

本発明の組換えhTRTタンパク質とテロメラーゼRNA成分とを、この組換えタンパク質とこのテロメラーゼRNA成分が会合して、テロメラーゼ基質へのヌクレオチドの付加を触媒し得るテロメラーゼ酵素を形成する条件下で接触させる工程を包含する。

【0138】

本発明は、サンプル中のhTRT遺伝子産物を検出する方法であって、

(a) 上記サンプルを、上記遺伝子産物に特異的に結合するプローブと接触させる工程であって、ここで、このプローブおよび上記遺伝子産物が複合体を形成する、工程、およびこの複合体を検出する工程；または

(b) 上記生物学的サンプル中の上記遺伝子産物を特異的に増幅する工程であって、ここで、上記遺伝子産物が核酸である、工程、およびこの増幅産物を検出する工程を包含する方法を提供し、ここで、この複合体または増幅産物の存在を、上記生物学的サンプル中の上記hTRT遺伝子産物の存在と関連づける。

【0139】

本発明は、ヒト細胞を含む生物学的サンプル中の少なくとも1つのテロメラーゼ陽性ヒト細胞の存在を検出する方法を提供し、この方法は以下の工程：

(a) 上記サンプル中のhTRT遺伝子産物の量を測定する工程、

10

20

30

40

50

(b) この測定した量をテロメラーゼ陽性細胞を欠くサンプルに相関するコントロールと比較する工程

を包含し、ここでこのコントロールと比較して、上記サンプル中の上記hTERT遺伝子産物のより高いレベルの存在を、上記生物学的サンプルにおけるテロメラーゼ陽性細胞の存在と相関づける。

【0140】

本発明は、患者におけるテロメラーゼ関連状態を診断するための方法であって、(a) 上記患者から細胞または組織サンプルを得る工程；

(b) 上記細胞または組織中のhTERT遺伝子産物の量を測定する工程；および

(c) 上記細胞または組織中のhTERT遺伝子産物の量を、同じタイプの健常な細胞または組織中の量と比較する工程

を包含する方法を提供し、ここで、上記患者由来のサンプル中のhTERT遺伝子産物の量と、健常な細胞または組織中の量との差異が、テロメラーゼ関連状態を診断する。

【0141】

本発明は、脊椎動物細胞におけるhTERTの発現を増大させることによる、インビトロでの該脊椎動物細胞の増殖能を増大させるための方法を提供する。

【0142】

本発明は、脊椎動物細胞の増殖能が増大することにより特徴付けられる状態を処置するための医薬の製造における、hTERTの発現を増大させる薬剤の使用を提供する。

【0143】

この使用の1つの実施態様において、上記医薬は、老化の影響を阻害するためである。

【0144】

本発明は、受容可能なキャリア、ならびに本発明のhTERTタンパク質、変異体またはフラグメント、本発明のhTERT抗体または結合フラグメント、本発明で規定されるhTERTタンパク質、変異体またはフラグメントをコードするポリヌクレオチド、あるいはhTERTタンパク質をコードする核酸またはその部分配列を含む、薬学組成物を提供する。

【0145】

本発明は、ヒト細胞内のテロメラーゼ活性レベルの上昇に関連する状態を処置するための医薬の製造における、テロメラーゼ活性のインヒビターの使用を提供する。

【0146】

1つの実施態様において、タンパク質、変異体またはフラグメントは、薬物として使用する。

【0147】

1つの実施態様において、タンパク質、変異体またはフラグメントは、医薬の製造において使用される。

【0148】

1つの実施態様において、タンパク質、変異体またはフラグメントは、老化またはガンの影響を阻害するための医薬の製造において使用される。

【0149】

1つの実施態様において、ポリヌクレオチドまたはフラグメントは、薬物として使用される。

【0150】

1つの実施態様において、ポリヌクレオチドまたはフラグメントは、医薬の製造において使用される。

【0151】

1つの実施態様において、ポリヌクレオチドまたはフラグメントは、老化またはガンの影響を阻害するための医薬の製造において使用される。

【0152】

本発明は、(a) 図16に記載される配列を有するDNA；

(b) このDNAにハイブリダイズし、そしてhTERTタンパク質または変異体をコードする少

なくとも10ヌクレオチドのポリヌクレオチド；

(c) 遺伝コードの結果として、(a)および(b)に規定されるDNA配列に縮重し、そしてhTRTポリペプチドまたは変異体をコードするDNA配列から選択されるポリヌクレオチドを提供する。

【0153】

本発明は、テロメラーゼ逆転写酵素タンパク質またはその変異体、あるいはそれらのフラグメントの単離されたタンパク質調製物、実質的に純粋なタンパク質調製物、または組換えタンパク質調製物を提供する。1つの実施態様において、このタンパク質は、以下のアミノ酸配列を有する定義されたモチーフを有することにより特徴付けられる：

Trp-R₁-X₇-R₁-R₁-R₂-X-Phe-Phe-Tyr-X-Thr-Glu-X₈₋₉-R₃-R₃-Arg-R₄-X₂-Trp

10

ここで、Xは任意のアミノ酸でありかつ下付き文字は連続する残基の数をいい、R₁はロイシンまたはイソロイシンであり、R₂はグルタミンまたはアルギニンであり、R₃はフェニルアラニンまたはチロシンであり、そしてR₄はリジンまたはヒスチジンである。1つの実施態様において、このタンパク質は、ヒトTRTの配列を有する。他の実施態様において、本発明は、このようなタンパク質の部分配列と実質的な配列同一性を有するペプチドおよびポリペプチドに関する。

【0154】

関連する実施態様において、本発明は、テロメラーゼ逆転写酵素タンパク質をコードする、単離された核酸、実質的に純粋な核酸、または組換え核酸を提供する。1つの実施態様において、この核酸は、以下のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする：

20

Trp-R₁-X₇-R₁-R₁-R₂-X-Phe-Phe-Tyr-X-Thr-Glu-X₈₋₉-R₃-R₃-Arg-R₄-X₂-Trp

。

別の実施態様において、この核酸はヒトTRTタンパク質をコードする配列を有する。他の実施態様において、本発明は、このような核酸の部分配列と実質的な配列同一性または相補性を共有するオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドに関する。

【0155】

1つの実施態様において、本発明は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTRT)タンパク質に関する。従って、1つの実施態様において、本発明は、hTRTタンパク質またはその変異体、あるいはそれらのフラグメントの、単離されたタンパク質調製物、実質的に純粋なタンパク質調製物、または組換えタンパク質調製物を提供する。1つの実施態様において、このタンパク質は、図17のhTRTタンパク質(配列番号2)またはその変異体、あるいはそれらのフラグメントと少なくとも約75%または少なくとも約80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有することにより特徴付けられる。関連する局面において、hTRTタンパク質は、配列番号2の配列を有する。いくつかの実施態様において、タンパク質は、1つ以上のテロメラーゼ活性(例えば、触媒活性)を有する。1つの実施態様において、hTRTタンパク質のフラグメントは、少なくとも6つのアミノ酸残基を有する。

30

【0156】

本発明はまた、hTRTタンパク質およびRNAを含む組成物を提供する。RNAは、テロメラーゼRNA(例えば、ヒトテロメラーゼRNA)であり得る。1つの実施態様において、hTRTタンパク質およびヒトテロメラーゼRNA(hTR)は、テロメラーゼ活性を有するリボ核タンパク質複合体に由来する。

40

【0157】

1つの実施態様において、本発明は、hTRTタンパク質を含む単離されたヒトテロメラーゼ(例えば、hTRTタンパク質を含み、そしてhTRを含む、実質的に純粋なヒトテロメラーゼ)を提供する。1つの実施態様において、テロメラーゼは、少なくとも約95%純粋である。テロメラーゼは、細胞(例えば、組換え宿主細胞またはテロメラーゼ活性を発現する細胞)から単離され得る。

【0158】

別の局面において、本発明は、hTRTタンパク質をコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド、合成のポリヌクレオチド、実質的に純粋なポリヌクレオチド、または

50

組換えポリヌクレオチドを提供する。1つの実施態様において、このポリヌクレオチドは、図17(配列番号2)に示すアミノ酸配列を有するhTERTタンパク質をコードするヌクレオチド配列、あるいはこのアミノ酸配列中に1つ以上の保守的アミノ酸(またはコドン)置換、または1つ以上の活性を変化させるアミノ酸(またはコドン)置換を含む配列を有する。関連する局面において、このポリヌクレオチドは、図16(配列番号1)に示す配列を有するポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。別の関連する局面において、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、デフォルトパラメーターを有するBLASTアルゴリズムを用いて図16(配列番号1)に示すヌクレオチド配列と比較した場合、約0.5未満の最小合計確率を有する。

【0159】

別の局面において、本発明は、hTERTタンパク質をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を有するポリヌクレオチドを提供する。このプロモーターは、天然に存在するhTERTプロモーター以外のプロモーターであり得る。関連する局面において、本発明は、hTERTのプロモーターを含む発現ベクターを提供する。

【0160】

本発明はまた、少なくとも10ヌクレオチドの長さであり、そして天然に存在するhTERT遺伝子またはhTERT mRNA中の連続する配列に同一であるかまたは正確に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの連続する配列を含む、単離されたポリヌクレオチド、合成のポリヌクレオチド、実質的に純粋なポリヌクレオチド、または組換えポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施態様において、このポリヌクレオチドは、RNA、DNAであるか、または1つ以上の天然に存在しない合成ヌクレオチドを含む。1つの局面において、このポリヌクレオチドは、天然に存在するhTERT遺伝子またはhTERT mRNA中の少なくとも10の連続するヌクレオチドの連続する配列に同一であるかまたは正確に相補的である。例えば、このポリヌクレオチドは、アンチセンスポリヌクレオチドであり得る。1つの実施態様において、アンチセンスポリヌクレオチドは、少なくとも約20ヌクレオチドを含む。

【0161】

本発明は、組換えタンパク質とテロメラーゼRNA成分とが会合して、テロメラーゼ基質へのヌクレオチドの添加を触媒し得るテロメラーゼ酵素を形成するような条件下で、この組換えhTERTタンパク質とこのテロメラーゼRNA成分とを接触させることにより、組換えテロメラーゼを調製する方法をさらに提供する。1つの実施態様において、hTERTタンパク質は、図17(配列番号2)に示す配列を有する。hTERTタンパク質は、インビトロ発現系で産生され得、そしてテロメラーゼRNAと混合され得るか、または別の実施態様において、テロメラーゼRNAはインビトロ発現系で同時に発現され得る。1つの実施態様において、テロメラーゼRNAはhTRである。別の実施態様において、接触は、ヒト細胞のような細胞中で生じる。1つの実施態様において、細胞は、hTERTとRNAとの接触、またはトランスフェクションによるようなhTERTポリヌクレオチドの導入の前にはテロメラーゼ活性を有さない。1つの実施態様において、テロメラーゼRNAはこの細胞によって天然に発現される。

【0162】

本発明はまた、本発明の組換えポリヌクレオチド(例えば、プロモーターを作動可能に連結したhTERTタンパク質コード配列を有するポリヌクレオチド)を含む細胞(例えば、ヒト、マウス、または酵母の細胞)を提供する。特定の局面において、細胞は、哺乳動物(例えば、ヒト)由来の細胞のような脊椎動物細胞であり、そして組換えポリヌクレオチドを含まないこと以外は同一である細胞と比較して増加した増殖能力を有するか、または組換えポリヌクレオチドを含まないこと以外は同一である細胞と比較して増加したテロメラーゼ活性レベルを有する。いくつかの実施態様において、細胞は不死である。

【0163】

関連する実施態様において、本発明は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む生物および細胞(例えば、酵母、植物、細菌、または非ヒト動物(例えば、マウス)のようなトランスジェニック非ヒト生物)を提供する。本発明はまた、hTERT遺伝子が欠失している(ノックアウトの)、またはこの遺伝子が天然に存在

10

20

30

40

50

するhTRT遺伝子産物を発現しないように変異したトランスジェニック動物および細胞を提供する。従って、別の実施態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、変異したテロメラーゼ遺伝子を有し、テロメラーゼ活性を欠損した動物であり、TRT欠損が、野生型TRTと比較して減少したレベルのテロメラーゼ活性を有するTRTをコードする変異した遺伝子の結果である動物であり、そしてミスセンス変異、ナンセンス変異、挿入、または欠失を含む1つ以上の変異を有する変異したTRT遺伝子を有する動物である。

【0164】

本発明はまた、hTRTタンパク質に特異的に結合する、単離された抗体または組換え抗体、あるいはそのフラグメントを提供する。1つの実施態様において、抗体は、少なくとも約 10^8 M^{-1} の親和性で結合する。抗体は、モノクローナルであり得るか、またはポリクローナル抗血清のようなポリクローナル組成物であり得る。関連する局面において、本発明は、ハイブリドーマのような、抗体を分泌し得る細胞を提供する。

10

【0165】

本発明はまた、化合物または処置が、テロメラーゼ逆転写酵素活性またはhTRT発現のモジュレーターであるか否かを決定するための方法を提供する。この方法は、化合物の投与または処置の後に、hTRTタンパク質またはポリヌクレオチドを含む、細胞、動物、または組成物中の活性または発現における変化を検出またはモニタリングする工程を包含する。1つの実施態様において、この方法は、以下の工程を含む：TRT組成物を提供する工程、TRTを試験化合物と接触させる工程、およびTRTの活性を測定する工程。ここで、試験化合物の存在下でのTRT活性の変化は、その試験化合物がTRT活性を調節することの指標である。特定の実施態様において、組成物は、hTRTポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを含む、細胞、生物、トランスジェニック生物、または発現系のようなインビトロの系である。従って、この方法のhTRTは、インビトロ発現の産物であり得る。種々の実施態様において、テロメラーゼ活性または発現の検出は、hTRT遺伝子産物の発生量の変化を検出すること、テロメラーゼに対する基質へのヌクレオチド標識の取り込みをモニタリングすること、伸長したテロメラーゼ基質へのプローブのハイブリダイゼーションをモニタリングすること、伸長したテロメラーゼ基質の増幅をモニタリングすること、試験化合物に曝された細胞のテロメア長をモニタリングすること、テロメラーゼの染色体への結合能力の喪失をモニタリングすること、またはテロメア構造の蓄積または喪失を測定することにより行われ得る。

20

30

【0166】

1つの局面において、本発明は、生物学的試料を遺伝子産物と特異的に結合するプローブと接触させ（ここで、プローブと遺伝子産物は複合体を形成する）、そして複合体を検出する（ここで、複合体の存在は、生物学的試料中のhTRT遺伝子産物の存在に相関する）ことにより、生物学的試料中のhTRT遺伝子産物を検出する方法を提供する。遺伝子産物は、RNA、DNA、またはポリペプチドであり得る。検出のために使用され得るプローブの例としては、核酸および抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0167】

1つの実施態様において、遺伝子産物は、遺伝子を増幅し、そして増幅産物を検出することにより検出される核酸である。ここで、複合体または増幅産物の存在は、生物学的試料中のhTRT遺伝子産物の存在に相関する。

40

【0168】

1つの実施態様において、生物学的試料は、ヒト患者のような患者由来である。別の実施態様において、生物学的試料は、ヒト細胞培養物のようなインビトロ細胞培養物に由来する少なくとも1つの細胞を含む。

【0169】

本発明はさらに、ヒト細胞を含む生物学的試料中の少なくとも1つの不死またはテロメラーゼ陽性のヒト細胞の存在を検出する方法を提供する。この方法は、ヒト細胞を含む生物学的試料を得る工程；および高レベルのhTRT遺伝子産物を有する細胞の試料中の存在を検出する工程を含み、ここで高レベルのhTRT遺伝子産物を有する細胞の存在は、生物学的試

50

料中の不死またはテロメラーゼ陽性の細胞の存在に相関する。

【0170】

本発明はまた、患者におけるテロメラーゼに関連する状態を診断するための方法を提供する。この方法は、患者から細胞または組織の試料を得る工程、細胞または組織中のhTRT遺伝子産物の量を決定する工程；および細胞または組織中のhTRT遺伝子産物の量を、同じタイプの健康な細胞または組織中の量と比較する工程を含み、ここで、患者および健康な細胞または組織由来の試料中のhTRT遺伝子産物との間の量の差異は、テロメラーゼに関連する状態を診断する。1つの実施態様において、テロメラーゼに関連する状態はガンであり、そしてより多量のhTRT遺伝子産物が試料中に検出される。

【0171】

本発明はさらに、患者においてガンを診断する方法を提供する。この方法は、患者から生物学的試料を得る工程、および患者の試料中のhTRT遺伝子産物を検出する工程を含み、ここで、試料中でのhTRT遺伝子産物の検出は、ガンの診断に相関する。

【0172】

本発明はさらに、患者においてガンを診断する方法を提供する。この方法は、患者の試料を得る工程、患者の試料中のhTRT遺伝子産物の量を決定する工程；およびhTRT遺伝子産物の量を正常値またはコントロール値と比較する工程を含み、ここで正常値またはコントロール値よりも多い量の患者におけるhTRT遺伝子産物は、ガンを診断する。

【0173】

本発明はまた、患者においてガンを診断する方法を提供する。この方法は、少なくとも1つの細胞を含む患者の試料を得る工程；試料中の細胞におけるhTRT遺伝子産物の量を決定する工程；および細胞のhTRT遺伝子産物の量をこの細胞についての正常値と比較する工程を含み、ここで、正常値よりも多量のhTRT遺伝子産物は、ガンを診断する。1つの実施態様において、試料は、少なくとも1つの悪性細胞を含むと考えられる。

【0174】

本発明はまた、ガン患者を予測する（prognose）ための方法を提供する。この方法は、患者から得たガン細胞におけるhTRT遺伝子産物の量を決定する工程；およびガン細胞中のhTRTの量をガンの予測と一致するhTRTの予測値と比較する工程を含み；ここで、予測値である量の試料中のhTRTは、特定の予測を提供する。

【0175】

本発明はまた、患者においてガン細胞の増殖能を減少させるための抗ガン処置の能力をモニタリングするための方法を提供する。この方法は、患者由来の少なくとも1つのガン細胞におけるhTRT遺伝子産物の量を1回目に測定する工程、患者由来の少なくとも1つのガン細胞のhTRT遺伝子産物のレベルを2回目に測定する工程（ここで、抗ガン処置は2回目の測定の前に患者に投与される）；そして1回目と2回目の測定値を比較する工程（ここで、2回目の測定におけるhTRT遺伝子産物のより低いレベルは、患者においてガン細胞の増殖能を減少させるための抗ガン処置の能力に相関する）を含む。

【0176】

本発明はまた、hTRT遺伝子または遺伝子産物の検出のためのキットを提供する。1つの実施態様において、キットは、hTRT核酸またはその部分配列、hTRTポリペプチドまたはその部分配列、および抗hTRT抗体から選択される分子を含有する容器を含む。

【0177】

本発明はまた、ヒト疾患の処置方法を提供する。1つの実施態様において、本発明は、哺乳動物細胞のような脊椎動物細胞の増殖能を増大させるための方法を提供する。この方法は、組換えポリヌクレオチドを細胞に導入する工程を含み、ここで、このポリヌクレオチドはhTRTポリペプチドをコードする配列を含む。1つの実施態様において、hTRTポリペプチドは、図17に示されるような配列を有する。1つの実施態様において、配列は、プロモーターに作動可能に連結される。1つの実施態様において、hTRTは、テロメラーゼ触媒活性を有する。1つの実施態様において、細胞は、ヒト患者中の細胞のようなヒトである。別の実施態様において、細胞はインビトロで培養される。関連する実施態様において、細

10

20

30

40

50

胞はヒト患者中に導入される。

【0178】

本発明はさらに、ヒト疾患を処置するための方法を提供する。この方法は、患者中の少なくとも1つの細胞に組換えhTRTポリヌクレオチドを導入する工程を含む。1つの実施態様において、遺伝子治療ベクターが使用される。関連する実施態様において、この方法はさらに、hTRをコードする配列を含むポリヌクレオチド（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたhTRポリヌクレオチド）を細胞に導入する工程を含む。

【0179】

本発明はまた、脊椎動物細胞の増殖能を増大させるための方法を提供する。この方法は、細胞に有効量のhTRTポリペプチドを導入する工程を包含する。1つの実施態様において、hTRTポリペプチドは、テロメラーゼ触媒活性を有する。本発明はさらに、増大した増殖能を有する細胞および細胞の子孫を提供する。

【0180】

本発明はまた、細胞内で上昇したレベルのテロメラーゼ活性に関連する状態を処置するための方法を提供する。この方法は、この細胞にこのテロメラーゼ活性のインヒビターの治療的有效量を導入する工程を含み、ここで、このインヒビターは、hTRTポリペプチドまたはhTRTポリヌクレオチドである。1つの実施態様において、インヒビターは、例えば、図16、17、または20に示される配列の少なくとも1つの部分配列を含むポリペプチドまたはポリヌクレオチドである。さらなる実施態様において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、テロメラーゼRNAへの内在性TRTの結合のような、TRT活性を阻害する。

【0181】

本発明はまた、hTRTポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチンを提供する。本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリアおよび以下から選択される分子を含む薬理的組成物を提供する：hTRTポリペプチド、hTRTポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびhTRT核酸またはその部分配列。

【発明の詳細な説明】

【0182】

I. 序文

テロメラーゼは、RNA成分および触媒タンパク質成分を含むリボ核タンパク質複合体（RNP）である。本発明は、本明細書中で以下、「TRT」（テロメラーゼ逆転写酵素）という、テロメラーゼの触媒タンパク質成分のクローン化および特徴付けに関する。TRTは、このタンパク質が、テロメラーゼRNA成分（本明細書中以下、「TR」）を用いて、テロメアDNA反復配列の合成を指示するRNA依存性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素）として作用するので、このように命名される。さらに、TRTは、進化的に他の逆転写酵素と関連する（実施例12を参照のこと）。

【0183】

1つの局面において、本発明は、本明細書中以下「hTRT」という、ヒトテロメラーゼの触媒タンパク質成分のクローン化および特徴付けに関する。前述のように、ヒト（および他の哺乳動物細胞）におけるテロメラーゼ活性は、細胞増殖能、細胞不死、および新生物表現型の発生に相関するので、ヒトTRTは、並外れて興味深く、そして価値があるものである。例えば、テロメラーゼ活性、および以下の実施例2に実証されるように、ヒトTRT遺伝子産物のレベルは、有寿命性細胞（例えば、ほとんどのヒト体細胞）と比較して不死のヒト細胞（例えば、悪性腫瘍細胞および不死細胞株）において上昇する。

【0184】

本発明はさらに、以下でいくらか詳細に記載するように、ヒトの疾患および疾患状態の診断、予測、および処置のために価値のある方法および組成物を提供する。細胞の不死化（インビボおよびエクスピボ）、所望の特徴を有するトランスジェニック動物の作製、および多くの他の使用（その多くは以下に記載される）に有用な方法および試薬もまた提供される。本発明はまた、繊維虫、真菌類、哺乳動物のような脊椎動物、および他の生物からTRT遺伝子およびそのタンパク質を調製、クローン化、または再クローン化するために有

10

20

30

40

50

用な方法および試薬を提供する。

【0185】

以下に詳細に記載されるように、TRTは最初に、織毛虫の*Euplotes aediculatus*由来のテロメラーゼの精製後に特徴付けられた。RNAアフィニティークロマトグラフィーおよび他の方法を用いて、*E. aediculatus*テロメラーゼの十分な精製により、タンパク質「p123」が得られた。驚くべきことに、p123は、テロメラーゼホロ酵素のタンパク質サブユニットを構成すると以前に考えられていたタンパク質（すなわち、*Tetrahymena thermophila*のp80およびp95タンパク質）と関連しない。p123 DNAおよびタンパク質の配列（GenBank受託番号U95964；図13および14）の分析により、テロメラーゼの触媒サブユニットとしてのp123の役割と一致する逆転写酵素（RT）モチーフが明らかになった（図1、4、および11を参照のこと）。さらに、p123は、*S. cerevisiae*（酵母）タンパク質Est2pに関連する。Est2pは、*S. cerevisiae*（GenBank受託番号S5396）においてテロメアの維持に役割を果たすことが知られていたが、本発明の以前にはテロメラーゼ触媒サブユニットタンパク質をコードするとは認識されていなかった（例えば、Lendvayら、1996、Genetics、144：1399を参照のこと）。

10

【0186】

1つの局面において、本発明は、開示されたTRTポリヌクレオチドから作製されるかまたはこれに由来する核酸プローブおよびプライマー（例えば、TRT遺伝子およびcDNAのクローン化のため）を用いて；モチーフまたはモチーフ配列あるいは他のTRTエピトープを特異的に認識する抗体（例えば、クローン化TRT遺伝子の発現またはTRTタンパク質の精製のため）を用いて；コンピューターデータベースをスクリーニングすることにより；あるいは他の手段を用いて、新規のTRTを同定およびクローン化するための試薬および方法を提供する。例えば、実施例1に記載のように、*S. pombe* DNAのPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）増幅を、*Euplotes*のp123 RTモチーフのB'およびCから設計した縮重配列プライマーを用いて行った。作製した4つの顕著な産物のうち、1つは、*Euplotes*のp123および*S. cerevisiae*のEst2pに相同なペプチド配列をコードした。このPCR産物をプローブとして用いて、*S. pombe* cDNAおよびゲノムライブラリーをスクリーニングし、そして逆転写およびPCR（RT-PCR）により*S. pombe* RNAを増幅することにより、*S. pombe* TRTホモログの完全な配列を得た。*S. pombe*遺伝子の完全な配列（「trt1」；GenBank受託番号AF015783；図15）により、p123およびEst2pとの相同性が、逆転写酵素モチーフにおいて特に高いことが明らかになった。*S. pombe* trt1はまた、tez1とも呼ばれる。

20

30

【0187】

テロメラーゼRTモチーフに由来する縮重プライマーを用いる増幅をまた、実施例1に記載のように、*Oxytricha trifallax*および*Tetrahymena thermophila*におけるTRT遺伝子配列を得るために用いた。

【0188】

本発明の*Euplotes* p123、*S. pombe* trt1、および*S. cerevisiae* Est2pの核酸配列を、プログラムBLAST（Altschulら、1990、J. Mol. Biol. 215：403）を用いるヒトの発現配列タグ（EST）のコンピューター処理化データベースの検索に使用した。Est2p配列を用いたこのデータベースの検索は、マッチングを示さなかったが、p123およびtrt1配列を用いた検索は、実施例1に記載のように、推定的に相同タンパク質をコードするヒトEST（GenBank受託番号AA281296；配列番号8を参照のこと）を同定した。このESTを含むcDNAクローン（本明細書中以下、「クローン712562」、配列番号3を参照のこと）の完全な配列決定により、7つのRTモチーフが存在することが示された。しかし、このクローンは7つ全てのモチーフを有する連続するヒトTRTをコードしなかった。なぜなら、モチーフB'、C、D、およびEは、よりNH₂末端のモチーフとは異なるオープンリーディングフレーム（ORF）に含まれたからである。さらに、モチーフAおよびB'の距離は、3つの以前に特徴付けられたTRTの距離よりも実質的に短かった。クローン712562を、I.M.A.G.E. Consortium；Lennonら、1996、Genomics 33：151より得た。

40

【0189】

50

機能的なhTRT（図16、配列番号1を参照のこと）をコードするcDNAクローンのpGRN121を、実施例1に記載されるようなヒト293細胞株に由来するcDNAライブラリーから単離した。クローン712562とpGRN121との比較により、クローン712562が182塩基対（図24、配列番号9を参照のこと）の欠失をモチーフAとモチーフB'との間に有することが示された。pGRN121に存在する付加的な182塩基対は、単一のオープンリーディングフレームのTRTモチーフの全てを配置し、そして他の公知のTRTと一致する距離に、モチーフAとモチーフB'領域との間の間隔を増加させる。以下の実施例（例えば、実施例7）に記載されるように、配列番号1は、配列番号2の配列を有する触媒的に活性なテロメラーゼタンパク質をコードする。配列番号2のポリペプチドは、1132残基を有し、そして約127キロダルトン（kD）の計算分子量を有する。

10

【0190】

以下で議論し、そして以下の実施例9で記載するように、クローン712562の182塩基対の欠失の特徴を有するTRT cDNAは、テロメラーゼ陽性細胞（例えば、精巣および293細胞）由来のRNAの逆転写後に検出される。この182塩基対の配列を欠くhTRT RNAは、一般に「182変異体」といわれ、そして1、2、または数種を表わし得る。pGRN121 cDNAに見出される182塩基対の配列を欠くhTRT変異体は完全に活性なテロメラーゼ触媒酵素をコードしないようであるが、これらは以下に議論するように、テロメラーゼ調節に役割を有し得、および/または以下に議論するように、テロメア結合活性またはhTR結合活性のような部分的テロメラーゼ活性を有し得る。

【0191】

20

従って、1つの局面において、本発明は、天然に存在するヒトTRT遺伝子またはmRNAの配列を有する単離されたポリヌクレオチド（図16に示すような配列（配列番号1）を有するポリヌクレオチドを含むがこれに限定されない）を提供する。関連する局面において、本発明は、hTRTタンパク質、フラグメント、変異体、または誘導体をコードするポリヌクレオチドを提供する。別の関連する局面において、本発明は、hTRT遺伝子またはmRNAに結合するセンスおよびアンチセンス核酸を提供する。本発明はさらに、hTRTタンパク質（合成されたかまたは天然の供給源から単離されたかによらない）、ならびにhTRTタンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する抗体および他の薬剤を提供する。本発明はまた、例えば、ヒトの疾患に対する診断アッセイおよび予測アッセイを提供することにより前述の組成物を用いる方法、テロメラーゼ会合タンパク質の治療薬の開発方法および治療方法、テロメラーゼ会合タンパク質の同定方法、ならびにテロメラーゼ活性を活性化または阻害し得る薬剤のスクリーニング方法を含む、多くの新規の方法を提供する。本発明の多くの他の局面および実施態様を以下に提供する。

30

【0192】

本発明の1つの局面は、少なくとも10ヌクレオチド～約10kb以上の長さであり、そして天然に存在するhTRT遺伝子またはhTRT mRNA中の連続する配列に同一であるかまたは正確に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの連続する配列を含むポリヌクレオチドの、hTRT遺伝子配列またはhTRT mRNAのアッセイまたはスクリーニング、あるいは組換え宿主細胞の調製における使用である。

【0193】

40

本発明のさらなる局面は、脊椎動物細胞の増大した増殖能に焦点をあてられる状態の処置のための医薬品の製造におけるhTRTの発現を増大させる薬剤の使用である。必要に応じて、この医薬品は加齢の効果を阻害するためのものである。

【0194】

本発明のなおさらなる局面は、ヒト細胞内のテロメラーゼ活性のレベルの上昇と関連する状態の処置のための医薬品の製造における、テロメラーゼ活性のインヒビターの使用である。

【0195】

本発明のタンパク質、変異体、およびそのフラグメント、ならびにコードするポリヌクレオチドまたはそのフラグメントはまた、それぞれ薬剤としての使用のための本発明のさら

50

なる局面において提供される。

【0196】

本発明はさらに、本明細書中で定義されるそれぞれの場合における、医薬品の製造における（例えば、加齢またはガンの効果を阻害するための医薬品の製造における）、タンパク質、変異体、またはそのフラグメント、あるいはポリヌクレオチドまたはそのフラグメントの使用を含む。

【0197】

本発明の特定の実施態様において、hTRTポリヌクレオチドは、配列番号8の389ヌクレオチドのポリヌクレオチド以外、および/またはインサートを含むプラスミドであるクローン712562以外であり、このインサートの配列は図18（配列番号3）に示される。

10

【0198】

以下の記載は、論題により系統立てられる。第II部はさらに、TRTタンパク質のアミノ酸モチーフの特徴、およびこのようなモチーフを有するタンパク質をコードするTRT遺伝子を記載する。第III部～第VI部は、とりわけ、特にヒトのTRT関連組成物に焦点を置いて、本発明の核酸、タンパク質、抗体、および精製された組成物を記載する。第VII部は、とりわけ、ヒトの疾患の処置に有用な本発明の方法および組成物を記載する。第VIII部は、不死化ヒト細胞株の作製および同定を記載する。第IX部は、とりわけ、ヒトの疾患の診断のための、本発明の核酸、ポリヌクレオチド、および他の組成物の使用を記載する。第X部は、とりわけ、テロメラーゼ活性または発現を調節（例えば、阻害または促進）する薬剤および処置をスクリーニングおよび同定するのに有用な本発明の方法および組成物を記載する。第XI部は、とりわけ、トランスジェニック動物（例えば、テロメラーゼノックアウト動物および細胞）を記載する。第XII部は、第I部～第XI部で使用された用語の用語解説である。第XIII部は、本発明の特定の実施態様に関する実施例を記載する。論題および副次的な論題による本発明の記載の系統立ては、明確さを提供し、そしてどのような方法においても限定されない。

20

【0199】

II. TRT遺伝子およびタンパク質

本発明は、単離形態または組換え形態の、天然に存在する形態のこのような遺伝子およびタンパク質を含むがこれらに限定されない、テロメラーゼ触媒サブユニットタンパク質（すなわち、テロメラーゼ逆転写酵素）の配列を有する、単離されたおよび/または組換え遺伝子およびタンパク質を提供する。代表的には、TRTは、本明細書中に開示されるように、逆転写酵素（RT）およびテロメラーゼ特異的（T）アミノ酸モチーフを有する大きな塩基性のタンパク質である。これらのモチーフは多様な生物にわたって保存されているので、多くの生物のTRT遺伝子を、本発明の方法を用いて得ることができるか、または本発明のプライマー、核酸プローブ、および抗体（例えば、1つ以上のモチーフ配列に特異的なもの）を用いて同定し得る。

30

【0200】

他の逆転写酵素に見出されるものと類似であるが、TRTに見出される7つのRTモチーフは、特定の顕著な特徴を有する。例えば、図4に示すように、TRT RTモチーフ内に、他のRT間で高度に保存される残基中に多くのアミノ酸置換（矢印で示す）がある。例えば、モチーフCにおいては、活性部位金属イオンと配位結合する2つのアスパラギン酸残基（DD）（Kohlstaedtら、1992、Science 256: 1783; Jacobo-Molinaら、1993、Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 90: 6320; Patelら、1995、Biochemistry 34: 5351を参照のこと）が、他のRTにおける（F/Y）xDDhと比較して、テロメラーゼRTにおいてはhxDD(F/Y)の関係で存在する（ここで、「h」は、疎水性アミノ酸であり、そして「x」は任意のアミノ酸である; Xiongら、1990、EMBO J. 9: 3353; Eickbush, The Evolutionary Biology of Viruses, (S. Morse編, Raven Press, NY, 121頁, 1994)を参照のこと）。テロメラーゼサブグループの別の規則正しい変化の特徴はモチーフEに存在し、ここで、WxGxSxはコンセンサス配列であるかまたはテロメラーゼタンパク質間で保存されているが、hLGxxhは他のRTの特徴である（Xiongら、前出; Eickbush、前出）。このモチーフEは、「プライマーグリップ」

40

50

と呼ばれ、そしてこの領域における変異がRNAプライミングに影響するがDNAプライミングに影響しないことが報告されている (Powellら, 1997, J.Biol.Chem. 272: 13262)。テロメラーゼはDNAプライマー (例えば、染色体3'末端) を必要とするので、テロメラーゼがプライマーグリップ領域で他のRTと異なっているはずであることは意外ではない。さらに、モチーフAとモチーフB'との間の距離は、他のRTの典型的な距離よりもTRTで長い。これは、右手に似た構造の「フィンガー」領域内の挿入を示し得る (図3: Kohlstaedtら、前出; Jacobo-Molinaら、前出; およびPatelら、前出を参照のこと)。

【0201】

さらに、前述のように、モチーフTは、TRTタンパク質のさらなる顕著な特徴である。このモチーフTは、例えば、図4に示すように (W-L-X-Y-X-X-h-h-X-h-h-X-p-F-F-T-E-X-p-X-X-X-p-X-X-X-Y-X-R-K-X-X-W [Xは任意のアミノ酸であり、hは疎水性であり、pは極性である])、以下の式を用いて記載され得る配列からなる：

Trp-R₁-X₇-R₁-R₁-R₂-X-Phe-Phe-Tyr-X-Thr-Glu-X₈-₉-R₃-R₃-Arg-R₄-X₂-Trp、

ここで、Xは任意のアミノ酸であり、そして下付きは連続する残基の数をいい、R₁はロイシンまたはイソロイシンであり、R₂はグルタミンまたはアルギニンであり、R₃はフェニルアラニンまたはチロシンであり、そしてR₄はリジンまたはヒスチジンである。

【0202】

Tモチーフはまた、以下の式を用いて記載され得る：

Trp-R₁-X₄-h-h-X-h-h-R₂-p-Phe-Phe-Tyr-X-Thr-Glu-X-p-X₃-p-X₂-₃-R₃-R₃-Arg-R₄-X₂-Trp、

ここで、Xは任意のアミノ酸であり、そして下付きは連続する残基の数をいい、R₁はロイシンまたはイソロイシンであり、R₂はグルタミンまたはアルギニンであり、R₃はフェニルアラニンまたはチロシンであり、R₄はリジンまたはヒスチジンであり、hはAla、Leu、Ile、Val、Pro、Phe、Trp、およびMetから選択される疎水性アミノ酸であり、そしてpはGly、Ser、Thr、Tyr、Cys、Asn、およびGlnから選択される極性アミノ酸である。

【0203】

1つの実施態様において、本発明は、図11に例示されるモチーフ (例えば以下) の1つ以上を含む単離された天然に存在するTRTタンパク質、および組換えTRTタンパク質を提供する：

モチーフT W-X₁₂-FFY-X-TE-X₁₀-₁₁-R-X₃-W-X₇-I

モチーフT' E-X₂-V-X

モチーフ1 X₃-R-X₂-PK-X₃

モチーフ2 X-R-X-I-X

モチーフA X₄-F-X₃-D-X₄-YD-X₂

モチーフB' Y-X₄-G-X₂-QG-X₃-S-X₃

モチーフC X₆-DD-X-L-X₃。

示したTRTタンパク質が1つより多くのTRTモチーフを含む場合、その順序 (NH₂ -> COOH) は図11に示される通りである。

【0204】

1つの実施態様において、本発明は、以下のスーパーモチーフを含む単離された天然に存在するTRTタンパク質を提供する：

(NH₂)-X₃₀₀-₆₀₀-W-X₁₂-FFY-X-TE-X₁₀-₁₁-R-X₃-W-X₇-I-X₅-₂₀-E-X₂-V-X-X₅-₂₀-X₃-R-X₂-PK-X₄-₁₀-R-X-I-X-X₆₀-₈₀-X₄-F-X₃-D-X₄-YD-X₂-X₈₀-₁₃₀-Y-X₄-G-X₂-QG-X₃-S-X₈-X₅-₃₅-X₆-DD-X-L-X₃-X₁₀-₂₀-X₁₂-K。

【0205】

これらの試薬について本明細書中に開示されるTRT配列を含む試薬ならびに本明細書中に提供される方法および指針 (以下で記載される特定の方法論を含む) が提供されれば、TRT遺伝子およびタンパク質が当業者により得られ得、単離され得、そして組換え形態で産生され得ることは当業者には明らかである。例えば、TRTの特徴的なRTおよびTモチーフをコードする遺伝子配列にハイブリダイズするプライマー (例えば、縮重増幅プライマー

10

20

30

40

50

）が提供される。例えば、TモチーフのFFYXTE領域、他のTRTモチーフ（以下に議論するように）、またはモチーフまたはコンセンサス配列の組み合わせをコードする配列にハイブリダイズする1つ以上のプライマーまたは縮重プライマーが、標的生物のコドンの使用法に基づいて調製され得、そして標的生物から調製したゲノムDNAまたはcDNAからTRT遺伝子配列を増幅するために使用され得る。縮重プライマーの使用は、当該分野において周知であり、そして標的生物のコドン優先度および使用法を考慮し、そしてPCRのアニーリング工程における塩基のミスマッチを可能にするのに適切な増幅（例えば、PCR）条件を用いることにより、標的モチーフのアミノ酸を潜在的にコードし得る核酸配列のセットにハイブリダイズするプライマーのセットの使用を伴う。代表的には、2つのプライマーセットを用いる；しかし、1つのプライマー（またはこの場合、1つの縮重プライマーセット）増幅系が周知であり、そしてTRT遺伝子を得るために使用され得る。

10

【0206】

表1は、新規のTRT核酸を、特に脊椎動物（例えば、ヒトおよび他の哺乳動物）のものから増幅するために使用され得る本発明の例示的なプライマーを提供する。「N」は、4つ全てのヌクレオチドの等モル混合物であり、そして括弧内のヌクレオチドは示したヌクレオチドの等モル混合物である。

【0207】

【表1】

TRT 核酸の増幅のための 例示的な
系宿重 プライマー

<u>モチーフ</u>	<u>方向</u>	<u>5'- 配列 -3'</u>
a <u>FFYVTE</u>	正方向	TT(CT)TT(CT)TA(CT)GTNACNGA
b <u>FFYVTE</u>	逆方向	TCNGTNAC(GA)TA(GA)AA(GA)AA
c <u>RFIPKP</u>	正方向	(CA)GNTT(CT)AT(ACT)CCNAA(AG)CC
d <u>RFIPKP</u>	逆方向	GG(TC)TTNGG(TGA)AT(GA)AANC
e <u>AYDTI</u>	正方向	GCNTA(CT)GA(CT)ACNAT
f <u>AYDTI</u>	逆方向	TANGT(GA)TC(GA)TANGC
g <u>GIPOG</u>	正方向	GGNAT(ACT)CCNCA(AG)GG
h <u>GIPOGS</u>	逆方向	(GC)(AT)NCC(TC)TGNGG(TGA)ATNCC
i <u>LVDDFL</u>	正方向	(CT)INGTNGA(CT)GA(CT)TT(CT)(CT)T
j <u>DDFLVLT</u>	逆方向	GTNACNA(GA)NA(GA)(GA)AA(GA)TC(GA)TC

好ましいプライマーの組み合わせ (y = yes, n = no)

	<u>逆方向</u>				
<u>正方向</u>	b	d	f	h	j
a -	n	y	y	y	y
c -	n	n	y	y	y
e -	n	n	n	y	y
g -	n	n	n	n	y
i -	n	n	n	n	n

【 0 2 0 8 】

1つの実施態様において、増幅されたTRT核酸は、標的生物から作製されたライブラリー（例えば、cDNAライブラリー）に対するコロニーハイブリダイゼーションのためのハイブリダイゼーションプローブとして使用され、それによりTRTタンパク質コード配列全体またはその実質的な部分を有する核酸が同定および単離またはクローン化される。まさに記載したもののような試薬および方法を、本明細書中に記載される方法に従って用いて、以下に詳細に記載されるように、Oxytricha trifallaxおよびTetrahymena thermophilaのTRT遺伝子配列を得た。以前に特徴付けられなかったTRT遺伝子のクローン化の後に、配列が通常の方法により決定され得、そしてコードされるポリペプチドが合成され、そしてTRT活性（例えば、テロメラーゼ触媒活性）について（本明細書中に記載されるように、および/または当該分野で公知のテロメラーゼアッセイにより）アッセイされ得ることが認識される。

【 0 2 0 9 】

本発明の種々のクローン化方法のいずれかを用いてTRT遺伝子がクローン化され得ることもまた、当業者には明らかである。なぜなら、TRTモチーフ配列およびこのような配列を

10

20

30

40

50

含む本発明の核酸は、このような広範な種々の方法において使用され得るからである。例えば、実施例1に記載のように、公知のTRTの配列に基づくプローブを用いる、標的生物由来のDNAライブラリーまたは他の核酸ライブラリーへのハイブリダイゼーションが使用され得る。縮重PCRプライマーまたは前述のもののようなこれらの増幅産物がそれ自体標識され得、そしてハイブリダイゼーションプローブとして使用され得ることが評価される。別の実施態様において、発現クローン化方法が用いられる。例えば、TRTモチーフまたは他のTRTエピトープ（例えば、FFYXTEモチーフ）にまたがるペプチドに特異的に結合する1つ以上の抗体が、TRTタンパク質を含むリボソーム複合体およびそれをコードするmRNAを単離するために用いられ得る。本発明のこのような抗体を作製するために、ペプチド免疫原は、代表的には6アミノ酸と30アミノ酸との間の長さ、より多くの場合約10~20アミノ酸の長さである。抗体はまた、TRT配列をコードするクローンを同定するために、目的の生物に由来するcDNA発現ライブラリーをプローブするのに使用され得る。別の実施態様において、公知のTRTで保存される配列を含むDNAについてのDNAデータベースのコンピューター検索もまた、TRT配列を含むクローンを同定するために用いられ得る。

【0210】

1つの局面において、本発明は、天然に存在するTRTタンパク質のアミノ酸配列を有する単離されたまたは組換えのポリペプチドを含む組成物を提供する。通常、天然に存在するTRTは、約80,000ダルトン(D)と約150,000Dとの間、最も多くの場合約95,000Dと約130,000Dとの間の分子量を有する。代表的には、天然に存在するTRTは、pH7で正味の正電荷（代表的には9より大きな計算されたpI）を有する。1つの実施態様において、ポリペプチドは、本明細書中に定義されるようなテロメラーゼ活性を示す。関連する実施態様において、ポリペプチドはTRT特異的領域（Tモチーフ）配列を有し、そしてテロメラーゼ活性を示す。本発明はさらに、このようなポリペプチドのフラグメントを提供する。本発明はまた、TRTタンパク質をコードする天然に存在する遺伝子の配列を有する単離されたまたは組換えのポリヌクレオチドを提供する。本発明は、非脊椎動物（例えば、酵母）、および哺乳動物のような脊椎動物（例えば、マウスまたはヒト）からTRTの配列を単離するために有用な試薬を提供する。単離されたポリヌクレオチドは、他の天然に存在するあるいは組換えまたは合成のベクター核酸配列に関連し得る。代表的には、単離された核酸は、約300kbより小さく、しばしば約50kb未満であり、より多くの場合約20kb未満であり、頻繁には約10kb未満であり、そして時々約5kbまたは2kb未満の長さである。いくつかの実施態様において、単離されたTRTポリヌクレオチドは、約1kb未満または0.1kb未満の遺伝子フラグメント、プライマー、またはプローブのように、さらに小さい。

【0211】

III. 核酸

A) 概要

本発明は、Euplotes、Tetrahymena、S.pombe、またはヒトに由来する組換えTRT遺伝子のような、テロメラーゼ触媒サブユニットタンパク質（TRT）をコードするポリヌクレオチドの配列を有する単離されたそして組換えの核酸を提供する。例示的なポリヌクレオチドは、図13（Euplotes）；図15（S.pombe）；および図16（ヒト、GenBank受託番号AF015950）において提供される。本発明は、プローブ、プライマー、TRTタンパク質コードポリヌクレオチドなどを含む、TRT遺伝子配列を有するセンスおよびアンチセンスのポリヌクレオチドを提供する。

【0212】

B) ヒトTRT

本発明は、ヒト由来のテロメラーゼ触媒サブユニット（すなわち、hTRT）の配列を有する核酸を提供する。

【0213】

1つの局面において、本発明は、ヒトTRT遺伝子またはRNAの配列または部分配列を有するポリヌクレオチドを提供する。1つの実施態様において、本発明のポリヌクレオチドは、図16に示す配列番号1の配列またはその部分配列を有する。別の実施態様において、ポリ

ヌクレオチドは、配列番号3(図18)、配列番号4(図20)の配列、またはそれらの部分配列を有する。本発明はまた、本明細書中に開示されるhTRT核酸の配列に実質的な配列同一性を有するポリヌクレオチドを提供する。本明細書中に開示されるhTRT核酸の配列は、例えば、配列番号1[図16]、配列番号4[図20]、配列番号6[図21]、および配列番号7を包含するがこれらに限定されない。従って、本発明は、ヒトTRT遺伝子の天然に存在する対立遺伝子および本明細書中に開示されるhTRT核酸配列に関して1つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を有する変異ポリヌクレオチド配列を提供する。以下に記載されるように、変異核酸は、以下に記載される組換え法または合成法を用いて、あるいは他の手段により作製され得る。

【0214】

本発明はまた、ヒトTRT遺伝子の隣接領域に由来する配列を有する単離されたおよび組換えのポリヌクレオチドを提供する。このようなポリヌクレオチドは、hTRT mRNAの非翻訳領域のゲノム配列に由来するポリヌクレオチドを含む。代表的なゲノム配列を図21(配列番号6)に示す。実施例4に記載するように、配列番号6を、ヒトゲノムライブラリーから単離されたクローンG5を配列決定することにより得た。G5は、hTRTコード配列の5'側におよそ13,000塩基を含む15キロ塩基対(kbp)のインサートを含む。このクローンは、hTRTプロモーター配列および他のhTRT遺伝子調節配列(例えば、エンハンサー)を含む。

【0215】

本発明はまた、ヒトTRT遺伝子のイントロン領域に由来する配列を有する単離されたおよび組換えポリヌクレオチドを提供する。代表的なイントロン配列を、図21(配列番号7; 実施例3を参照のこと)に示す。いくつかの実施態様において、hTRTイントロンは、真核生物細胞におけるhTRTタンパク質の改良された発現のための「ミニ遺伝子」に含まれる。

【0216】

関連する局面において、本発明は、改変されたhTRTポリペプチド、変化したhTRTポリペプチド、および変異hTRTポリペプチドを含む、hTRTタンパク質またはタンパク質のフラグメントをコードするポリヌクレオチドを提供する。1つの実施態様において、コードされるhTRTタンパク質またはフラグメントは、図17(配列番号2)に示されるようなアミノ酸配列を有するか、または配列番号2の保存的置換を伴うアミノ酸配列を有する。1つの実施態様において、コードされるhTRTタンパク質またはフラグメントは、タンパク質の活性(例えば、テロメラーゼ触媒活性)を変化させる置換を有する。

【0217】

遺伝コードの縮重の結果として、hTRTタンパク質をコードする核酸が、天然に存在するhTRT遺伝子の配列を有する必要はないが、多数のポリヌクレオチドが配列番号2のアミノ酸配列を有するhTRTポリペプチドをコードし得ることが理解される。本発明は、公知のトリプレット遺伝コードに従ってなされる可能なコドン選択に基づいて組み合わせを選択することにより作製され得るヌクレオチド配列のそれぞれのそして全ての可能な変異を提供し、そしてすべてのこのような変異が本明細書により特に開示される。従って、いくつかの場合には天然に存在する配列のヌクレオチド配列にハイブリダイズし得る(適切に選択されたストリンジェンシーの条件下で)hTRTポリペプチドコードヌクレオチド配列が好ましいが、他の場合には実質的に異なるコドンの使用法を用い、それゆえおそらく天然に存在する配列を有する核酸にハイブリダイズしないhTRTをコードするヌクレオチド配列を作製することが有利であり得る。

【0218】

特定の実施態様において、本発明は、本明細書中に開示されるhTRT核酸の部分配列(例えば、配列番号1および6)を含む、hTRTオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを提供する。本発明の核酸は、代表的に、例示的なhTRTポリヌクレオチドの少なくとも約10、より多くの場合少なくとも約12、または約15の連続する塩基を含有する。しばしば、本発明の核酸は、例えば、ポリペプチドまたは完全長hTRTタンパク質の発現が意図される場合、より長い配列(例えば、少なくとも約25、約50、約100、約200、または少なくとも約50

10

20

30

40

50

0～3000塩基の長さ)を含む。

【0219】

なお他の実施態様において、本発明は、配列番号3または配列番号4のような天然に存在するかまたは天然に存在しないhTRTポリヌクレオチドに配列相同性または相補性を有する「182hTRT」ポリヌクレオチドを提供する。これらは、pGRN121に見出される182ヌクレオチドの配列(配列番号9[図24])を含まない(そしてまたクローン712562にも存在しない)。これらのポリヌクレオチドは、部分的に興味深い。なぜなら、これらは、pGRN121によりコードされるような「完全長」hTRTポリペプチド(配列番号2)に見出されるのとは異なる組み合わせまたは配置のTRTモチーフを含むポリペプチドをコードするからである。以下に議論するように、これらのポリペプチドが天然で(例えば、細胞内のテロメラーゼ発現の調節において)生物学的役割を果たし得、および/または治療剤として(例えば、野生型タンパク質の機能を阻害するドミナントネガティブ(dominant-negative)産物として)の用途が見出され得ること、あるいは例えば、本明細書中に記載されたような他の役割および用途を有し得ることが意図される。

10

【0220】

例えば、pGRN121によりコードされるポリペプチドとは対照的に、クローン712562は、およそ30kDの計算された分子量を有する259残基のタンパク質(本明細書では以後「712562 hTRT」)をコードする。712562 hTRTポリペプチド(配列番号10[図19])は、モチーフT、1、2、およびAを含むが、モチーフB'、C、D、およびEを含まない(図4を参照のこと)。同様に、治療活性および他の活性を有する変異hTRTポリペプチドは、pGRN121 cDNAと類似の核酸から発現され得るが、例えば、図20(配列番号4)に示される配列を有するクローン712562において失われている182塩基対を欠く。この核酸(本明細書では以後「pro90 hTRT」)は(これは、本明細書中に記載のような通常の合成または組換え法を用いて合成され得る)、配列番号1によりコードされるhTRTタンパク質と同じアミノ末端配列を共有するが、カルボキシ末端領域で異なる807残基(およそ90kDの計算分子量)のタンパク質をコードする(最初の763残基は共通であり、pro90 hTRTの最後の44残基が「完全長」hTRTとは異なる)。pro90 hTRTポリペプチドは、モチーフT、1、2、およびAを含むが、モチーフB、C、D、Eを含まず、従って、いくつかのテロメラーゼ活性は有し得るが、全てのテロメラーゼ活性は有さないようである。

20

【0221】

C) ヒトTRT核酸の産生

本発明のポリヌクレオチドは、hTRTをコードするポリペプチドまたはそのフラグメントの発現、天然に存在するhTRT遺伝子またはRNAのハイブリダイゼーションおよび/または増幅のためのセンスまたはアンチセンスのプロープまたはプライマーとしての使用(例えば、診断適用または予測適用)、および治療剤(例えば、アンチセンス、3重鎖、またはリボザイムの組成物)としての使用を含むがこれらに限定されない多くの用途を有する。本開示を精査すれば明らかであるように、これらの用途は、加齢、ガン、および受精能力、ならびに成長、生殖、および細胞に基づく産物の製造に関連するヒトの疾患の診断および処置に巨大な影響を有する。以下の節で記載するように、本発明のhTRT核酸は、当該分野で周知の技術を用いて作製(例えば、クローン化、合成、または増幅)され得る。

30

40

【0222】

1) クローン化、増幅、および組換え産生

1つの実施態様において、hTRT遺伝子またはcDNAは、hTRT mRNA、cDNA、またはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズする核酸プロープを用いてクローン化される。この目的に適切な1つのプロープは、図16(配列番号1)に提供される配列の全てまたは一部を有するポリヌクレオチド(例えば、その部分配列を含むプロープ)である。代表的には、標的hTRTゲノムDNAまたはcDNAは、ベクター(例えば、プラスミド、ファージ、ウイルス、酵母人工染色体など)に連結され、そしてゲノムまたはcDNAライブラリー(例えば、ヒトの胎盤cDNAライブラリー)から単離され得る。一旦、hTRT核酸が同定されれば、これは、当業者に公知の標準的な方法に従って単離され得る。hTRT遺伝子についてのヒトcDNAライブラリ

50

ーのスクリーニングの例示的な例を実施例1に提供する；同様に、ヒトゲノムライブラリーのスクリーニングの例は、実施例3および4に見出される。クローン化方法は周知であり、そして例えば、以下に記載される：Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1997)；BergerおよびKimmel (1987) Methods in Enzymology, 第152巻：Guide to Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc.；Sambrookら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、第1～3巻, Cold Spring Harbor Laboratory (本明細書では以後「Sambrook」)；Cashionら、米国特許第5,017,478号；およびCarr、欧州特許第0,246,864号。

【0223】

本発明はまた、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような増幅方法により単離されたhTRTのゲノムまたはcDNAの核酸を提供する。1つの実施態様において、hTRTタンパク質コード配列は、プライマー5'-GTGAAGGCACTGTTTCAGCG-3' (「TCP1.1」) および5'-CGCGTGGGTGAGGTGAGGTG-3' (「TCP1.15」) を用いて、RNAまたはcDNA試料 (例えば、2本鎖胎盤cDNA (Clontech, Palo Alto CA)) から増幅される。いくつかの実施態様において、特異性を増加させるために、例えば、「ネステッドPCR」用に、第3のプライマーまたは第2のプライマー対が用いられ得る。第2のプライマー対の1例は、5'-CTGTGCTGGGCCTGGACGATA-3' (「bIII TCP6」) および5'-AGCTTGTTCTCCATGTCGCCGTAG-3' (「TCP1.14」) である。hTRT核酸の増幅のために有用な多くの他のプライマーおよびプライマーの組み合わせが本発明により提供されることは当業者には明らかである。

【0224】

さらに、本発明は、hTRTゲノムDNA、cDNA、またはRNAの任意の特定の領域 (例えば、コード領域、プロモーター領域、および/またはイントロン) または部分配列を増幅するプライマーを提供する。例えば、配列番号1の274/275の位置のhTRTイントロン (実施例3を参照のこと) は、プライマーTCP1.57およびTCP1.52 (プライマー対1) またはプライマーTCP1.49およびTCP1.50 (プライマー対2) を用いて (例えば、ゲノムクローンの検出のために) 増幅され得る。(プライマー名は、以下の表2に列挙するプライマーをいう。) プライマー対は、個別にまたはネステッドPCRにおいて (ここで、プライマーセット1が最初に使用される) 使用され得る。別の例示的な例は、(例えば、cDNAクローンの大きさまたは完全性を評価するために) 特異的に増幅し、それゆえhTRT mRNAの5'末端またはhTRT遺伝子の5'末端をコードするエキソンを検出するプライマーに関する。以下のプライマー対は、hTRTの5'末端を増幅するために有用である：プライマーK320およびK321 (プライマー対3)；プライマーK320およびTCP1.61 (プライマー対4)；プライマーK320およびK322 (プライマー対5)。このプライマーセットは、セット5の次にセット4またはセット3、あるいはセット4またはセット5の次にセット3の順番で、ネステッドPCRにおいて使用され得る。さらに別の例示的な例は、mRNAのほぼ真ん中の3分の1 (the middle third) を含む保存されたhTRT TRTモチーフ領域を増幅または特異的に検出するために選択されたプライマーを含む (例えば、(例えば、非ヒト生物由来の) TRTクローンを同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用するために)。以下のプライマー対は、hTRT核酸のTRTモチーフ領域を増幅するために有用である：プライマーK304およびTCP1.8 (プライマー対6)、またはプライマーLT1およびTCP1.15 (プライマー対7)。このプライマーセットは、ネステッドPCR実験においてセット6の次にセット7の順番で使用され得る。

【0225】

適切なPCR増幅条件は、当業者に公知であり、そして1単位のTaqポリメラーゼ (Perkin Elmer, Norwalk CT)、100 μ Mの各dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、1 \times PCR緩衝液 (50mM KCl、10mM Tris、室温にてpH8.3、1.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチン) および0.5 μ Mプライマーを含み、94°にて45秒間、55°にて45秒間、および72°にて90秒間を約30サイクルの増幅操作を伴う (しかし、これらに限定されない)。他の熱安定性DNAポリメラーゼ、反応条件、およびサイクリングパラメーターもまた、適切な増幅を提供することが当業者に

10

20

30

40

50

は理解される。hTRT核酸を得るために使用され得る他の適切なインビトロ増幅方法は、本明細書中以下に記載のものを含むがこれらに限定されない。一旦増幅されれば、hTRT核酸は、所望であれば、通常の分子生物学的方法を用いて任意の種々のベクター中にクローン化され得るか、または検出され得るか、さもなければ本発明の方法に従って利用され得る。

【0226】

当業者は、上記のように得られたクローン化または増幅されたhTRT核酸が、化学合成、またはE.coliのような細菌系（例えば、Ausubelら、前出を参照のこと）、哺乳動物のような真核生物発現系に形質転換することによる複製のような他の方法を用いて調製または増加され得ることを認識する。同様に、hTRT RNAが、本発明のインビトロ方法に従って、または例えば、T7、T3、またはSP6のようなRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターを含む市販のベクターを用いるE.coliのような細菌系において、またはRNAポリメラーゼプロモーターを含むプライマーを用いるPCR増幅により生成したDNAの転写により発現され得る。

10

【0227】

本発明はさらに、変化または改変されたhTRT核酸を提供する。得られたクローン化または増幅されたhTRT核酸が、当該分野で周知の方法（例えば、部位特異的変異誘発、リンカースキニング変異誘発）により改変（例えば、短縮化、誘導体化、変化）され得るか、または下記のように新たに簡単に合成され得ることは、当業者により認識される。変化または改変したhTRT核酸は、hTRT遺伝子または遺伝子産物のクローン化または操作を容易にすること、あるいは変異hTRT遺伝子産物を発現することを含むがこれらに限定されない種々の適用に有用である。例えば、1つの実施態様において、hTRT遺伝子配列は、以下に詳細に議論するように、例えば、hTRTの保存されたモチーフにおける変異により、変化した特性または活性を有するhTRTポリペプチドをコードするように変化される。別の例示的な例において、hTRT核酸のタンパク質コード領域における変異は、グリコシル化のパターンを変化させる、コドン優先度を変化させる、スプライス変異体を産生する、プロテアーゼ感受性部位を除去する、抗原性ドメインを生じる、比活性を変化させるなどのために導入され得る。他の実施態様において、hTRTおよびその誘導体をコードするヌクレオチド配列は、コードされるアミノ酸配列を変化させずに変化される。例えば、より望ましい特性（例えば、天然に存在する配列から産生される転写物と比較して増加した転写効率あるいはより大きなまたはより短い半減期）を有するRNA転写物が産生される。さらに別の実施態様において、変化したコドンは、特定の原核生物または真核生物の発現宿主において生じるペプチドの発現速度を増加させるために、特定のコドンが宿主により利用される頻度に従って選択される。本発明の変異hTRTポリヌクレオチドを調製するために使用され得る有用なインビトロおよびインビボ組換え技術は、SambrookらおよびAusubelら（両方とも前出）に見出される。

20

30

【0228】

上記のように、本発明は、hTRT遺伝子の隣接（5'または3'）配列およびイントロン配列を有する核酸を提供する。この核酸は、とりわけ、興味深い。なぜなら、これらはhTRT調節に関与し、ならびにhTRTおよび他の組換えタンパク質またはRNA遺伝子産物の発現に有用であるプロモーターおよび他の調節エレメントを含むからである。配列番号6および7に提供される核酸配列に加えて、さらなるhTRTイントロンおよび隣接配列が、通常の分子生物学的方法を用いて容易に得られ得ることが明らかである。例えば、さらなるhTRTゲノム配列は、上記および実施例4に記載のクローンG 5（ATCC受託番号98505）から得られ得る。さらに他のhTRTゲノムクローンおよび配列は、配列番号1由来の配列または部分配列を有するhTRT核酸プローブを用いてヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られ得る。さらなるクローンおよび配列（例えば、さらにより上流）が、G 5に由来する標識された配列またはサブクローンをを用いて適切なライブラリーをプローブすることにより得られ得る。hTRT隣接配列をさらに特徴付けるための他の有用な方法は、Go bindaら、1993, PCR Meth.Applic. 2: 318; Trigliaら、1988, Nucleic Acids Res. 16:

40

50

8186; Lagerstromら, 1991, PCR Methods Applic. 1: 111; およびParkerら, 1991, Nucleic Acids Res. 19: 3055により記載される一般的な方法を含む。

【0229】

イントロン配列は、hTRTゲノム配列をhTRT cDNA配列と比較すること(例えば、実施例3を参照のこと)、S1分析(Ausubelら、前出、第4章を参照のこと)、または当該分野で公知の種々の他の手段のような通常的手段により同定され得る。イントロン配列はまた、細胞RNAの逆転写後に増幅またはクローン化され得る、ブレ mRNA(すなわち、スプライシングされていないかまたは不完全にスプライシングされたmRNA前駆体)中に見出され得る。

【0230】

所望の場合は、クローン化、増幅、さもなければ合成されたhTRTまたは他のTRT核酸の配列は、当該分野で周知のDNA配列決定方法(例えば、Ausubelら、前出を参照のこと)を用いて決定または確認され得る。配列決定の有用な方法は、DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント、Sequenase(US Biochemical Corp, Cleveland OH)、Taq DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer, Norwalk CT)、熱安定性T7ポリメラーゼ(Amersham, Chicago IL)、またはGibco BRL(Gaithersburg MD)により販売されるELONGASE増幅システムのような組換えポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼとの組み合わせのような酵素を用いる。オリゴヌクレオチド(例えば、化学合成により新たに作製されたオリゴヌクレオチド)の配列を配列決定または確認する場合、MaxamおよびGilbertの方法が好ましいかもしれない(MaxamおよびGilbert, 1980, Meth.Enz. 65: 499; Ausubelら、前出、第7章)。

【0231】

hTRTまたは他のTRT mRNAの5'非翻訳配列は、mRNAの逆転写およびその後の得られたcDNAのクローン化および配列決定のような標準的な方法を用いて、「完全長」hTRTまたは他のcDNAをクローン化することにより、直接決定され得る。より大きなcDNAを含むようにサイズにより選択された完全長cDNAをスクリーニングまたは増幅するために好ましいオリゴ(dT)プライムライブラリーが、好ましいかもしれない。ランダムプライムライブラリーもまた適切であり、そしてしばしば遺伝子の5'領域を含むより大きな部分のクローンを含む。Frohmanら, 1988, Proc.Nat.Acad.Sci USA 85: 8998に記載されるRACEプロトコルのような、5'RNA配列を得るための他の周知の方法もまた使用され得る。所望である場合、hTRTまたは他のTRTのmRNAの転写開始部位が、本明細書中に提供される核酸(例えば、配列番号1の配列を有する)を用いて、通常の方法により決定され得る。1つの方法は、配列番号1の5'領域に由来する配列を有する標識されたDNAを用いるS1ヌクレアーゼ分析(Ausubelら、前出)である。

【0232】

2) 核酸の化学合成

本発明はまた、直接化学合成により生成されるhTRTポリヌクレオチド(RNA、DNA、または修飾された)を提供する。化学合成は、一般的に、オリゴヌクレオチドの生成に、または非標準的ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド(例えば、プローブ、プライマー、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド)に好ましい。核酸の直接化学合成は、当該分野で公知の方法により達成され得、例えば、Narangら、1979, Meth. Enzymol. 68:90のホスホトリエステル法; Brownら、Meth. Enzymol. 68:109 (1979)のホスホジエステル法; Beaucageら、Tetra. Lett., 22:1859 (1981)のジエチルホスホルアミダイト法; および米国特許第4,458,066号の固体支持体法がある。化学合成は、代表的には、一本鎖オリゴヌクレオチドを生成し、これは相補配列とのハイブリダイゼーションによって、またはテンプレートとして一本鎖を用いるDNAポリメラーゼおよびオリゴヌクレオチドプライマーでの重合化によって、二本鎖DNAに変換され得る。DNAの化学合成は、しばしば、約100または150塩基の配列に限定されるが、より長い配列は、より短い配列の連結によって、またはより精巧な合成方法によって得られ得ることが、当業者には認識される。

【0233】

本発明のhTRT（あるいはhTRまたは他の）ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドが、所望の特性（例えば、増加したヌクレアーゼ耐性、より堅い結合、安定性、または所望の T_m ）を与えるために、非標準塩基（例えば、アデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジン以外）または非標準骨格構造を用いて作製され得ることが認識される。オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼ耐性にするための技法には、PCT公開公報W0 94/12633に記載される技法が挙げられる。広範な種々の有用な修飾されたオリゴヌクレオチドが生成され得、ペプチド-核酸（PNA）骨格（Nielsenら、1991, Science 254:1497）を有するオリゴヌクレオチド、または2'-O-メチルリボヌクレオチド、ホスホロチオエートヌクレオチド、メチルホスホネートヌクレオチド、ホスホトリエステルヌクレオチド、ホスホロチオエートヌクレオチド、ホスホルアミデートを組み込んだオリゴヌクレオチドが挙げられる。さらに他の有用なオリゴヌクレオチドは、2'位に以下の1つを含むアルキルおよびハロゲンで置換された糖部分を含み得る：OH、SH、SCH₃、F、OCN、OCH₃OCH₃、OCH₃O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nNH₂、またはO(CH₂)_nCH₃、ここで、nは1～約10である；C₁～C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、またはアラキル；Cl；Br；CN；CF₃；OCF₃；O-、S-、またはN-アルキル；O-、S-、またはN-アルケニル；SOCH₃；SO₂CH₃；ONO₂；NO₂；N₃；NH₂；ヘテロシクロアルキル；ヘテロシクロアルカリル；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノ；置換シリル；RNA切断基；コレステリル基；葉酸基；レポーター基；インターカレーター；オリゴヌクレオチドの薬物動態学特性を改良するための基；あるいはオリゴヌクレオチドおよび同様の特性を有する他の置換基の薬力学特性を改良するための基。葉酸、コレステロール、またはオリゴヌクレオチドの取り込みを促進する他の基（例えば、脂質アナログ）は、任意のヌクレオシドの2'位で、あるいは3'末端または5'末端のヌクレオシドのそれぞれ3'または5'位で、直接またはリンカーを介して結合され得る。1つ以上のこのような結合体を使用され得る。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル基の代わりにシクロブチルのような糖模倣物を有し得る。他の実施態様は、少なくとも1つの修飾された塩基形態またはイノシンのような「普遍塩基」、あるいは、キューオシン（queosin）およびワイブトシン（wybutosine）のような他の非標準塩基ならびに内因性エンドヌクレアーゼにより容易に認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミジン、およびウリジンのアセチル、メチル、チオ、および同様に修飾された形態の含有物を含み得る。本発明はさらに、例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-チオアセタール、メチレン（メチリミノ）、3'-N-カルバメート、モルホリノカルバメート、キラルメチルホスホネートのような骨格アナログを有するオリゴヌクレオチド、短鎖アルキルまたはシクロアルキル糖間結合、短鎖ヘテロ原子またはヘテロ環糖間（「骨格」）結合、またはCH₂-NH-O-CH₂、CH₂-N(CH₃)-OCH₂、CH₂-O-N(CH₃)-CH₂、CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂、およびO-N(CH₃)-CH₂-CH₂骨格を有するヌクレオチド（ここで、ホスホジエステルはO-P-O-CH₂である）、またはこれらの混合物を提供する。モルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチドもまた有用である（米国特許第5,034,506号）。

【0234】

有用な参考文献としては、Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, F. Eckstein編, IRL Press at Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, 600巻, BasergaおよびDenhardt編 (NYAS 1992); Milliganら、1993年7月9日, J. Med. Chem. 36(14):1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press)その全体および特にSanghviによる「核酸のヘテロ環塩基修飾およびアンチセンスオリゴヌクレオチドにおけるその適用」という表題の15章、Antisense Therapeutics, Sudhir Agrawal編 (Humana Press, Totowa, New Jersey, 1996)が挙げられる。

【0235】

D) 核酸の標識

例えば、hTRTまたは他のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが核酸プローブとして用いられるべき場合、本発明の核酸を標識することはしばしば有用である。標識（以下

10

20

30

40

50

を参照のこと)は、当業者に周知の多くの手段により組み込まれ得る。1つの実施態様では、増幅されていない核酸(例えば、mRNA、ポリA mRNA、cDNA)が標識される。標識された核酸を生成する手段は、当業者に周知であり、そして、例えば、ニックトランスレーション、ランダムプライマー標識、末端標識(例えば、キナーゼを用いて)、および化学結合(例えば、光ビオチン化)または合成が挙げられる。他の実施態様では、標識は、試料核酸の調製における増幅工程中に同時に組み込まれる。したがって、例えば、標識されたプライマーまたは標識されたヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または他の核酸増幅方法は、標識された増幅産物を提供する。他の実施態様では、標識されたヌクレオチド(例えば、フルオレセイン標識UTPおよび/またはCTP)を用いる転写増幅が、転写された核酸中に標識を組み込む。増幅産物はまた、またはあるいは、増幅が完了した後に標識され得る。

10

【0236】

E) 例示のオリゴヌクレオチド

上記および以下に詳細に論じるように、オリゴヌクレオチドは、プライマー、プローブ、治療剤、または他のアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖オリゴヌクレオチドとしての用途を含む種々の用途、ならびに本開示から明らかな多くの他の用途について、使用される。表2~6は、本発明の実施に使用され得るある例示の特定のオリゴヌクレオチドを提供する。本発明の多くの他の有用なオリゴヌクレオチドは、当業者によって本明細書中に提供される指針に従って合成され得る。

【0237】

表2~6において、「seq」は、そのプライマーが配列決定に用いられたかまたは有用であることを意味し；「PCR」は、そのプライマーがPCRに用いられたかまたは有用であることを意味し；「AS」は、そのプライマーがテロメラーゼ活性のアンチセンス阻害に用いられたかまたは有用であることを意味し；「CL」は、そのプライマーがhTRT遺伝子またはRNAのクローニング領域に用いられたかまたは有用であることを意味し；「mut」は、そのプライマーがhTRT遺伝子または遺伝子産物の変異体を構築するために用いられたかまたは有用であることを意味する。「UC」は「大文字」を意味し、そして「lc」は「小文字」を意味する。ミスマッチおよび挿入(配列番号1に対して)を下線により示し；欠失を「-」により示す。表2~6においては、任意の1つの用途またはセットの用途への任意の特定のオリゴヌクレオチドの使用を制限することは意図されないことが理解される。

20

30

【0238】

【表2】

有用なオリゴヌクレオチド

オリゴ	注記	シマック?	用途			
			seq	PCR	AS	CL MUT
TCP1.1	GTGAAGGCACTGTTACGG		x	x		
TCP1.2	GTGGATGATTCTTGTTGG		x	x		
TCP1.4	CTGGACACTCAGCCCTTGG		x	x		
TCP1.5	GGCAGGTGTCTGGACACT		x	x		
TCP1.6	TTTGATGATGCTGGCGATG		x	x		
TCP1.7	GGGGCTGTTCTTCTACAGG	Y	x	x		
TCP1.8	CAGCAGGAGGATCTTTAG		x	x		
TCP1.9	TGACCCCAAGGAGTGGCAGG		x	x		
TCP1.10	TCAAGCTGACTCGACACCG		x	x		
TCP1.11	CGGCGTGACAGGGCTGC		x	x		
TCP1.12	GCTGAAGGCTGAGTGTC		x	x		
TCP1.13	TAGTCCATGTTACAAATCG	-	x	x		
TCP1.14	CTGTGCTGGCCCTGGACGATA		x	x		
TCP1.15	CGGTGGGTGAGGTGAGGTG		x	x		
TCP1.16	TTTCCGTGTGAGTGTTC		x	x		
TCP1.17	GTACCCGTGTGGGCAGG		x	x		
TCP1.19	GCTACCTGCCCAACACGG		x	x		
TCP1.20	GC CGAAGAACGTGCTGG		x	x		
TCP1.21	CA-CTGCTCCCTTGTGGCCTG	Y	x	x		
TCP1.22	TTCCCAAGGACTTTGTTGC		x	x		
TCP1.24	TGTTCTCAAGACGGCACTG	Y	x	x		
TCP1.25	TACTGCGTGCCTCGGTATG		x	x		
TCP1.26	GGTCTTGGGGCTGAAGTGT		x	x		
TCP1.27	TGGTTACCTGCTGGCAGG		x	x		
TCP1.28	GTGGTTTCTGTGTGTGTC		x	x		
TCP1.29	GACACACACAGAAACCAC		x	x		
TCP1.30	GTGCCAGCAGGTGAACCAG		x	x		
TCP1.32B	GCAGTGGCTCTTGAGGAGC		x	x		
TCP1.33	TGGAACCATAGCGTCAGGGAG		x	x		
TCP1.34	GGCTCCCTGACGGCTATGGTT		x	x		
TCP1.35	GC(GT)CGGCGCTGCCACTCAGG		x	x		
TCP1.35i	GCTCGGCGCTGCCACTCAGG		x			
TCP1.36	ACGCCGAGACCAAGCACTTC		x			

【 0 2 3 9 】

【 表 3 】

10

20

30

40

(続き)

TCPI.38	CCAAAGAGGGTGGCTTCTTCG	x	x
TCPI.39	AAGGCCAGCACGTTCTTCGC	x	x
TCPI.40	CACGTTCTGGCGGCGCTG	x	x
TCPI.41	CTTCAACACACGCGTGCG	x	x
TCPI.42	GGGACGACGTTGCTGGTTC	x	x
TCPI.43	GGCTCAGGGGCAGCGCCAC	x	x
TCPI.44	CTGGCAGGTGTACGGCTTC	x	x
TCPI.45	GGGTGGACCGAGTGACCGTGGTTTC	x	x
TCPI.46	GACGTGGTGGCGCGCATGTGG	x	x
TCPI.47	GAAGTCTGCGGTTGCCCAAGAG	x	x
TCPI.48	GACACCACACAGAAACACGATCAC	x	x
TCPI.49	CGCCCGCTCTTCTGCCAGGT	x	x
TCPI.50	CGAAGCGGAAGGCCAGCACGTTCTT	x	x
TCPI.51	GGTGGCCGAGTGTGCAGAGG	x	x
TCPI.52	GTAGCTGGCAGCGTGGTGTGAAG	x	x
TCPI.53	TGGCGAGGAGCGTGTGTTCA	x	x
TCPI.54	TATGTTTCCAGGCCGTTCCGATCC	x	x
TCPI.55	CCAGCTGGCGCTACGAGGTGTGC	x	x
TCPI.56	GGCTTCCCTGACGCTATGTTCCAG	x	x
TCPI.57	GGTGTGCGCGCTGGCCACGTTGG	x	x
TCPI.58	TCCAGGGCACGCGACACCGGCACT	x	x
TCPI.59	GTACAGGGCACACCTTTGGTCACTC	x	x
TCPI.60	TGGACGAGGTACACACTCATCAGCC	x	x
TCPI.61	AGCGGCAGCACCTCCGGTAGTGCC	x	x
TCPI.62	CCACCAAGCTCTTCAGGCAGGACAC	x	x
TCPI.63	CCAGGGCTTCCCGACGTCGCGAGCAG	x	x
TCPI.64	CGCACGAACGTGGCCAGCGGCAACA	x	x
TCPI.65	TGACCGTGGTTTCTGTGGTGT	x	x
TCPI.66	CCCTCTTCAAGTGTCTGTGATTC	x	x
TCPI.67	ATCGCGGCCACACGTCCT	x	x
TCPI.68	TGCTCCAGACACTCGGCGCGGTAGAA	x	x
TCPI.69	ACGAAGCCGTACACCTGCC	x	x
TCPI.72	CGACATCCCTGCGTTCTTGGCTTTC	x	x
TCPI.73	CACCTGTGGCTCATTCAGGG	x	x
TCPI.74	GGGACATGGAGAACAAAGC	x	x
TCPI.75	GCAGCCATACTCAGGGACAC	x	x
TCPI.76	CCATCCCTCTCCACCGCTGCTC	x	x

【 0 2 4 0 】

【 表 4 】

10

20

30

(続き)

【 0 2 4 1 】
【 表 5 】

TCPI.77	GCGATGACCTCGGTGAGCCTG	X	X
TCPI.78	CCGAGGACAGGCTCACGGA	X	X
biHTCP1	CCCTTTCAGTGTCTGTGATCC	X	X
biHTCP2	CACTCGACGACGTACACACTCATC	X	X
biHTCP4	CTGAGGTCCAGACTCCGCTTCAT	X	X
biHTCP6	AGCTTGTCTCCATGTGCGCTAG	X	X
rpprim01	GACCTGAGCAGCTCGACGTACACACTCATC	X	X
L11	GTCTCGAGCTGCTCAGGTC	X	X
L12	AGCAGCTGAACAGTGCCTT	X	X
L13	GACCTGAGCAGCTCGACGAC	X	X
L14	AAGGCACCTGTTCAAGCTGCT	X	X
L15	CGGCGGAGTGTCTGGAGCA	Y	X
L16	GGATGAAGCGGAGTCTGGA	X	X
BamHI.L17	ATGGATCCGTCGTCGAGCTGCTCAGGTCT	Y	X
SalI.L18	AICAGCTGAGCAGCTGAACAGTGCCTTC	Y	X
K303	GTCTCCGTGACATAAAGAAAGAC	X	X
K304	GCCAAAGTTCCTGCACTGGCT	X	X
K305	GCTGTCTCTTTTGAACGTTGGTCT	X	X
K306	XXGCTGTCTCTTTGAACGTTGGTCT	X	X
K311	GTCAAGATGCCCTGAGATAGAAC	X	X
K312	TGCTTAGCTTGTGGGGTGTCA	X	X
K313	TGCTTAGCTTGTGGGGTGTCA	X	X
K320	GCTGCTCCTGCTGGCACGT	X	X
K321	CAGCGGGAGCGCGCGGCATC	X	X
K322	TGGGCCACCAAGCGCGCGGAAA	X	X
slanti.1	CGGCGCGCAGCCCGTCAGGCTTGGGG	X	X
slanti.2	CGGACAGCTCCCGCAGCTGCACCC	Y	X
slanti.3	CGTACACACTCATCAGCCAGTGCAGGAACTTGGC	Y	X
slanti.4	CGGCGCGCTCGTAGTTGAGCACGCTGACAGTGCCTTC	X	X
slanti.5	GCGGAGTCTGGACGTACGACGGCGGGGCTGGCTTCCCG	X	X
UTR2	ATTTGACCCACAGGGACCCCCATCCAG	X	X
FW5	ATGACCGCCCTCCTCGTGAG	X	X
Nam1	GCCACCCCGCGATGCC	X	X
Nam2	AGCCTGGCCCCCGCCA	X	X
Nam3	TCCCACGTGGGCAGCAG	X	X
Nam4	AGCAGGACGACGCTG	X	X
PE01	CGCGGTAGTGGCTGGCAGCAGGGAGCGCACGGC	X	X

BamHI 部位
PvuII 部位(SalI 部位)

X = ビーズン = K305

10

20

30

(続き)

SLW F3C	cgggaattcgtagtacttgaGATCCCCCTGGCACTGGACG	UC = hTRT seq, lc = BamHI 1 部位 + 2 停止コドン GST融合構築物について (2426 ~ 3274) UC = hTRT seq, lc = EcoRI 1 部位 + 3 停止コドン	x	x
SLW F4N	SLW F3N / SLW F3C pGRN121の887ヌクレオチドを増幅する (2426 ~ 3274) gcggaattcgtagtacttgaATCCCCGACGGGCTCCATCCIC	GST融合構築物について (3272 ~ 4177) UC = hTRT seq, lc = BamHI 1 部位 + 2 停止コドン	x	x
SLW F4C	cgggaattcgtagtacttgaGTCCAGGATGGTCTTGAAAGTIC	GST融合構築物について (3272 ~ 4177) UC = hTRT seq, lc = EcoRI 1 部位 + 3 停止コドン	x	x
40-60	SLW F4N / SLW F4C pGRN121の944ヌクレオチドを増幅する (3272 ~ 4177) GGCATCCGCGGGGTGGCCGGG	ホスホロチオエート		x
260-280	GGACACCTTGGCGGAAAGAGGG	ホスホロチオエート		x
500-520	GCGTCCACAGCAGGTGAAACCAAG	ホスホロチオエート		x
770-790	CTCAGGGGCGAGCGCCACGGCT	ホスホロチオエート		x
885-905	AGGTGGCTTCTTCGGCGGGTC	ホスホロチオエート		x
1000-1020	CAACAAAGGCGTGTCCAGGGA	ホスホロチオエート		x
1300-1320	GCTGGGGTGACCCGACGCTCGC	ホスホロチオエート		x
1520-1540	GATGAACCTTCTGGGTGTCCT	ホスホロチオエート		x
2110-2130	GTGCGCCAGGCCCTGTGGATA	ホスホロチオエート		x
2295-2315	GCCCATGGCGGGCTTCTGGA	ホスホロチオエート		x
2450-2470	GAGGCCACTGCTGGCCCTCAT	ホスホロチオエート		x
2670-2690	GGGTGAGGTGAGGTGTACCA	ホスホロチオエート		x
3080-3110	GCTGCAGCACACATGGTGAAACCTGTACCG	ホスホロチオエート		x
3140-3160	GACCGCAGGAAATGTGGG	ホスホロチオエート		x
3690-3710	CCGAGGCCACGCTGTGGGA	ホスホロチオエート		x
55-75	CAGCGGGGAGCGCGCGGCATC	ホスホロチオエート		x
151-171	CAGCACCTCGCGGTAGTGCT	ホスホロチオエート		x
TP1.1	TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG	ホスホロチオエート	x	x
TP1.2	CCCGAGTGAATCTTCTACGC	ホスホロチオエート	x	x
TP1.3	GTCTCTGGCAGTTCTCTCATCCC	ホスホロチオエート	x	x
TP1.4	TTTAGGCATCTCTCCCAAGCACA	ホスホロチオエート	x	x

【 0 2 4 3 】

IV. TRTタンパク質およびペプチド

A) 一般

本発明は、特に、テロメラーゼ活性の産生、細胞内でのテロメラーゼ活性の阻害、抗TRT免疫応答の誘導に有用な種々の広範囲のhTRTタンパク質を、治療剤として、または臨床アッセイでの標準あるいはコントロールとして、hTRTまたはテロメラーゼの活性を活性化または阻害し得る化合物のスクリーニングでの標的として提供し、そして、当業者に明白であるか、またはそうでなければ本明細書中に記載されている多数のその他の使用を提供する。本発明のhTRTは、以下に例示を目的として詳細に記載されているように、(例えば、

10

20

30

40

50

テロメラーゼ陰性細胞でのテロメラーゼ活性を確認するために有用な) 機能的に活性なタンパク質および(例えば、細胞でのテロメラーゼ活性を阻害するために有用な) 変異体、不活性変異体、hTRTポリペプチド、ならびに、天然に存在するhTRTおよびテロメラーゼの1種、数種、または全ての機能活性を示すテロメラーゼRNP(例えば、タンパク質を含有するリボ核タンパク質複合体)を包含する。

【0244】

1つの実施態様では、本発明のhTRTタンパク質は、図17(配列番号2)に示される配列、あるいはそのフラグメントを有するポリペプチドである。別の実施態様では、hTRTポリペプチドは、アミノ酸残基の内部の欠損、挿入、または保存的置換によって、配列番号2とは異なる。関連の実施態様では、本発明は、配列番号2と実質的な類似性を有するhTRTポリペプチドを提供する。本発明はさらに、配列番号2のアミノ酸配列に関して、例えば、切形、変異、誘導体化、または他の配列との融合(例えば、融合タンパク質を形成する)の様式で、改変されたhTRTポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、テンプレートRNA(例えば、hTR)と複合体化された本発明のhTRTタンパク質を含有するテロメラーゼRNPを提供する。他の実施態様では、1種以上のテロメラーゼ会合タンパク質は、hTRTタンパク質および/またはhTRと会合する。

10

【0245】

本発明はまた、配列番号5(図20)、配列番号10(図19)の配列、またはそれらと実質的な類似性を有するタンパク質、およびそのフラグメント、変異体または誘導体のような他の天然に存在するhTRT種または天然に存在しない変異体を提供する。

20

【0246】

本発明は、さらに、他のhTRT種および変異体を提供する。hTRT変異体の1つの例は、クローン712562(配列番号3(図18))または配列番号4(図20)に示されるpro90変異体hTRTによりコードされるmRNAのリボソームフレームシフトより得られ得、従って、全TRTモチーフを有するhTRTポリペプチドを合成し得る(一般的な例は、例えば、Tsuchihashiら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2516; Craigengenら、1987, Cell 50:1 Weiss, 1990, Cell 62:117を参照のこと)。リボソームフレームシフトは、特定のmRNA配列または二次構造が、リボソームを停止させ、そして配列中で1ヌクレオチドを前方または後方に飛ばすときに、生じ得る。従って、712562 mRNAでのリボソームフレームシフト事象は、約523アミノ酸残基ポリペプチドの合成をなし得る。pro90配列でのリボソームフレームシフト事象は、約1071残基を有するタンパク質をもたらし得る。リボソームフレームシフトから得られるタンパク質はまた、本発明によって提供される合成または組換え法によって発現され得ることが理解される。

30

【0247】

ヒトTRTタンパク質、ペプチド、および機能的に等価のタンパク質が、下記により詳細に議論されているような、精製、化学合成、または組換え産生によって得られ得る。

【0248】

B) TRTタンパク質活性

本発明のTRTポリペプチド(フラグメント、変異体、オルタナティブ(alternative)対立遺伝子産物、および融合タンパク質を含む)は、天然hTRTに関連する1つ以上または全ての機能活性を有し得る。本明細書に使用されているように、記載以外にhTRTまたは他のTRTポリペプチドは、活性が、会合RNA(例えば、hTR)を有さないhTRTタンパク質またはhTRT会合RNA(例えば、hTR)複合体中のhTRTタンパク質のいずれかによって示されるときには、特定の活性を有すると考えられる。hTRTのhTR結合活性は、hTRTタンパク質に関連する活性の1つの例である。本発明の核酸(例えば、hTR)およびhTRTポリペプチドの複合体を産生する方法は、以下に記載される。

40

【0249】

hTRTタンパク質の、天然hTRTと異なる補体活性を有するような改変(例えば、hTRTポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの変異または改変、または天然ポリヌクレオチド配列と異なる配列を有するポリヌクレオチドの化学合成を含む、化学的または組換え方法に

50

よる)は、治療適用、あるいはhTRTまたはテロメラーゼの活性の特異的モジュレーターのスクリーニングに有用であり得る。さらに、種々のhTRT活性についてのアッセイは、hTRTまたはテロメラーゼと相互作用してテロメラーゼ活性を変化させる薬剤(例えば、活性調節剤)を同定するのに特に有用であり得る。

【0250】

下記に議論されているように、天然hTRTの活性は、以下を包含する：テロメラーゼ触媒活性(前進(processive)活性または非前進(non-processive)活性のいずれかであり得る)；テロメラーゼ前進性；従来の逆転写活性；ヌクレオチド分解活性；プライマーまたは基質(テロメアまたは合成テロメラーゼ基質またはプライマー)結合活性；dNTP結合活性；RNA(すなわち、hTR)結合活性；およびタンパク質結合活性(例えば、テロメラーゼ会合タンパク質、テロメア結合タンパク質、またはタンパク質-テロメリックDNA複合体への結合)。しかし、本発明はまた、任意の特定のhTRT活性を有さないが、hTRTまたは他のTRTタンパク質(例えば、特定の典型的に短い免疫原ペプチド、阻害性ペプチド)に関連するなんらかの有用活性を有するhTRT組成物を提供することが理解される。

【0251】

1) テロメラーゼ触媒活性

本明細書で使用されているように、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドが、テンプレート核酸(例えば、hTR)によってコードされる配列の1つの反復(例えば、TTAGGG)の、部分的、1つ、または2つ以上の付加によってテロメラーゼ基質として機能するDNAプライマーを伸長し得るとき、「テロメラーゼ触媒活性」を有する。この活性は、前進的または非前進的であり得る。前進活性は、DNAが酵素複合体によって放出される前に、テロメラーゼRNPがプライマーまたはテロメラーゼに複数の反復を付加するときに生じる。非前進活性は、テロメラーゼが、プライマーに、部分的、または1つのみの反復を付加し、そして放出されるときに、生じる。しかし、インビボにおいて、非前進反応は、引き続く一連の会合、伸長、および解離により、複数の反復を付加し得る。これはインビトロにおいて同様に生じ得るが、標準的なアッセイでのテロメラーゼを超える大過剰モルのプライマーによる標準的なアッセイ条件下では典型的に観察されない。

【0252】

非前進活性を有するとしてhTRTポリペプチドを特徴づけるために、従来のテロメラーゼ反応が、典型的に最高の効果を有する温度およびdGTPを伴う、非前進反応に好ましい条件、例えば、高温(すなわち、35~45℃、典型的には37℃)、低dGTP濃度(1μM以下)、高プライマー濃度(5μM以上)、および高dATP/TTTP濃度(2mM以上)を用いて実施される。前進活性を有するとしてhTRTポリペプチドを特徴づけるために、従来のテロメラーゼ反応が、典型的に最も臨界的である温度およびdGTP濃度を伴う、非前進反応に好ましい条件(例えば、27~34℃、典型的には30℃)、高dGTP濃度(10μM以上)、低プライマー濃度(1μM以下)、および/または低dATPおよびTTTP濃度(0.3-1mM)を用いて、実施される。あるいは、TRAPアッセイ(前進活性または適度な前進活性について)、またはドットプロットアッセイおよびゲルプロットアッセイ(前進活性について)が使用され得る。本発明のhTRTポリペプチドは、非前進活性を有し得るが、前進活性(例えば、hTRTポリペプチドの代替が、転位(translocation)する能力を減少または除去するときに)は、単に前進的であり得るか、または両方の活性を有し得る。

【0253】

a) 非前進活性

非前進テロメラーゼ触媒活性は、3'末端がRNAテンプレートにアニールする位置からテンプレート配列の5'末端にDNAプライマーを伸長し得、典型的には最初のG残基の付加で終わる(例えば、テンプレートがhTRである場合)。表7に示されているように、付加されるヌクレオチドの正確な数は、TTAGGG反復配列におけるプライマーの3'末端ヌクレオチドの位置に依存する。

【0254】

【表7】

10

20

30

40

50

非前進活性

i) -----TTAGGGtttag (DNA)
 3'-----AUCCCAAUC-----5' (RNA)

ii) -----TTAGgggttag (DNA)
 3'-----AUCCCAAUC-----5' (RNA)

In DNA, UC = プライマー, lc = 付加ヌクレオチド

10

【0255】

従って、4ヌクレオチドが、--TTAGGGプライマーに付加され(i)、一方、6ヌクレオチドが--TTAGプライマーに付加される(ii)。前進反応においてテロメラーゼによって付加される最初の反復は、この工程と等価である；しかし、前進反応では、テロメラーゼは、3'末端が放出され、別の反復のプライマー付加に十分な位置でのテンプレートの3'領域で再結合する転位工程を実施する(Morin, 1997, Eur. J. Cancer 33:750を参照のこと)。

【0256】

完全な非前進反応は、1つの合成プライマーを使用して、従来のアッセイにおいて1バンドのみを産生する。この得られたものはまた、末端トランスフェラーゼ活性のような他の酵素によって産生され得るので、産物がテロメラーゼ触媒活性の結果であることを証明することは、いくつかの適用で望まれ得る。テロメラーゼ(hTRTを有する)により生じたバンドは、いくつかのさらなる特徴によって区別され得る。プライマー末端に付加されるヌクレオチド数は、プライマー3'末端の位置に一致するはずである。従って、--TTAGGGプライマーは、4ヌクレオチドが付加するはずであり、--TTAGプライマーは、6ヌクレオチドが付加するはずである(上記を参照のこと)。実際に、2つ以上の配列が入れ換ったプライマーが使用され得、これらは、同じ全長を有するが、異なる5'終端および3'終端を有する。例として、プライマー5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGおよび5'-GTTAGGGTTAGGGTTAGGGの非前進伸長は、その絶対長が1ヌクレオチド差である産物を生成し得る(22ntの全長のために5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGに4つが付加され、23ntのために全長のために5'-GTTAGGGTTAGGGTTAGGGに5つが付加される)。反応のヌクレオチド依存性は、プライマー末端の位置に一致するはずである。従って、--TTAGGGプライマー産物は、dGTP、TTP、およびdATPを要求するが、dCTPは必要としないはずであり、そして---AGGGTTプライマー産物は、dGTPおよびdATPを要求し、TTPまたはdCTPを必要としないはずである。活性は、hTRを分解して、その結果テンプレート除去する条件下でのRNAaseまたはミクロコッカスヌクレアーゼの前処理に対して感受性であるはずである(Morin, 1989, Cell 59:521を参照のこと)。

20

30

【0257】

b) 前進活性

実際には、前進活性は、従来のアッセイ、TRAPアッセイ、またはゲルプロットアッセイでの6ヌクレオチドラダーの出現によって容易に観察される。ドットプロットアッセイもまた使用され得るが、このような方法ではラダーは検出されない。従来のアッセイは、Morin, 1989, Cell 59:521に記載され、これは、その全体において、そして全目的のために本明細書中で援用される。TRAPアッセイは、米国特許第5,629,154号に記載されており、PCT公開 WO 97/15687、PCT公開 WO 95/13381; Kruppら、Nucleic Acids Res., 1997, 25:919; および、Wrightら、1995, Nuc. Acids Res. 23:3794もまた参照のこと。これらの各々は、その全体において、そして全目的のために本明細書中で援用される。ドットプロットアッセイは、活性を検出するために使用される(CCCUAA)_nプローブの安定なハイブリダイゼーションに要求される3つ以上の反復を付加しない非前進活性が、同じものが前進性を生じるかどうか、すなわち、プローブが、予測されるテロメラーゼ基質を検出するかどうかを決定するために、化合物またはhTRT変異体を用いて試験され、次いでその化合物また

40

50

は変異体が非前進活性を前進活性に変化し得る様式で、使用され得る。前進テロメラーゼ触媒活性についての他のアッセイもまた、例えば、Tatematsuら、1996, Oncogene 13:2265のストレッチPCRアッセイで使用され得る。従来のアッセイとドットプロットアッセイとの組み合わせのゲルプロットアッセイもまた、使用され得る。この変法で、従来アッセイが、放射標識ヌクレオチドなしに、そして高いdGTP濃度（例えば、0.1～2 mM）で実施される。従来アッセイの実施後、合成されたDNAは、変性PAGEによって分離され、そしてメンブレン（例えば、ニトロセルロース）に移される。次に、テロメリックDNA（テロメラーゼ産物 - 伸長したテロメラーゼプライマーまたは基質）が、標識されたテロメリックDNAプローブ（例えば、前出のドットプロットアッセイで使用されたようなCCCTAA配列を有するプローブ）を使用するハイブリダイゼーションのような方法によって検出され得る。この技術の利点は、従来アッセイよりも感度が高く、合成フラグメントのサイズ、および反応の前進性についての情報を提供することである。

10

【0258】

c) 活性測定

hTERTポリペプチドのテロメラーゼ活性は、未精製、部分精製、または実質的に純粋なhTERTポリペプチド（例えば、hTRとの会合で）を使用して、インビトロで、またはインビボ発現後に測定され得る。例えば、細胞（例えば、本発明の組換えhTERTポリペプチドを発現する細胞）でのテロメラーゼ活性は、テロメアの長さの増加または減少を検出することによってアッセイされ得る。テロメラーゼ触媒活性の典型的なアッセイは、hTRと複合体化されたhTERTを使用して実施され得る；しかし、オルタナティブテロメラーゼテンプレートRNAが置換され得るか、またはテロメラーゼ - プライマー結合のような別の活性を測定するためのアッセイが行われ得る。テロメアの長さを測定するアッセイは、当該分野で公知であり、そしてテロメリックDNAへのプローブのハイブリダイゼーション（増幅工程が包含され得る）、およびTRF分析、すなわち、制限エンドヌクレアーゼ切断後のテロメリックDNA制限フラグメント[TRF]の分析、を包含する。PCT公開WO 93/23572およびWO 96/41016；Counterら、1992, EMBO J. 11:1921；Allsoppら、1992, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:10114；Sanno, 1996, Am J Clin Pathol 106:16,およびSanno, 1997, Neuroendocrinology 65:299を参照のこと。

20

【0259】

hTERTポリペプチドのテロメラーゼ触媒活性は、前出のアッセイおよびその他のテロメラーゼ触媒活性アッセイを使用する多数の方法で測定され得る。1つの方法に従って、hTERTタンパク質が、hTRが発現される（すなわち、細胞で正常に、または組換え発現によるいずれかで）テロメラーゼ陰性ヒト細胞で、発現され（例えば、以下に記載されるように）、そして細胞または細胞溶解物中のテロメラーゼ活性の存在または非存在が測定される。適切なテロメラーゼ陰性細胞の例は、IMR 90（ATCC, #CCL-186）またはBJ細胞（ヒト包皮線維芽細胞株；例えば、Fengら、1995, Science 269:1236を参照のこと）。その他の例は、網膜着色上皮細胞（RPE）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC；ATCC #CRL-1730）、ヒト大動脈内皮細胞（HAEC；Clonetics Corp, #CC-2535）、およびヒト乳房上皮細胞（HME；Hammondら、1984, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5435；Stampfer, 1985, J. Tissue Culture Methods 9:107）を包含する。別の実施態様では、hTERTポリペプチドは、テロメラーゼ陽性細胞で発現され（例えば、hTERT発現ベクターでのトランスフェクションによって）、そしてトランスフェクトされていないコントロール細胞に比較して、細胞でのテロメラーゼ活性の増加が、ポリペプチドがテロメラーゼ触媒活性を有する場合に検出される。通常、hTERTを発現する適切な発現ベクターでトランスフェクトされた細胞でのテロメラーゼ触媒活性は、トランスフェクトされていない（コントロール）細胞より、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍～100倍さえ、または1000倍でさえ、有意に大きく増加する。

30

40

【0260】

別の実施態様では、hTERTタンパク質が、精製目的のための標識、すなわち「エピトープタグ」を有する融合タンパク質として（下記を参照のこと）、細胞（例えば、hTRが発現され

50

るテロメラーゼ陰性細胞で)発現される。1つの実施態様では、RNPは、タグを特異的に認識する抗体を使用して細胞から回収される。好ましいタグは、典型的に、短いかまたは小さく、そして切断部位、またはhTRTポリペプチドからタグを除去し得る他の特性を有し得る。適切なタグの例は、XpressTM エピトープ (Invitrogen, Inc., San Diego CA)、および、抗体または核酸、あるいは実施例6に記載されているような他の等価な方法によって、特異的に結合され得る他の部分を包含する。別のタグは、例えば、配列番号2のタンパク質の翻訳を開始するATGコドンの上流の配列番号1に挿入される配列によってコードされるものを包含し、これは、上流配列への(新しい)メチオニン開始コドンの挿入を包含し得る。

【0261】

10

hTRT変異体が、(例えば、融合タンパク質として)細胞で発現され、次に(例えば、リボ核タンパク質複合体として)単離されるとき、他の細胞タンパク質(すなわち、テロメラーゼ会合タンパク質)が、単離された複合体と会合し得る(それに直接的または間接的に結合し得る)ことが理解される。このような場合に、hTRT、hTR、および関連タンパク質を含有する複合体についてテロメラーゼ活性をアッセイすることが、ときに望まれる。

【0262】

2) 他のテロメラーゼまたはTRTタンパク質の活性

本発明のhTRTポリペプチドは、テロメラーゼ触媒活性を欠くが、1つ以上の他のテロメラーゼ活性を保持する変異体を包含する。これらの他の活性、および、このような活性を測定する本発明の方法は、(限定されないが)以下の節に議論されているものを包含する。

20

【0263】

a) 従来の転写酵素活性

テロメラーゼの従来の逆転写活性は、例えば、Morin, 1997, 前出、およびSpenceら、1995, Science 267:988に記載されている。hTRTは、逆転写触媒活性に要求される保存されたアミノ酸モチーフを有するので、hTRTは、ある種の外因性(例えば、非hTR) RNAを転写する能力を有する。従来のRTアッセイは、アニールしたDNAプライマーを伸長することによって、RNAテンプレートを転写する酵素の能力を測定する。逆転写活性は、当該分野で公知の多数の方法、例えば、標識核酸プライマー(例えば、RNAまたはDNA)のサイズの増加、または標識dNTPの取り込みを測定することによって測定され得る(例えば、前出Ausubelらを参照こと)。

30

【0264】

hTRTはhTRと特異的に会合するので、従来のRTアッセイに対するDNAプライマー/RNAテンプレートが、hTRおよび/またはテロメリックDNAプライマーに関連する特徴を有するように改変され得ることは、理解される。例えば、RNAは、配列(CCCTAA)_nを有し得、ここで、nは、少なくとも1または少なくとも3、あるいは少なくとも10以上である。1つの実施態様では、(CCCTAA)_n領域は、RNAの5'末端またはその付近に存在する(テロメラーゼRNAでのテンプレート領域の5'位置に類似する)。同様に、DNAプライマーは、TTAGGGテロメア配列の部分を含む3'末端、例えば、X_nTTAG、X_nAGGG、X_n(TTAGGG)_qTTAGなどを有し得、ここで、Xは、非テロメリック配列であり、そしてnは、8~20または6~30であり、qは、1~4である。別の実施態様では、DNAプライマーはRNAテンプレートに相補的でない5'末端を有し、その結果、プライマーがRNAにアニールされるとき、プライマーの5'末端が結合されずに残る。本発明の方法に適用され得る標準的な逆転写アッセイのさらなる改変が、当該分野で公知である。

40

【0265】

b)ヌクレオチド分解活性

テロメラーゼのヌクレオチド分解活性は、例えば、Morin, 1997, 前出; CollinsおよびGrieder, 1993, Genes and Development 7:1364に記載されている。テロメラーゼは、ヌクレオチド分解活性を有する(JoyceおよびSteitz, 1987, Trends Biochem. Sci. 12:288); しかし、テロメラーゼ活性は定義されている特性を有する。テロメラーゼは、ヒトおよびTetrahymenaでは、DNAの3'末端が、DNAテンプレート配列の5'境界に位置するときに、オリ

50

ゴヌクレオチドの3'末端から、優先的にヌクレオチドを通常1つだけ除去する。このヌクレオチドは、テロメリック反復（ヒトではTTAGGである）の最初のGである。テロメラーゼは、優先的にG残基を除去するが、その他のヌクレオチドに対するヌクレオチド分解活性を有する。この活性は、モニターされ得る。2つの異なる方法が、例示的に本明細書に記載されている。1つの方法は、全テンプレート配列に結合するプライマーとの従来のテロメラーゼ反応（すなわち、テンプレート境界；ヒトでは5'-TAGGGATTAGでの終止）である。ヌクレオチド分解活性は、最終dG残基の、アッセイで提供される放射標識dGTPとの置換をモニターすることによって観察される。この置換は、ゲル電気泳動およびオートラジオグラフィーによって示される、開始プライマーのサイズでのバンドの出現によってモニターされる。

10

【0266】

好ましい方法は、テロメラーゼによって伸長され得ない「ブロックされた」3'末端を有するDNAプライマーを使用する。3'ブロックプライマーは、標準的なテロメラーゼアッセイで使用され得るが、3'ヌクレオチドがテロメラーゼのヌクレオチド分解活性によって除去されない限り、伸長されない。この方法の利点は、テロメラーゼ活性が、いくつかの標準的な方法のいずれによりモニターされ得、そのシグナルが強く、そして定量が容易であることである。プライマーの3'末端のブロックは、いくつかの方法によって完了され得る。1つの方法は、標準的なオリゴヌクレオチド合成法を用いる、プライマーの3'末端での3'-デオキシ-dNTP残基の付加である。この末端は、2'OHを有するが、テロメラーゼに必要な3'OHを有さない。3'末端をブロックする他の方法は、例えば、3'ジデオキシ末端、3'アミン末端などに存在する。hTRTヌクレオチド分解アッセイに対するプライマーの例は、5'-TTAGGGTTAGGGTTA(G₃'_H)であり、ここで、最後の残基は、3'-デオキシグアニン残基を示す（Glen Research, Sterling, VA）。本開示に基づく適切なプライマーに対する多数の他の変化は、当業者に公知である。

20

【0267】

c) プライマー（テロメア）結合活性

テロメラーゼプライマー（テロメア）結合活性は、例えば、Morin, 1997, 前出；Collinsら、1995, Cell 81:677；Harringtonら、1995, J. Biol. Chem. 270:8893に記載されている。テロメラーゼは、テロメリックDNAプライマーに結合する2つの部位を有すると考えられる。プライマー結合に関連するRTモチーフは、hTRTおよび/またはhTRT/hTRはDNAプライマー結合活性を有することを示す。プライマー結合活性をアッセイするいくつかの方法が存在する；しかし、ほとんどの方法に共通する工程は、適切な結合条件下における、標識DNAプライマーの、hTRTあるいはhTRT/hTRまたは他のTRT/TR組み合わせとのインキュベーションである。さらに、ほとんどの方法は、非結合DNAを、タンパク質結合DNAから分離する手段を用いる；これらの方法は、以下を包含する。

30

【0268】

i) ゲルシフトアッセイ（電気泳動/移動度シフトアッセイとも呼ばれる）は、非結合DNAプライマーが、タンパク質結合DNAプライマーから、非変性ゲル上での電気泳動によって分離されるアッセイである（Ausubelら、前出）。

【0269】

ii) マトリックス結合アッセイは、基本技術に対していくつかの変法を包含し、これは、標識プライマーとのインキュベーションの前または後のいずれかで、hTRまたはhTRT/hTR複合体のマトリックス（例えば、ニトロセルロース）への結合を包含する。hTRTのマトリックスへの結合によって、非結合プライマーが、結合プライマーから機械的に分離される。残りの非結合DNAは、定量前にメンブレンを洗浄することによって除去され得る。当業者は、化学的、光化学的、UV架橋結合、抗体/エピトープ、および非共有的（疎水的、静電的など）な相互作用を含む、このようなマトリックス、固体支持体、およびメンブレンへの、タンパク質の結合方法がいくつか存在することを認識する。

40

【0270】

DNAプライマーは、テロメラーゼに対して親和性を有する任意のDNA、例えば、(TTAGGG)_n

50

(ここで、nは、1~10であり得、典型的には3~5である)のようなテロメリックDNAプライマーであり得る。3'末端および5'末端は、反復配列の任意の位置で終わり得る。プライマーはまた、標識または欠損を促進し得る非テロメリックDNAの5'または3'の伸長を有し得る。プライマーはまた、例えば、検出または単離を促進するように誘導体化され得る。

【0271】

d) dNTP結合活性

テロメラーゼのdNTP結合活性は、例えば、Morin, 1997、前出; Spenceら、前出に記載されている。テロメラーゼは、DNAを合成するためにdNTPを必要とする。hTRTタンパク質は、ヌクレオチド結合活性を有し、そして他のヌクレオチド結合タンパク質と同様の様式(Kantrowitzら、1980, Trends Biochem. Sci. 5:124)で、dNTP結合についてアッセイされ得る。典型的には、標識されたdNTPまたはdNTPのアナログの結合は、当該分野で公知であるように、非テロメラーゼRTタンパク質についてモニターされ得る。

10

【0272】

e) RNA(すなわち、hTR)結合活性

テロメラーゼのRNA(すなわち、hTR)結合活性は、例えば、Morin, 1997、前出; Harringtonら、1997, Science 275:973; Collinsら、1995, Cell 81:677に記載されている。本発明のTRTタンパク質のRNA結合活性は、標識RNAプローブを用いる、前記のDNAプライマー結合アッセイと同様の様式でアッセイされ得る。結合および非結合のRNAの分離方法、およびRNAの検出方法は、当該分野で周知であり、DNAプライマー結合アッセイについて記載されているのと同様の様式で、本発明の活性アッセイに適用され得る。RNAは、全長hTR、hTRのフラグメント、またはテロメラーゼまたはhTRTに対して親和性を有することが実証された他のRNAであり得る。米国特許第5,583,016号およびPCT公開第96/40868号を参照のこと。

20

【0273】

3) 標的としてのテロメラーゼモチーフ

本発明は、前記のように、活性の完全な相補性(前記のような)を有する組換えhTRTに加えて、天然に存在するテロメラーゼまたはhTRTまたは他のTRTタンパク質のテロメラーゼ活性の完全な相補性より少ないhTRTポリペプチドを提供する。RTおよびTRTのテロメラーゼ特異的モチーフの本明細書の開示を考慮して、前記のモチーフ配列中に認められるような、保存されたアミノ酸残基の変化または変異は、治療、薬剤スクリーニング、および特徴づけ、および他の使用に有用である、活性を失なった変異体をもたらすことが理解される。例えば、実施例1に記載されているように、S. pombeの外因性TRT遺伝子のRTドメインでのモチーフB~Dの欠失は、テロメアが、テロメアプローブのテロメリック反復へのハイブリダイゼーションがほとんど検出されない位置に順次短くされたハプロイド細胞をもたらす。このことは、テロメラーゼ触媒活性の消失を示す。同様に、モチーフEのWxGxS部位での変化は、テロメラーゼDNAプライマーの結合または機能に影響し得る。さらに、モチーフA、B'、およびCでのアミノ酸変化は、テロメラーゼの触媒活性に影響し得る。hTRTのDDモチーフの変異は、テロメラーゼ活性を、有意に減少または無くし得る(実施例16を参照のこと)。

30

【0274】

c) hTRTおよびその他のTRTポリペプチドの合成

本発明は、本明細書に開示されているhTRTおよび他のTRTポリペプチドを生産する種々の方法を提供する。下記の節に、hTRTタンパク質の化学合成および組換え発現(融合タンパク質を含む)が、いくぶん詳細に記載されている。

40

【0275】

1) 化学合成

本発明は、当該分野で周知の一般的な化学的な方法を使用して、全体または部分的に合成されたhTRTポリペプチドを提供する(例えば、Caruthersら、1980, Nucleic Acids Res. Symp. Ser., 215-223;および、Hornら、1980, Nucleic Acids Res. Symp. Ser., 225-232)。例えば、ペプチド合成は、自動化された合成(例えば、製造者によって提供された使

50

用説明書に従う、Perkin Elmer ABI 431A Peptide Synthesizerを使用する)を含む、種々の固相法(Robergeら、1995, Science 269;202)を使用して実施され得る。全長のタンパク質が必要なときは、より短いポリペプチドが、ペプチド結合を形成するために、1つの分子のアミノ末端と他の分子のカルボキシル末端との縮合によって融合され得る。

【0276】

新たに合成されたペプチドは、例えば、調製用高速液体クロマトグラフィー(例えば、Creighton, Proteins, Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY [1983])によって、実質的に精製され得る。合成ペプチド(または、本発明の任意の他のペプチドまたはポリペプチド)の組成物は、アミノ酸分析または配列決定(例えば、Edman分解法; Creighton, 前出)によって確認され得る。重要なことは、hTRTのアミノ酸配列またはその任意の部分が、直接合成の間に变化され得るか、および/または化学的方法を用いて、他のタンパク質からの配列またはそうでなければその任意の部分と任意の目的のために組合わされ得て、本発明の変異体ポリペプチドを産生する。

10

【0277】

2) hTRTおよびその他のTRTタンパク質の組換え発現

本発明は、インビトロ(無細胞の)、エクソピボ、またはインピボ(細胞または生物に基づく)組換え発現系を使用する、hTRTポリペプチドおよび核酸の発現に有用な方法、試薬、ベクター、および細胞を提供する。1つの実施態様では、hTRTタンパク質またはそのフラグメントの発現は、適切な発現ベクター(すなわち、使用される発現系に要求される、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必須エレメントを有するベクター)へコード配列を挿入する工程を包含する。従って、1つの局面で、本発明は、hTRT遺伝子のコード配列に対する配列において、少なくとも25ヌクレオチド、および多くの適用に好ましくは、本発明のhTRT cDNAまたは遺伝子の50~100ヌクレオチド以上が実質的に同一であるポリヌクレオチドを提供する。これは、hTRTポリペプチドを発現し得る転写ユニットを形成するために、プロモーターに作動可能に連結される。当業者に周知の方法を用いて、hTRT配列、および、本発明によって提供される適切な転写または翻訳制御を有する発現ベクターを構築し得る(例えば、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出および本発明の開示を参照のこと)。

20

【0278】

本発明によって提供されるhTRTポリペプチドは、hTRTポリペプチドまたはhTRTタンパク質のフラグメントを含有する融合タンパク質を包含する。融合タンパク質は、化学合成によってもまた産生され得るが、典型的には組換え方法によって産生される。融合タンパク質は、hTRTポリペプチド構築物の増強された発現の提供、または、他の所望の特性(例えば、標識(例えば、酵素リポーター基)、結合基、または抗体エピトープを含む)を有するhTRTポリペプチドの産生に有用であり得る。hTRTおよび増強グリーン蛍光タンパク質(EGFP)配列を有する融合タンパク質の例が、以下の実施例15に記載される。実施例15および本明細書の他のところに議論されている使用および適用が、特定の融合タンパク質に限定されるのではなく、種々の融合構築物の使用の例示であることは、当業者には明白である。

30

【0279】

本発明の融合タンパク質系はまた、hTRTタンパク質またはペプチドの効率的な産生および単離を促進するために使用され得る。例えば、いくつかの実施態様では、融合タンパク質の非hTRT配列部分は、融合タンパク質が非結合成分(例えば細胞溶解物中の非関連タンパク質)から分離され得るように、固定化分子に特異的に結合され得る短いペプチドを有する。1つの例は、特異抗体に結合されるペプチド配列である。別の例は、ニッケルまたは銅イオンを含有する樹脂(すなわち、金属-キレートアフィニティークロマトグラフィー)により結合され得る、ポリヒスチジン部、例えば、(His)₆またはヒスチジン-トリプトファン配列を有するペプチドである。他の例は、固定化免疫グロブリンでの精製を可能にするプロテインAのドメインまたはフラグメント、および、FLAGS伸長/アフィニティー精製システム(Immunex Corp, Seattle WA)で使用されるドメインを包含する。いくつか

40

50

の実施態様では、融合タンパク質は、hTRTまたは他のTRTポリペプチド配列が、非hTRTペプチドまたはタンパク質の配列から容易に分離され得るような、切断部位を有する。この場合、切断は、化学的（例えば、臭化シアン、2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-メチル-3'-プロモインドレン、ヒドロキシルアミン、または低いpH）、または酵素的（例えば、Xa因子、エンテロキナーゼ）であり得る。融合および切断システムの選択は、部分的には、発現されるhTRTポリペプチドの部分（すなわち、配列）に依存し得る。融合タンパク質は、Ausubelら、前出、16節、Krollら、1993、DNA Cell. Biol. 12:441、およびInvitrogen 1997カタログ（Invitrogen Inc, San Diego CA）に一般的に記載されている。エピトープタグまたはタグおよび切断部位を有する本発明の融合タンパク質の他の例は、下記の実施例6に提供される。

10

【0280】

この節に議論されている発現系はhTRTポリペプチドの発現に注目しているが、同じまたは類似の細胞、ベクター、および方法が、hTRTポリヌクレオチドの必ずしも所望する産生をとまなうことなく、センスおよびアンチセンスのポリヌクレオチドを含む、本発明のhTRTポリヌクレオチドを発現するために使用され得ることは、当業者に理解される。典型的には、ポリペプチドの発現は、適切な開始コドン（例えば、メチオニン）、オープンリーディングフレーム、および、タンパク質を産生するための核酸配列の翻訳が所望されないときには省略され得る翻訳調節シグナル（例えば、リボソーム結合部位、終止コドン）を必要とする。

【0281】

20

hTRTポリペプチドおよびポリヌクレオチドの発現は、本発明によって提供される、任意のいくつかの関連する利点を達成するように実施され得る。例示的な利点の1つは、それらが発現される細胞からその後単離されるhTRTポリペプチドの発現である（例えば、ワクチンとして、またはテロメラーゼ活性を調節する化合物を同定するためのスクリーニング適用での使用のための多量のhTRT産生のため）。第二の例示的な利点は、細胞の表現型を変化させるために、細胞でのhTRT発現（遺伝子治療の適用のように）である。非哺乳動物細胞が、精製のためにhTRTの発現に使用され得、一方、特定の真核哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）は、hTRTの単離および精製のみならず、細胞での表現型の変化が望まれるときに（例えば、遺伝子治療適用のように増殖能力の変化に影響するように）、hTRTの発現にも使用され得る。例示および非限定の目的として、1つ以上のテロメラーゼ活性（例えば、テロメラーゼ触媒活性）を有するhTRTポリペプチドは、細胞の増殖能力を増加する（例えば、細胞を不死化する）ために宿主細胞で発現され得る。逆に、hTRTアンチセンスポリヌクレオチドまたは阻害ポリペプチドは、典型的に、細胞（例えば、テロメラーゼ陽性の悪性腫瘍細胞）の増殖能力を減少させるために発現され得る。多数の特定の適用が、本明細書中、例えば、以下の治療適用のための本発明の試薬および方法の使用の議論に記載されている。

30

【0282】

本発明の例示的な有用な発現系（細胞、調節エレメント、ベクター、および発現）は、当該分野で周知の一般的な方法（例えば、Ausubelら（前出）の10節を参照のこと）に従って、hTRTポリヌクレオチドを使用する、網状赤血球溶解物および小麦胚芽系のような多数の無細胞系を包含する。別の実施態様では、本発明は、原核細胞または真核細胞でのhTRT発現のための試薬および方法を提供する。従って、本発明は、hTRTポリヌクレオチド、タンパク質、タンパク質部分配列、または融合タンパク質をコードする核酸を提供する。これらは、単離細胞、細胞株、細胞培養物、組織および全生物を含み、当該分野で公知のヒト細胞発現系を含む細菌、真菌、植物、昆虫、および動物で発現され得る。当業者により理解されるように、宿主細胞または無細胞系発現系に導入されるhTRTポリヌクレオチドは、通常、各宿主または無細胞系に対して適切な発現制御配列に作動可能に連結される。

40

【0283】

有用な細菌発現系は、E. coli、バチルス属（例えば、Bacillus subtilus）、他の腸内細菌（例えば、Salmonella、Serratia、および種々のPseudomonas種）、または他の細菌宿

50

主（例えば、*Streptococcus cremoris*、*Streptococcus lactis*、*Streptococcus thermophilus*、*Leuconostoc citrovorum*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus lactis*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、および *Bifidobacterium longum*）を、包含する。原核生物で有用なhTTR発現構築物は、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターなどを包含し、代表的には、プロモーター配列を包含する。プロモーターの例は、lacプロモーター、Bluescript7 phagemid(Stratagene, La Jolla CA)またはpSport1(Gibco BRL)のハイブリッドlacZプロモーターのような誘導プロモーター；ファージー プロモーター系；トリプトファン(trp)プロモーター系；および、ptp-lacハイブリッドなどを包含する。細菌発現構築物は、必要に応じて、リボソーム結合部位、および転写終止シグナル調節配列を包含する。発現に有用な特定のベクターの例は、例えば、pTrcHis2(Invitrogen, San Diego CA)、pThioHis A、B、およびC、ならびに当該分野で公知または開発され得る他の多数のベクター（例えば、Ausbelを参照のこと）を包含する。細菌に有用なベクターは、hTTR融合タンパク質の産生を促進するものを包含する。細菌細胞での融合タンパク質の高レベル発現に有用なベクターは、以下に限定されないが、上記のBluescript7(Stratagene)のような、多重機能性*E. coli*クローニングおよび発現ベクターを包含し、そこで、hTTRタンパク質、hTTR融合タンパク質、またはhTTRフラグメントをコードする配列が、ハイブリッドタンパク質が産生されるように、アミノ末端Metおよび後続の -ガラクトシダーゼの7残基に対する配列に、インフレームでベクターに連結され得る（例えば、pINベクター；Van HeekeおよびSchuster, 1989, J. Biol. Chem., 264:5503）。pGEXベクター（例えば、pGEX-2 TK; Pharmacia Biotech）のようなベクターもまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）を有する融合タンパク質として、hTTRタンパク質のような外来ポリペプチドを発現するために使用され得る。このような融合タンパク質は、グルタチオン - アガロースビーズへの吸着、その後の遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解細胞から精製され得る。このような系で産生されたタンパク質は、精製または他の適用に有用であり得るような、エンテロキナーゼ、トロンピン、またはXa因子プロテアーゼ切断部位をしばしば含み、その結果目的のクローニングされたポリペプチドがGST部分から放出され得る。他の例は、hTTRおよび*E. coli*マルトース結合タンパク質(MBP)または*E. coli*チオレドキシンを含む融合タンパク質である。細菌細胞で有用なhTTR発現構築物の例は、以下の実施例6に提供される。

【0284】

本発明はさらに、*Dictyostelium*のような真菌系、および、好ましくは*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Torulopsis holmii*、*Saccharomyces fragilis*、*Saccharomyces lactis*、*Hansenula polymorpha*、および*Candida pseudotropicalis*のような酵母で発現されるhTTRポリペプチドを提供する。hTTRが酵母で発現されるときは、プラスミドおよび酵母人工染色体(YAC)ベクターを含む、多数の適切なベクターが入手可能である。ベクターは、代表的に、構成または誘導プロモーター（例えば、因子、アルコールオキシダーゼ、PGH、および3-ホスホグリセレートキナーゼまたは他の解糖酵素）のような発現制御配列、および、必要であれば、複製起点、終結配列などを包含する。*Pichia*での使用に適切なベクターは、pPICZ、His6/pPICZB、pPICZ、pPIC3.5K、pPIC9K、pA0815、pGAP2 A、B、およびC、pGAP2 A、B、およびC(Invitrogen, San Diego, CA)、ならびに当該分野で公知または開発されるべき多数のベクターを包含する。1つの実施態様では、ベクターHis6/pPICZB(Invitrogen, San Diego, CA)が、酵母*Pichia pastoris*でHis₆-hTTR融合タンパク質を発現するために使用される。*Saccharomyces*で有用なベクターの例は、pYES2(Invitrogen, San Diego, CA)である。酵母で有用なhTTR発現構築物の例は、以下の実施例6に提供される。

【0285】

本発明のhTTRポリペプチドはまた、植物または植物ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）でトランスフェクトされるか、または細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換さ

10

20

30

40

50

れる植物細胞系で発現され得る。植物ウイルス発現ベクターが使用される場合には、hTRTコード配列の発現は、任意の多数のプロモーターによって駆動され得る。例えば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーター（Brissonら、1984、Nature 310:511-514）のようなウイルスプロモーターは、単独またはTMVからのオメガリーダー配列（Takamatsuら、1987、EMBO J., 6:307-311）との組み合わせで、使用され得る。あるいは、RUBISCOのsmallサブユニット遺伝子由来のプロモーター（Coruzziら、1984、EMBO J., 3:1671-1680；Broglieら、1984、Science 224:838-843）のような植物プロモーター、または熱ショックプロモーター（WinterおよびSinibaldi, 1991, Results Probl. Cell Differ., 17:85）、または貯蔵タンパク質遺伝子プロモーターが、使用され得る。これらの構築物は、直接DNA形質転換または病原体媒介トランスフェクションによって、植物細胞へ導入され得る（このような技術の総説は、HobbsまたはMurry, 1992, MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY McGraw Hill New York NY, 191-196頁（1992）；または、WeissbachおよびWeissbach, 1988, METHODS FOR PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Academic Press, New York NY, 421-463頁を参照のこと）。

【0286】

本発明によって提供されるhTRTタンパク質の発現についての他の発現系は、昆虫系である。好ましい系は、バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターを使用する。このような系の1つは、Autographa californica核ポリヘドロシウイルス（AcNPV）が、Spodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusia larvaeにおいて外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。目的の遺伝子をコードする配列が、ポリヘドリン遺伝子のようなウイルスの非必須領域にクローニングされ得、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置かれ得る。hTRTタンパク質をコードするような配列の首尾よい挿入は、ポリヘドリン遺伝子を不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスを産生する。次いで、組換えウイルスは、S. frugiperda細胞またはTrichoplusia larvaeを感染させるために使用され、ここで、次いで、hTRT配列が発現される（一般的な方法については、Smithら、J. Virol., 46:584(1983)；Engelhardら、Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3224-7(1994)を参照のこと）。バキュロウイルス発現についての有用なベクターは、pBlueBacHis2A、BおよびC、pBlueBac4.5、pMelBacBならびに当該分野で公知ならびに開発されるべき多数の他のベクターを含む。昆虫細胞に有用なhTRT発現構築物の例は、以下の実施例6に提供される。

【0287】

本発明はまた、哺乳動物および哺乳動物細胞での発現系を提供する。上記のように、hTRTポリヌクレオチドは、hTRTポリペプチドの大量生産（例えば、精製のため）、または標的細胞の表現型を変化するために（例えば、遺伝子療法、細胞不死化などの目的のために）、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）で発現され得る。後者の場合には、発現されるhTRTポリヌクレオチドは、テロメラーゼ触媒活性を有するポリペプチドをコードし得るか、またはコードしなくてもよい。すなわち、発現が、センスまたはアンチセンスポリヌクレオチド、阻害または刺激ポリペプチド、ゼロまたは1以上のテロメラーゼ活性を有するポリペプチド、ならびに、本明細書に開示またはこの開示の概説から当業者に明白なその他の組み合わせおよび変異体であり得る。

【0288】

本発明の核酸を発現するための適切な哺乳動物宿主組織培養細胞は、SV40で形質転換されたサル腎CV1株（COS-7, ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎株（293；Grahamら、J. Gen. Virol. 36:59（1977））；仔ハムスター腎細胞（BHK, ATCC CCL 10）；CHO（ATCC CCL 61およびCRL 9618）；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251（1980））；サル腎細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎細胞（VERO-76, ATCC CRL 1587）；ヒトけい管ガン細胞（HeLa, ATCC CCL 2）；イヌ腎細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；バッフアロラット肝細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL75）；ヒト肝細胞（Hep G2, HB 8065）；マウス乳腫瘍（MMT 060562, ATCC CCL51）；TRI細胞（Matherら、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-46（1982））；MDCK細胞（ATCC CCL 34およびCRL 6253）；HEK 293細胞（ATCC CRL 1573）、および、WI-38細胞（ATCC CCL 75；ATCC: Amer

10

20

30

40

50

ican Type Culture Collection、Rockville, MD)を含む、任意の正常有限寿命動物もしくはヒト細胞あるいは正常または異常な不死化動物もしくはヒト細胞を包含する。ポリペプチドを発現するための哺乳動物組織細胞培養物の使用は、Winnacker, FROM GENE TO CLONES(VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987)に全般的に考察されている。

【0289】

哺乳動物宿主細胞について、ウイルスベクターおよび非ウイルス発現系が提供される。非ウイルスベクターおよび系は、代表的に、タンパク質またはRNAおよびヒト人工染色体を発現するための発現カセットを有する、プラスミドおよびエピソームベクターを包含する(例えば、Harringtonら、1997, Nat Genet 15:345を参照のこと)。例えば、哺乳動物(例えば、ヒト)細胞でのhTERTポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に有用な非ウイルスベクターは、pcDNA3.1/His、pEBVHisA、B、およびC(Invitrogen, San Diego CA)、MP SVベクター、Invitrogen 1997カタログ(Invitrogen Inc, San Diego CA)(その全体が本明細書中で援用される)に記載されている他のベクター、および他のタンパク質についての当該分野で公知の多数の他のベクターを包含する。哺乳動物細胞で有用なhTERT発現構築物の例は、以下の実施例6に提供される。

【0290】

有用なウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、SV40、パピローマウイルス、HBVエプスタインバーウイルスに基づくベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびセムリキ森林ウイルス(SFV)を包含する。SFVおよびワクシニアベクターは、一般的に前出のAusubelらの第16章で議論されている。ときにはウイルスベクターは、ネイキド形態で導入されるか、またはウイルスタンパク質以外のタンパク質でコートされるが、これらのベクターは、しばしば、2つの成分である、改変されたウイルスゲノムおよびそれを囲むコート構造からなる(一般的に、Smith、1995, Annu. Rev. Microbiol. 49:807を参照のこと)。しかし、ベクター中のウイルス核酸は、例えば、遺伝子療法用に設計されるときには、多くの様式で変化され得る。これらの変化の目的は、入手可能なパッケージングまたはヘルパー細胞中でベクター形態で増殖し得るその能力を維持しながら、標的細胞中でウイルスを増殖不能にすること、外因性DNA配列の挿入のためにウイルスゲノム内に空間を提供すること、および目的遺伝子をコードし、そして適切な発現を可能にする新たな配列を組み込むことである。従って、ベクター核酸は、一般的に2つの成分を含む：ヘルパー株での複製およびパッケージングのための必須cis作用ウイルス配列、および外因性遺伝子のための転写ユニット。他のウイルス機能は、特定のパッケージングまたはヘルパー細胞株でトランスで発現される。アデノウイルスベクター(例えば、ヒト遺伝子療法における使用のため)は、例えば、Rosenfeldら、1992, Cell 68:143; PCT公開公報WO 94/12650; 同94/12649; 同94/12629に記載されている。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合に、hTERTをコードする配列は、後期プロモーターおよび3部分からなるリーダー配列からなる、アデノウイルス転写/翻訳複合体に連結され得る。ウイルスゲノムのE1またはE3の非必須領域での挿入は、感染宿主細胞で発現し得る生ウイルスをもたらす(LoganおよびShenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:3655)。レトロウイルスゲノム部分としての治療ポリヌクレオチド配列を有する、複製欠損レトロウイルスベクターが、例えば、Millerら、1990, Mol. Cell. Biol. 10:4239; Kolberg, 1992, J. NIH Res. 4:43; および、Cornettaら、1991, Hum. Gene Ther. 2:215に記載されている。

【0291】

哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスからのプロモーターが、しばしば適切である。適切なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、ステージ特異的、および/または制御もしくは調節可能(例えば、グルココルチコイドのようなホルモンによる)であり得る。有用なプロモーターは、以下に限定されないが、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRPpIIIプロモーター、構成的MPSVプロモーター、テトラサイクリン誘導CMVプロモーター、(例えば、ヒト即時初期CMVプロモーター)、構成的CMV

10

20

30

40

50

プロモーター、および当該分野で公知のプロモーター-エンハンサー組み合わせを包含する。

【0292】

他の調節エレメントもまた、hTRTポリヌクレオチドの効果的な発現および/またはhTRTタンパク質をコードする配列の翻訳に必要とされ得るかまたは望まれ得る。翻訳のために、これらのエレメントは、代表的に、ATG開始コドンおよび隣接のリボソーム結合部位または他の配列を含む。hTRTタンパク質をコードする配列では、その開始コドンおよび上流のプロモーター配列が発現ベクターに挿入されているならば、さらなる翻訳または他の制御シグナルが必要とされなくてもよい。しかし、コード配列、またはその部分のみが挿入されている場合は、外因性転写および/または翻訳制御シグナル（例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、およびATG開始コドン）は、しばしば提供されなければならない。さらに、開始コドンは、代表的に、所望のタンパク質の翻訳を確実にするように正しい読み取り枠でなければならない。外因性転写エレメントおよび開始コドンは、天然および合成の両方の種々の起源のものであり得る。さらに、発現効率、使用する細胞系に適切なエンハンサーを含むことによって促進され得る（Scharfら、1994、Results Probl. Cell Differ. 20:125；および、Bittnerら、1987、Meth. Enzymol., 153:516）。例えば、SV40エンハンサーまたはCMVエンハンサーが、哺乳動物宿主細胞での発現を増加するために使用され得る。

10

【0293】

hTRT遺伝子産物の発現はまた、ヒト細胞（例えばテロメラゼ陰性細胞株）のような細胞で、hTRTプロモーターまたはエンハンサーの活性化によりなされ（増加され）得る。活性化は、外因性プロモーター活性化因子の投与、またはhTRT遺伝子の発現を抑制する細胞成分の阻害を含む、種々の方法によって実施され得る。逆に、以下に記載されるように、プロモーター機能の阻害がhTRT遺伝子発現を減少させることが理解される。

20

【0294】

本発明は、エクジソン（Ecdysone）誘導発現系（Invitrogen）のような系、およびClontechからのTet-OnおよびTet-offテトラサイクリン制御系を使用して、hTRTポリペプチドの誘導可能および抑制可能な発現を提供する。エクジソン誘導発現系は、ステロイドホルモンエクジソンアナログ、ムリステロンAを使用して、ヘテロ二量体核レセプターを通じて組換えタンパク質の発現を活性化する（Noら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3346）。本発明の1つの実施態様では、hTRTは、pINDベクター（Clontech）にクローニングされ、これは、最小の熱ショックプロモーター上流の5つの改変エクジソン応答エレメント（E/GRE）および複数のクローニング部位を含む。次いで、その構築物は、エクジソンレセプターを安定に発現する細胞株にトランスフェクトされる。トランスフェクション後、細胞は、ムリステロンAによって処理され、pINDからの細胞内発現を誘導する。本発明の別の実施態様では、hTRTポリペプチドは、Tet-onおよびTet-off発現系（Clontech）を使用して発現され、制御された高レベルの遺伝子発現を提供する（Gossenら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547；Gossenら、1995、Science 268:1766）。

30

【0295】

本発明のhTRTベクターは、細胞、組織、器官、患者、または動物に、種々の方法で導入され得る。本発明の核酸発現ベクター（代表的にdsDNA）が、塩化カルシウム形質転換（細菌系用）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム処理、リボソーム媒介形質転換、インジェクションおよびマイクロインジェクション、弾道法（ballistic method）、パイロソム（virosome）、イムノリボソーム、ポリカチオン：核酸複合体、ネイクドDNA、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22（ElliotおよびO'Hare, Cell 88:223）への融合、DNAの薬剤促進取り込み、およびエキスピボ形質導入のような、周知の方法によって、選択された宿主細胞に導入され得る。有用なリボソーム媒介DNA輸送法は、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号；および同第4,897,355号；PCT公開公報W0 91/17424、同W0 91/16024；WangおよびHuang, 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun. 147:980；WangおよびHuang, 1989, Biochemistry 28:9508；LitzingerおよびHuang, 1992, Bioch

40

50

em. Biophys. Acta 1113:201; GaoおよびHuang, 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun. 179:280に記載されている。イムノリポソームは、外因性ポリヌクレオチドのキャリアとして記載されており (WangおよびHuang, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7851; Trubetskoyら、1992, Biochem. Biophys. Acta 1131:311)、おそらく特定の細胞型で表面抗原に結合する特異的な抗体の封入により、リポソームと比較すると、改良された細胞型特異性を有し得る。Behrら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6982は、リポソームを形成するための任意のさらなるリン脂質の必要なしに、それ自身のトランスフェクションを媒介する試薬としてリポポリアミンを使用することを報告している。適切な送達方法は、受容可能な実施および制御要求 (例えば、遺伝子療法についてかまたは組換えタンパク質の発現のための細胞株の産生について) の観点により、実施者によって選択される。先に挙げた送達方法は、遺伝子療法目的のための細胞に、組織培養細胞などに核酸を輸送するために使用され得ることが理解される。

10

【0296】

組換えタンパク質の長期間の高収量生産のために、しばしば安定な発現が望まれる。例えば、hTERTを安定に発現する細胞株は、ウイルス複製起点または外因性発現エレメント、および選択マーカー遺伝子を含む本発明の発現ベクターを使用して調製され得る。ベクターの導入後、細胞は、選択培地に交換される前に、栄養培地中で1~2日間増殖され得る。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在は、選択培地中で導入された配列を首尾良く発現する細胞の増殖を可能にする。耐性で安定にトランスフェクトされた細胞が、細胞型に適切な組織培養技術を使用して、増殖され得る。例えば、

20

【0297】

さらに、宿主細胞株が、挿入配列の発現を調節するその能力、または所望の様式で発現されたタンパク質をプロセッシングするその能力について選択され得る。ポリペプチドのこのような修飾は、これらに限定されないが、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化を包含する。翻訳後のプロセッシングもまた、正しい挿入、折り畳み、および/または機能に重要であり得る。異なる宿主細胞は、このような翻訳後の活性について各細胞について特異的な細胞機能および特徴的機構を有するので、特定の細胞が、導入された外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択され得る。

30

【0298】

本発明はまた、hTERTまたは他のTRTポリヌクレオチドまたはポリペプチドを発現する、トランスジェニック動物 (すなわち、ヒトまたは他のTRT遺伝子配列についてのトランスジェニック哺乳動物) を提供する。1つの実施態様では、hTERTは、トランスジェニックウシ、ヤギ、またはウサギのような、トランスジェニック哺乳動物の乳汁中に分泌される。このような動物の作製方法は、例えば、HeynekerらのPCT WO 91/08216に見出され得る。

【0299】

本明細書中、前記で開示される発現系を使用して作製された、本発明のhTERTタンパク質および複合体は、本発明 (例えば、下記) によって提供された特定の方法に従って、当該分野で公知の一般的な種々の方法を用いて精製され得る。当業者は、化学合成、生物発現、または精製後に、hTERTタンパク質が、天然に存在するテロメラーゼの天然のコンフォメーションとは異なるコンフォメーションを有することを理解する。それは、ある場合には、ポリペプチドを変性し (例えば、ジスルフィドまたは他の結合の還元を含む)、次いで、ポリペプチドに好ましいコンフォメーションに再度折り畳むことをもたらすために有用であるか、または必要でさえあり得る。生産的な再折り畳みはまた、hTR (またはhTRフラグメント) の存在を必要とする。タンパク質の還元および変性、および再折り畳みの誘導方法は、当業者に周知である (例えば、Debinskiら、1993., J. Biol. Chem., 268:14065; KreitmanおよびPastan, 1993, Bioconjug. Chem., 4:581; および、Buchnerら、1992, Anal. Biochem., 205:263; および、McCamanら、1985, J. Biotech. 2:177を参照のこと)

40

50

。さらに、前出のPCT公開公報W0 96/40868を参照のこと。

【0300】

D) ヒトTRTおよびヒトテロメラーゼRNA、テロメラーゼ会合タンパク質、ならびに同時発現およびその他の方法によって産生された他の生体分子の複合体

本発明のhTRTポリペプチドは、インビボおよびインビトロにおいて、RNA (例えば、hTR)、タンパク質 (例えば、テロメラーゼ会合タンパク質)、DNA (例えば、テロメリックDNA、 $[T_2AG_3]_N$)、および(デオキシ)リボヌクレオチドトリホスフェートのようなヌクレオチドを含む他の生体分子と会合し得る。これらの会合は、本発明の方法に従って、hTRTの存在または機能のアッセイ、hTRTまたはテロメラーゼ会合分子の同定または精製、およびhTRTまたはテロメラーゼの構造または機能の分析に利用され得る。

10

【0301】

1つの実施態様では、本発明は、例えば、テロメラーゼホロ酵素を産生するために、核酸、通常はRNAと複合体化 (例えば、会合または結合された) hTRTを提供する。1つの実施態様では、結合RNAは、テロメラーゼ媒介DNA合成のテンプレートとして作用し得る。hTRTポリペプチドと複合体化され得るRNAの例は、天然に存在する宿主細胞テロメラーゼRNA、ヒトテロメラーゼRNA (例えば、hTR; 米国特許第5,583,016号)、hTRサブ配列またはドメイン、合成RNA、または他のRNAを包含する。RNA-hTRTタンパク質複合体(RNP)は、代表的に、テロメラーゼ触媒活性のような、1つ以上のテロメラーゼ活性を示す。これらのhTRT-hTR RNP (または、他のhTRT-RNA複合体) は、hTRTおよびhTR (または、他のRNA) のインビトロ (すなわち、細胞を含まない系での) 同時発現によるインビトロ再構築、インビボ再構築、またはエクスピボ再構築を含む、例示目的で以下に記載されるような、種々の方法によって産生され得る。

20

【0302】

従って、本発明は、1つの実施態様で、別々に精製された成分を混合することによって、インビトロで形成されたhTRT-hTR複合体 (または、他のhTRT-RNA複合体) を提供する (「インビトロ再構築」; 例えば、再構築の記載については米国特許第5,583,016号を参照のこと; さらに、Autexierら、EMBO J. 15:5928を参照のこと)。

【0303】

別の実施態様では、本発明は、細胞を含まない転写-翻訳系 (例えば、小麦胚芽またはウサギ網状赤血球溶解物) で、インビトロにおいてhTRTポリペプチドおよびRNA (例えば、hTR) を同時発現することによって産生された、テロメラーゼRNPを提供する。実施例7に示されるように、組換えhTRTポリペプチドおよびhTRのインビトロにおける同時発現は、テロメラーゼ触媒活性 (TRAPアッセイによって測定されるような) の産生をもたらす。

30

【0304】

本発明によってさらに、hTRが天然で発現されるか、またはhTR (または、hTRTタンパク質と複合体を形成し得る別のRNA) が組換え方法によって導入または発現される細胞 (例えば、哺乳動物細胞) で、hTRTポリペプチドを発現することによって産生されるテロメラーゼRNPが提供される。従って、1つの実施態様で、hTRTは、hTRが存在するテロメラーゼ陰性ヒト細胞 (例えば、BJまたはIMP90細胞) で発現され、それは、2分子をRNPにアセンブリし得る。別の実施態様では、hTRTは、hTRが組換え的に発現されるヒト細胞または非ヒト細胞で発現される。細胞でのhTR発現方法は、米国特許第5,583,016号に見出される。さらに、テロメラーゼのRNA成分をコードするcDNAを含有するクローンは、pGRN33 (ATCC 75926) として寄託されている。ヒトテロメラーゼのRNA成分をコードするゲノム配列もまた、クローン28-1の約15 kbのSauIII AからHindIIIの挿入物 (ATCC 75925) で寄託されている。真核生物細胞での発現には、hTRT配列は、代表的に、転写開始配列 (RNAポリメラーゼ結合部位) および転写終結配列に作動可能に連結される (例えば、PCT公開公報W0 96/01835; Fengら、1995, Science 269:1236を参照のこと)。

40

【0305】

本発明はさらに、いわゆる「テロメラーゼ会合タンパク質」と同時発現および/または会合される、組換え産生されたかまたは実質的に精製されたhTRTポリペプチドを提供する。

50

従って、本発明は、他のタンパク質（例えば、テロメラーゼ会合タンパク質）と同時発現または複合体化されたhTRTを提供する。テロメラーゼ会合タンパク質は、ヒトテロメラーゼと同時精製するタンパク質、および/またはテロメラーゼ機能または活性を、例えば、テロメラーゼをテロメリックDNAとの会合に関与させることによって調節する役割をなし得るタンパク質である。テロメラーゼ会合タンパク質の例は、以下に限定されないが、以下のタンパク質および/またはそれらのヒトホモログを包含する：ヌクレオリン（Srivastavaら、1989, FEBS Letts. 250:99を参照のこと）；EF2H（伸長因子2ホモログ；Nomuraら、1994, DNA Res. (Japan) 1:27, GENBANK受託番号D21163を参照のこと）；TP1/TLP1（Harringtonら、1997, Science 275:973；Nakayama, 1997, Cell 88:875）；Tetrahymena p95のヒトホモログまたはp95それ自身（Collinsら、1995, Cell 81:677）；TPC2（テロメア長調節タンパク質；ATCC寄託番号97708；TPC3（これもまた、テロメア長調節タンパク質；ATCC受託番号97707；DNA結合タンパク質B（dbpB；Horwitzら、1994, J. Biol. Chem. 269:14130；および、テロメア反復結合因子（TRF1および2；Changら、1995, Science 270:1663；Chongら、1997, Hum Mol Genet 6:69）；EST1、3、および4（Lendvayら、1996, Genetics 144:1399, Nugentら、1996, Science 274:249, Lundbladら、1989, Cell 57:633）；および、エンドキャッピング因子（Cardenasら、1993, Genes Dev. 7:883）。

【0306】

テロメラーゼ会合タンパク質は、hTRTタンパク質またはhTRT-hTR RNPとの同時精製または結合に基づいて、同定され得る。あるいは、それらは、hTRT融合タンパク質、例えば、GST-hTRT融合タンパク質などとの結合に基づいて、アフィニティー精製（Ausubelら、第20章を参照のこと）によって測定されるように、同定され得る。hTRT会合タンパク質を同定するために適用し得る、タンパク質-タンパク質相互作用を評価するために特に有用な技術は、Chienら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578 (1991)）；さらに、前出のAusubelらの第20章を参照のこと）の2ハイブリッドスクリーニング法である。このスクリーニングは、転写アクチベーターである酵母Gal4転写タンパク質（FieldおよびSong, 1989, Nature 340:245を参照のこと）の再構築を通じて、インビボでのタンパク質-タンパク質相互作用を同定する。この方法は、DNA結合および転写活性化をもたらす別々のドメインからなる酵母Gal4タンパク質の特性に基づく。2つのハイブリッドタンパク質をコードするポリヌクレオチド、通常は発現ベクターが構築される。1つのポリヌクレオチドは、hTRT相互作用について試験されるべきタンパク質（例えば、ヌクレオリンまたはEF2H）のポリペプチド配列に融合された、酵母Gal4 DNA結合ドメインを含む。あるいは、酵母Gal4 DNA結合ドメインはヒト細胞からのcDNAに融合されており、従って、テロメラーゼ会合タンパク質についてのスクリーニングのためのGal4 DNA結合ドメインに融合されたヒトタンパク質のライブラリーを作成する。他のポリヌクレオチドは、hTRTポリペプチド配列に融合されたGal4活性化ドメインを含む。その構築物は、酵母宿主細胞に導入される。発現に際して、hTRTと試験タンパク質との間の分子間結合は、Gal4活性化ドメインを有するGal4 DNA結合ドメインを再構築し得る。これは、Gal4結合部位に作動可能に結合されたレポーター遺伝子（例えば、lacZ、HIS3）の転写活性化を導く。レポーターの選択またはアッセイによって、hTRT相互作用タンパク質またはテロメラーゼ会合タンパク質を含有する細胞の遺伝子コロニーが、同定され得る。当業者は、2-ハイブリッドスクリーニングの多数の変法、例えば、LexA系（Bartelら、1993, Cellular Interactions in Development: A Practical Approach Hartley, D.A.編 (Oxford Univ. Press) 153-79頁）が存在することを、理解する。

【0307】

テロメラーゼ会合タンパク質を同定するために有用な他の方法は、3-ハイブリッド系である（例えば、Zhangら、1996, Anal. Biochem. 242:68；Licitraら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12817を参照のこと）。テロメラーゼRNA成分は、TRTまたはhTRTタンパク質および試験タンパク質を含むこの系において、利用され得る。相互作用タンパク質（すなわち、ヘテロ二量体化するかまたは高次のヘテロ多量体を形成するタンパク質）を同定するために有用な他の方法は、E. coli/BCCP相互作用スクリーニング系である（Germin

10

20

30

40

50

ら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:933; Guarente (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:1639を参照のこと)。

【0308】

本発明はまた、テロメア結合タンパク質(テロメラーゼ会合タンパク質であり得るか、またはそうでなくてもよい)と、hTRT(hTR、その他のRNA、または1つ以上のテロメラーゼ会合タンパク質と複合体化され得るか、またはされなくてもよい)との複合体を提供する。テロメア結合タンパク質の例は、TRF1およびTRF2(前出); mpA1、mpA2、RAP1(Buchmanら、1988, Mol. Cell. Biol. 8:210, Buchmanら、1988, Mol. Cell. Biol. 8:5086)、SIR3およびSIR4(Aparicioら、1991, Cell 66:1279)、TEL1(Greenwellら、1995, Cell 82:823; Morrowら、1995, Cell 82:831); ATM(Savitskyら、1995, Science 268:1749)、エンドキャッピング因子(Cardenasら、1993, Genes Dev. 7:883)、および対応するヒトホモログを包含する。前述の複合体は、一般的に、hTRTおよびhTRまたはテロメラーゼ会合タンパク質の複合体についての前出の記載のように、例えばインビトロまたはインビボでの混合または同時発現によって産生され得る。

【0309】

V. 抗体および他の結合薬剤

関連する局面において、本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、抗体フラグメント、一本鎖抗体、ヒトおよびキメラ抗体を含み、ファージ外皮もしくは細胞表面タンパク質に融合した抗体または抗体フラグメント、および当該分野で公知であり、かつ本明細書中に記載の他のものを含む、hTRTと特異的に免疫反応する抗体を提供する。本発明の抗体は、図17に記載したアミノ酸配列(配列番号2)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド、もしくはその免疫原性フラグメントまたはそれにより定義されるタンパク質上のエピトープを特異的に認識し得、そして結合し得る。本発明の抗体は、少なくとも約 10^7 、 10^8 、 10^9 または 10^{10} M^{-1} のhTRTに対する特異的結合親和性を示し得、そしてこれはポリクローナル、モノクローナル、組換えまたは他の産物であり得る。本発明はまた、hTRT構造エピトープ(例えば、hTRTタンパク質またはテロメラーゼRNPの表面上のエピトープ)を認識する抗hTRT抗体を提供する。同様に、所望ならば、hTRTタンパク質配列のコンピューターアシスト分析、HIV-1のp66サブユニットのような関連する逆転写酵素のコンフォメーションに対する比較(例えば、図3参照)によって、あるいは経験的にコンフォメーションエピトープを同定し得る。コンフォメーションエピトープを認識する抗hTRT抗体は、特に、ヒトテロメラーゼの検出および精製において、ならびにヒト疾患の診断および処置において有用性を有する。

【0310】

抗hTRT抗体の産生については、ヤギ、ヒツジ、ウシ、モルモット、ウサギ、ラットまたはマウスのような宿主を、hTRTタンパク質または免疫原性特性を保持するその任意の部位、フラグメントまたはオリゴペプチドでの注射によって免疫化し得る。抗体誘導のためのhTRTポリペプチドの選択において、生物学的活性を保持する必要はない; しかし、タンパク質フラグメントまたはオリゴペプチドは、免疫原性、および好ましくは抗原性でなければならない。免疫原性は、ポリペプチドおよびアジュバントを動物(例えば、ウサギ)に注射し、そして注射したポリペプチドに対して指向する抗体の出現をアッセイすることにより測定し得る(例えば、HarlowおよびLane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, COLD SPRING HARBOR LABORATORY, New York (1988)参照。すべての目的のために(例えば第5章において)本明細書中に全部が参考として援用される)。特異的抗体を誘導するために使用されるペプチドは、典型的には、少なくとも5個のアミノ酸、好ましくは少なくとも8個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも10個のアミノ酸から成るアミノ酸配列を有する。通常、それらは、配列番号2のタンパク質のアミノ酸配列の全てまたは隣接部分を模倣するか、またはそれと実質的な配列同一性を有する。hTRTタンパク質アミノ酸の短い領域は、キーホールリンペットヘモシアニン、およびキメラ分子に対して産生された抗hTRT抗体のような別のタンパク質の領域に融合され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を増大し得る。

10

20

30

40

50

【0311】

抗原は、動物に適した方法によって決定された様式で免疫系に対して提示される。これらのおよび他のパラメーターは、一般に、免疫学者に周知である。典型的には、注射は肉趾、筋肉内、皮内、リンパ節周辺または腹腔内に投与する。アフィニティー精製を含む日常的方法によって、宿主によって産生された免疫グロブリンを沈殿し、単離し、精製し得る。

【0312】

免疫原性hTRTペプチドの例示的な例を実施例8に提供する。さらに、実施例8は抗hTRTポリクローナル抗体の産生および使用を記載する。

【0313】

A) モノクローナル抗体

hTRTタンパク質およびペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養中の連続する細胞株による、抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いる本発明の方法に従って調製し得る。これらは、KoehlerおよびMilstein (Nature 256:495 [1975])によって最初に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosborら, 1983, Immunol. Today 4:72; Coteら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026)、およびEBVハイブリドーマ技術 (Coleら, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R Liss Inc., New York, NY, 77-96頁 [1985])を含むがこれらに限定されない。

【0314】

ある実施態様において、適切な動物を選択し、適切な免疫化プロトコルを続けて行う。非ヒトモノクローナル抗体 (例えば、ネズミ、ウサギ、ウマ) の産生は周知であり、そして例えば、hTRTまたはそのフラグメントを含有する調製物で動物を免疫化することによって達成し得る。ある方法において、適切な時間の後、動物の脾臓を切り出し、個々の脾臓細胞を、典型的には、適切な選択条件下で不死化骨髄腫細胞に融合する。その後、細胞をクローンに分離し、各クローン (例えば、ハイブリドーマ) の上清を、抗原の所望の領域に対して特異的な適切な抗体の産生につき試験する。抗体を産生する技術は当該分野で周知である。例えば、Godingら, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (第2版) Acad. Press, N.Y.およびHarlowおよびLane(前出)を参照のこと (そのそれぞれにつき、その全部は全ての目的で本明細書に援用される)。他の適切な技術は、抗原性ポリペプチドに対する、あるいは、ファージまたは同様のベクターにおける抗体 (後述を参照) のライブラリーの選択に対するリンパ球のインビトロ暴露を含む。

【0315】

B) ヒト抗体

本発明の別の局面において、hTRTポリペプチドに対するヒト抗体が提供される。ヒト免疫系のエレメントを有するトランスジェニック動物を用いて (例えば、米国特許第5,569,825号および第5,545,806号参照、これらの両方は全目的のためそれらの全部が本明細書中に参考として援用される)、あるいはヒト末梢血液細胞を用いて (Casaliら, 1986, Science 234:476)、既知の抗原に対するヒトモノクローナル抗体をまた作成し得る。いくつかのヒト抗体は、競合結合実験によって、あるいは特定のマウス抗体と同一のエピトープ特異性を有するように選択される。

【0316】

別の実施態様において、hTRTポリペプチドに対するヒト抗体は、Huseら, 1989, Science 246:1275 (本明細書中に参考として援用される) によって概説されている一般的なプロトコルに従って、ヒトB細胞由来のDNAライブラリーをスクリーニングすることにより生産し得る。hTRTポリペプチドに結合する抗体を選択する。次いで、このような抗体 (または結合フラグメント) をコードする配列をクローン化し、そして増幅する。Huseによって記載されているプロトコルは、しばしばファージディスプレイ技術とともに使用される。

【0317】

C) ヒト化もしくはキメラ抗体

本発明はまた、キメラ、ヒト様またはヒト化されて、それらの標的に対するそれらの親和

10

20

30

40

50

性を低下させることなく、それらの潜在的抗原性を低下させた抗hTERT抗体を提供する。キメラ、ヒト様およびヒト化抗体の調製は当該分野で記載されている（例えば、米国特許第5,585,089号および第5,530,101号；Queenら，1989，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029;およびVerhoeyanら，1988，Science 239:1534を参照；その全部は全目的のために本明細書中に参考として援用される。ヒト化免疫グロブリンは、実質的にヒト免疫グロブリン由来の可変フレームワーク領域（アクセプター免疫グロブリンという）および実質的に非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリン由来の相補性決定領域（ドナー免疫グロブリンという）を有する。もし存在すれば、定常領域は実質的にヒト免疫グロブリン由来である。

【0318】

ヒト患者への投与のようないくつかの適用において、本発明のヒト化（ならびにヒト）抗hTERT抗体は、ネズミまたは他の種由来の抗体よりも優れたいくつかの利点を提供する：（1）ヒト免疫系は、ヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を外来性のものとして認識するはずがなく、従って、このような注射された抗体に対する抗体応答は、全体的に外来性のマウス抗体または部分的に外来性のキメラ抗体に対してより低いはずである；（2）ヒト化抗体のエフェクター部分はヒトのものであるので、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用し得る；および（3）注射されたヒト化抗体は、天然に生じるヒト抗体と実質的に等しい半減期を有し、他の種の抗体よりも少なく、より低い頻度の用量を可能とする。前述のことから暗に意味されるように、抗hTERT抗体は疾患の処置に、すなわち、テロメラーゼ陽性細胞を標的化するための適用を有する。

【0319】

D）ファージディスプレイ

本発明はまた、ファージディスプレイ法（例えば、Dowerら，W091/17271およびMcCaffertyら，W092/01047；およびVaughanら，1996，Nature Biotechnology, 14:309；その全部は全目的のために本明細書中に参考として援用される）によって生産された抗hTERT抗体（または結合性組成物）を提供する。これらの方法において、ファージのライブラリーが生産される。ここで、メンバーはそれらの外表面上に異なる抗体を提示する。抗体は、通常、FvまたはFabフラグメントとして提示される。所望の特異性を有する抗体を表示するファージは、hTERTポリペプチドに対する親和性の豊富さによって選択される。

【0320】

ファージディスプレイ法の変形において、選択されたネズミ抗体の結合特異性を有するヒト化抗体が生産され得る。この方法において、選択されたネズミ抗体の重鎖または軽鎖可変領域のいずれかを出発物質として用いる。もし、例えば、軽鎖可変領域が出発物質として選択される場合、メンバーが同一の軽鎖可変領域（すなわち、ネズミ出発物質）および異なる重鎖可変領域を示すファージライブラリーが構築される。重鎖可変領域は、再編成されたヒト重鎖可変領域のライブラリーから得られる。hTERTポリペプチドに対する強力な特異的結合を示すファージ（例えば、少なくとも 10^8 M^{-1} および好ましくは少なくとも 10^9 M^{-1} ）が選択される。次いで、このファージ由来のヒト重鎖可変領域は、さらなるファージライブラリーを構築するための出発物質として働く。このライブラリーにおいて、各ファージは同一の重鎖可変領域（すなわち、最初のディスプレイライブラリーから同定された領域）、および異なる軽鎖可変領域を表示する。軽鎖可変領域は、再編成されたヒト可変軽鎖領域のライブラリーから得られる。再度、強力な特異的結合を示すファージが選択される。これらのファージは完全なヒト抗hTERT抗体の可変領域を表示する。これらの抗体は、通常、ネズミ出発物質と同一または同様のエピトープ特異性を有する。

【0321】

E）ハイブリッド抗体

本発明はまた、hTERTポリペプチドに対する抗体の特異性を共有するが、第2の部位にも特異的に結合し得るハイブリッド抗体を提供する。このようなハイブリッド抗体において、一方の重鎖および軽鎖対は、通常、抗hTERT抗体由来であり、他の対は別のエピトープまたはタンパク質に対して惹起された抗体由来である。この結果、多機能価の特性、すなわち、少なくとも2つの異なるエピトープに同時に結合する能力が得られ、ここで、少なくと

10

20

30

40

50

も1つのエピトープは、抗複合体抗体が結合するエピトープである。このようなハイブリッドは、各成分抗体を生産するハイブリドーマの融合によって、あるいは組換え技術によって形成され得る。このようなハイブリッドは化合物（すなわち、薬物）をテロメラーゼ陽性細胞に運搬するために使用され得る（すなわち、細胞傷害薬剤がガン細胞に送達される）。

【0322】

本発明の免疫グロブリンをまた、他の遺伝子由来の機能的領域（例えば、酵素）に融合させて、有用な特性を有する融合タンパク質（例えば、イムノトキシン）を生産し得る。

【0323】

F) 抗イディオタイプ抗体

また、上記の手法によって単離し得る抗イディオタイプ抗体もまた有用である。抗イディオタイプ抗体は、例えば、動物の一次抗体（すなわち、抗hTERT抗体またはそのhTERT-結合性フラグメント）での免疫化によって調製し得る。抗hTERT抗体については、一次抗体へのその結合がhTERTポリペプチドまたはそのフラグメントによって阻害されるその抗イディオタイプ抗体が選択される。抗イディオタイプ抗体およびhTERTポリペプチドまたはそのフラグメントは共に一次免疫グロブリンに結合するので、抗イディオタイプ免疫グロブリンはエピトープの「内部イメージ」を表し得、そして従って、アッセイにおいてhTERTポリペプチドに置換し得、あるいはそれを用いて、例えば患者において抗hTERT抗体を結合（すなわち、不活化し得る。抗イディオタイプ抗体をまた、テロメラーゼ会合タンパク質と相互作用し得る。このような抗体の投与は、hTERT会合タンパク質への結合においてhTERTで滴定するか、あるいは競合させることによってテロメラーゼ機能に影響し得る。

【0324】

G) 一般

本発明の抗体は任意のイディオタイプ、例えば、IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEであり得、IgG、IgAおよびIgMがしばしば好ましい。ヒト化抗体は1より多いクラスまたはイソタイプ由来の配列を含み得る。

【0325】

本発明の別の実施態様において、上述のインタクトな抗体のフラグメントが提供される。典型的には、これらのフラグメントは、それらが由来するインタクトな抗体とhTERTポリペプチドへの特異的結合について競合し得、少なくとも 10^7 、 10^8 、 10^9 M^{-1} 、または 10^{10} M^{-1} の親和性で結合し得る。抗体フラグメントは別々の重鎖、軽鎖、Fab、Fab'、 $(\text{ab}')_2$ 、Fab₂、およびFvを含む。フラグメントは、インタクトな免疫グロブリンの酵素的または化学的分離によって生じ得る。例えば、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントは、HarlowおよびLane（前出）に記載されたような標準的な方法を用い、pH3.0～3.5においてペプシンでタンパク消化することによってIgG分子から得ることができる。Fabフラグメントは、限定的還元によって $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントから、あるいは還元剤の存在下でのパパインの消化によって全抗体から得ることができる（一般には、Paul, W. 編, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY第2版 Raven Press, N.Y., 1989, 第7章を参照, その全部はすべての目的のために参考として援用される）。フラグメントはまた、組換えDNA技術によって産生され得る。選択されたフラグメントをコードする核酸のセグメントは、制限酵素での全長コード配列の消化によって、あるいはデノボ合成によって産生される。フラグメントはしばしば、ファージ外皮融合タンパク質の形態で発現される。

【0326】

上述の免疫グロブリンの多くは、結合特異性あるいはエフェクター機能の損失、または結合親和性の過剰な低下（すなわち、約 10^7 M^{-1} 未満）の欠失なしに、可変および定常領域双方において、重要でないアミノ酸置換、付加または欠失を受けることができる。通常、このような改変を取り込んだ免疫グロブリンは、それらが由来する参照免疫グロブリンに対して実質的な配列同一性を示す。それが由来する参照免疫グロブリンと比較して同一の特異性および増加した親和性を有する、変異免疫グロブリンを選択し得る。ファージディスプレイ技術はこのような免疫グロブリンを選択するための有用な技術を提供する。例えば

、Dowerら、WO 91/17271 McCattertyら、WO 92/01047；およびHuse、WO 92/06204参照。

【0327】

本発明の抗体は、修飾を施しても施さなくても使用し得る。しばしば、抗体は、検出可能な標識に共有結合的または非共有結合的のいずれかで結合することによって標識される。標識結合体として、本発明の抗体は診断適用において特に有用である。

【0328】

本発明の抗hTRT抗体は、周知の方法を用いて精製し得る。本発明の全抗体、それらのダイマー、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む当該分野の標準的な手順に従って、本発明の方法および試薬を用いて精製し得る（一般には、Scopes 10, PROTEIN PURIFICATION; PRINCIPLES AND PRACTICE 第3版, (Springer-Verlag, N.Y., 1993)を参照)。少なくとも約90～95%、または98～99%さへの、またはそれを以上の均一性の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましい。

【0329】

VI. ヒトテロメラーゼの精製

本発明は、前例のない純度の単離されたヒトテロメラーゼを提供する。特に、本発明は：組換えまたは非組換え起源の精製hTRT；必要に応じて1以上のテロメラーゼ会合タンパク質を含む組換え、非組換え、または混合起源の精製hTRT-hTR複合体（すなわち、RNP）；精製された天然に生じるヒトテロメラーゼ等を提供する。さらに、本発明は、変異体、融合タンパク質、天然に生じるタンパク質等を含む前記分子および複合体（集合的に、「hTRTおよび/またはhTR複合体という）を部分的に、実質的にまたは高度に精製するための方法および試薬を提供する。 20

【0330】

本開示に先立って、テロメラーゼ酵素複合体を均一となるまで精製しようとする試みは、限定的な成功に終わった。前記の適用で供される方法は、粗製細胞抽出物と比較して、約60,000倍またはそれ以上のテロメラーゼの精製を提供する。本発明は、部分的には、本発明の新規のイムノアフィニティー試薬（例えば、抗hTRT抗体）、および/またはhTRTの組換え発現について本明細書中に提供される試薬、細胞、および方法によって、より高い純度のhTRTおよびhTR複合体をも提供する。hTRTおよびhTR複合体の組換え発現は精製を容易とする。なぜなら、天然に生じるほとんどの細胞発現で見い出されるよりもかなり高い 30 レベルで所望の分子を産生し得る。そして/または組換えhTRT分子を、容易に精製し得るよう（例えば、エピトプタグとの融合によって）修飾し得るからである。

【0331】

天然に存在するテロメラーゼは任意のテロメラーゼ陽性細胞から精製し得ること、およびとりわけ、インビトロ、インビボ、もしくはエクソビボ、または前出の開示の植物もしくは動物発現系、あるいは当該分野で公知の他のもの/系のいずれかを用いて、組換えhTRTおよびhTR複合体を発現させ、そして精製し得ることが認識させる。

【0332】

1つの実施態様において、本発明のhTRT、テロメラーゼおよび他の組成物は、イムノアフィニティー工程を、単独でまたは他の精製工程と組み合わせて用いて精製される。典型的には、本発明によって提供されるような固定化されたまたは固定化され得る抗hTRT抗体を、抗hTRT抗体がhTRT抗原に結合する条件下で所望のhTRTまたはhTR - 含有複合体を含有する、細胞溶解物のようなサンプルと接触させる。当該分野で周知の方法によってサンプルの未結合成分を除去した後、hTRT組成物を、所望ならば、実質的に純粋な形態で、抗体から溶出し得る。1つの実施態様において、当該分野で周知のイムノアフィニティークロマトグラフィー法（例えば、HarlowおよびLane、前出；およびAusubel、前出；Hermansanら、1992, IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES (Academic Press, San Diego)を参照）を、本発明の方法に従って用いる。別の例示的な実施態様において、抗hTRT免疫グロブリン-hTR複合体の免疫沈降を固定化プロテインAを用いて行う。本発明の方法および試薬に従って使用するのに適した多数の改変および別のイムノアフィニティー精製プロト 40 50

コルは当業者に周知である。

【0333】

別の実施態様では、それらの高レベルの発現の結果として、イムノアフィニティー方法に代えて、またはそれに加えて、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム（例えば、イムノアフィニティー）、サイズ排除、アニオンおよびカチオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動等のような日常的なタンパク質精製法を用いて、組換えhTRTタンパク質を精製し得る（一般に、R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y. (1982)およびDeutscher, METHODS IN ENZYMOLOGY VOL.182: GUIDE TO PROTEIN PURIFICATION, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)を参照）。カチオン交換法は、hTRTタンパク質の塩基性pIのため特に有用であり得る。例えば、固定化ホスフェートを、カチオン交換官能基として使用し得る（例えば、P-11 Phosphocellulose, Whatman カタログ# 4071またはCellulose Phosphate, Sigmaカタログ#C 3145）。固定化ホスフェートは、hTRT精製につき2つの有利な特徴を有する。それは、カチオン交換樹脂であり、それは核酸のホスフェート骨格に対して物理的類似性を示す。これはアフィニティークロマトグラフィーを可能とする。なぜなら、hTRTはhTRおよびテロメリックDNAに結合するからである。また、他の非特異的および特異的核酸アフィニティークロマトグラフィー法もまた精製に有用である（例えば、Albertsら, 1971, Methods Enzymol. 21:198; Arnt-Jovinら, 1975, Eur. J. Biochem. 54:411; Pharmaciaカタログ#27-5575-02）。hTRTのこの結合機能のさらなる開発は、精製のための特異的核酸（例えば、テロメラーゼプライマーまたはhTR）アフィニティークロマトグラフィーの使用を包含し得（Chodoshら, 1986, Mol. Cell. Biol. 6:4723; Wuら, 1987, Science 238:1247; Kadonaga, 1991, Methods Enzymol. 208:10);ヌクレオチドに対する物理的類似性を示す固定化シブリコンブルー色素は、ヌクレオチドのhTRT結合に起因する（例えば、DNA合成のための基質として）、hTRT精製のための別の有用な樹脂である（Pharmaciaカタログ#17-0948-01またはSigmaカタログ#C 1285）。

10

20

【0334】

1つの実施態様において、hTRTタンパク質は、他のテロメラーゼ成分が同時発現されないインビトロまたはインビボ発現系から直接単離される。単離されたhTRTタンパク質はまた、例えば、（例えば、温和なまたは他の変性剤への暴露によって）テロメラーゼRNPを破壊し、そして（例えば、クロマトグラフィーまたはイムノアフィニティークロマトグラフィーのようなルーチンの手段によって）RNP成分を分離することによって、精製ヒトテロメラーゼまたはhTRT複合体から容易に取得し得ることが認識される。

30

【0335】

テロメラーゼ精製は、（例えば、ELISAによって）hTRTの富化を測定することによって、hTRの富化を測定することによって、または当該分野で公知の他の方法によってテロメラーゼ活性アッセイ（例えば、TRAPアッセイ、慣習的アッセイ、またはプライマー結合アッセイ）を用いてモニターし得る。

【0336】

本発明によって提供される精製されたヒトテロメラーゼ、hTRTタンパク質、およびhTRT複合体は、1つの実施態様において、高度に精製されている（すなわち、少なくとも約90%均一、より頻繁には少なくとも約95%均一）。均一性は、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動および当該分野で公知の他の手段（例えば、Ausubelら、前出を参照）のような標準的手段によって測定し得る。高度に精製されたヒトテロメラーゼ、hTRTタンパク質、またはhTRT複合体が時には望ましいが、実質的に精製された（例えば、少なくとも約75%均一）または部分的に精製された（例えば、少なくとも約20%均一）ヒトテロメラーゼ、hTRTタンパク質、またはhTRT複合体が多く適用で有用であり、本発明によってまた提供されることが理解される。例えば、部分的に精製されたテロメラーゼは、テロメラーゼ調節活性、および他の使用のための試験化合物をスクリーニングするのに有用である（例えば、後出および前出参照；米国特許第5,645,986号参照）。

40

【0337】

VII. テロメラーゼ関連疾患の処置

50

A) 序

本発明は、ヒト疾患および疾患状態の処置のために有用なhTERTポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を提供する。本発明の組換えおよび合成hTERT遺伝子産物（タンパク質およびmRNA）を用いて、細胞中のテロメラーゼ活性を生じさせまたは上昇させ、ならびにそれが所望でない細胞中のテロメラーゼ活性を阻害し得る。従って、細胞中のテロメラーゼ活性（例えば、テロメラーゼ触媒活性、忠実度、前進性（processivity）、テロメア結合等）の阻害、活性化または改変を用いて、細胞の増殖能力を変化させ得る。例えば、悪性腫瘍細胞のような不死化細胞におけるテロメラーゼ活性の低下は、細胞を有寿命性ものとし得る。逆に、有寿命性細胞（例えば、ほとんどのヒト体細胞）におけるテロメラーゼ活性の増加は、細胞の増殖能力を増加させ得る。例えば、それによりテロメア長を増加させる皮膚線維芽細胞におけるhTERTタンパク質の発現の結果、線維芽細胞増殖能力の増加を生じ；このような発現は創傷閉塞の年齢-依存性遅延化を遅延し得るかまたは転地し得る（例えば、West, 1994, Arch. Derm. 130:87を参照）。

10

【0338】

従って、1つの局面において、本発明は、細胞におけるヒトテロメラーゼ活性の存在、不存在、または量によって特徴付けられ、本明細書で開示される組成物および方法を用いる処置に感受性である疾患および病的状態を処置するのに有用である試薬および方法を提供する。これらの疾患は、以下により詳細に記載されるように、ガン、細胞増殖の他の疾患（特に、老化の疾患）、免疫学的障害、不妊症（または受精能）などを含む。

【0339】

20

B) ガンの処置

本発明は、腫瘍細胞におけるテロメラーゼ活性を低下させるため、およびガンを処置するための方法および組成物を提供する。組成物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは活性改変タンパク質をコードする遺伝子治療ベクター、および抗hTERT抗体を含む。テロメラーゼ活性（テロメラーゼ陽性細胞）を発現するガン細胞（例えば、悪性腫瘍細胞）は、内因性テロメラーゼ活性を低下または阻害することによって死滅化し得る。さらに、テロメラーゼレベルは転移可能性のような疾患特徴に相関するので（例えば、米国特許第5,639,613号；第5,648,215号；第5,489,508号；Panditaら, 1996, Proc. Am. Ass. Cancer Res. 37:559）、テロメラーゼ活性におけるいずれの低下も疾患状態まで癌の攻撃的性質を低下させ得る。（従来の介入の有効性を増加する）より処置できる

30

本発明は、固体腫瘍および白血病を含む、広範なタイプのいずれのガンの処置にも有用な組成物および方法を提供する。処置し得るガンのタイプは、限定されないが、：乳房、前立腺および結腸の腺ガン；肺の全ての形態の気管支原性ガン；骨髄腫；黒色腫；肝ガン；神経芽腫；乳頭腫；アブドーマ；分離腫；鰓腫；悪性類ガン腫症候群；類ガン腫心臓病；ガン腫（例えば、ウォーカーガン、基底細胞ガン、基底有棘細胞ガン、ブラウン-ペアスガン、腺管ガン、エーリッヒ腫瘍、上皮内ガン、クレブス2ガン、メルケル細胞ガン、粘液性ガン腫、非小細胞肺ガン、燕麦細胞ガン、乳頭状ガン、硬性ガン、細気管支ガン、気管支原生ガン、扁平上皮ガン、および移行上皮ガン）、組織球障害；白血病（例えば、B細胞性白血病、混合細胞性白血病、ヌル細胞性白血病、T細胞性白血病、T細胞性慢性白血病、HTLV-II関連白血病、リンパ性急性白血病、リンパ性慢性白血病、肥満細胞性白血病、および骨髄様白血病）；悪性組織球症；ホジキン病；免疫増殖小；非ホジキンリンパ腫；形質細胞腫；細網内皮症；黒色腫；軟骨芽細胞腫；軟骨腫；軟骨肉腫；線維腫；線維肉腫；巨大細胞腫；組織球腫；脂肪腫；脂肪肉腫；中皮腫；粘液腫；粘液肉腫；骨腫；骨肉腫；ユーイング肉腫；骨膜腫；腺線維症；腺リンパ腫；ガン肉腫；脊索腫；頭蓋咽頭腫；未分化胚細胞腫；過誤腫；間葉腫；中腎腫；筋肉腫；エナメル上皮腫；セメント質腫；歯牙腫；奇形腫；胸腺腫；栄養膜腫；腺ガン；腺腫；胆管腫；コレステリン腫；円柱腫；嚢胞腺ガン；嚢胞腺腫；顆粒層腫；半陰陽性卵巣腫瘍；肝ガン；汗腺腫；島細胞腫；レイディッヒ細胞腫；乳頭腫；セルトリ細胞腫；膜細胞腫；平滑筋腫；平滑筋肉腫；筋芽細胞腫；筋細胞腫；筋肉腫；横紋筋腫；横紋筋肉腫；脳室上衣細胞腫；神経節細胞腫；神経膠

40

50

腫；髄芽細胞腫；髄膜腫；神経鞘腫；神経芽細胞腫；神経上皮腫；神経線維腫；神経腫；傍神経節腫；非クロム親和性傍神経節腫；被角血管腫；好酸球増加随半性血管類リンパ組織増殖症；血管腫硬化症；血管腫症；グロムス血管腫；血管内皮腫；血管腫；血管周囲細胞腫；血管肉腫；リンパ管腫；リンパ管筋肉腫；リンパ管肉腫；松果体腫；ガン肉腫；軟骨肉腫；葉状嚢肉腫；線維肉腫；血管肉腫；平滑筋肉腫；白血肉腫；脂肪肉腫；リンパ管肉腫；筋肉腫；粘液肉腫；卵巣ガン；横紋筋肉腫；肉腫（例えば、ユーイング肉腫、実験的肉腫、カボシ肉腫；および肥満細胞肉腫）；新生物（例えば、骨、乳房、消化系、結直腸、肝臓、膵臓、下垂体、精巣、眼窩、頭部および頸部、中枢神経系、聴覚、骨盤、呼吸管、および尿生殖系）；神経線維腫症、および子宮頸部形成異常）を含む。本発明は、例えば、hTERT、テロメラーゼ酵素、またはテロメラーゼ活性の脱調節（例えば、異常に高い発現）によって、不死化または過剰増殖状態となった他の病的状態の処置のための有用な組成物および方法を提供する。

10

【0340】

本発明は、さらに、抗hTERTワクチン、テロメラーゼ活性化を妨げる遺伝子治療ベクター、およびテロメラーゼ陽性細胞の特異的死滅を生じる遺伝子治療ベクターを含む、ガンの予防のための組成物および方法を提供する。関連する局面において、後述する遺伝子置換治療法は、ガンについての遺伝子偏好を「処置する」ために使用され得る。

【0341】

C) 他の病的状態の処置

本発明はまた、テロメラーゼまたはhTERT遺伝子産物の過少発現または過剰発現によって特徴付けられる疾患または疾患状態（ガンに加えて）の処置に有用な組成物および方法を提供する。例としては、細胞増殖の疾患、細胞老化から生じる疾患（特に、加齢の疾患）、免疫学的障害、不妊症、免疫不全の疾患などが挙げられる。

20

【0342】

加齢のある種の疾患は、細胞におけるテロメラーゼ活性の不存在（またはそのかなり低いレベル）から生じる、減少したテロメア長（より若い細胞と比較して）による細胞老化に関連する変化によって特徴付けられる。減少したテロメア長および低下した複製能は後述のような疾患に寄与する。テロメラーゼ活性およびテロメア長は、例えば、細胞におけるhTERT遺伝子産物（タンパク質およびmRNA）のレベルを増加させることによって増加し得る。hTERT発現が処置となり得る細胞老化に関連する病的状態の部分的なリストには、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、および卒中；年齢関連疾患（例えば皮膚萎縮症、エラストリシスおよび皮膚皺形成）、皮脂腺過形成、老人性黒子、毛髪の白髪化および脱毛、慢性皮膚潰瘍、および創傷治癒の年齢関連不全；変性関節病；骨粗鬆症：（例えば、BおよびTリンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、NK細胞およびそれらの各始原細胞のような細胞が関与する）年齢関連免疫系不全；アテローム性動脈硬化症、カルシウム沈着、血栓症、および動脈瘤を含む血管系の年齢関連疾患；糖尿病、筋肉萎縮症、呼吸器疾患、肝臓およびGI管の疾患、代謝疾患、内分泌腺疾患（例えば、下垂体および副腎の障害）、生殖疾患、および年齢関連斑点変性が含まれる。これらの疾患および状態は、細胞中のhTERT遺伝子産物のレベルを増加させて、テロメア長を増加させ、それにより細胞により大きな複製能力を回復させるかまたは付与することによって処置され得る。このような方法はエクスピボで培養した細胞またはインスピボの細胞に対して実行され得る。1つの実施態様において、細胞を、テロメラーゼを活性化し、そしてテロメアを長くするようまず処置し、次いで、hTERT遺伝子およびテロメラーゼ活性を不活化するよう処理する。好ましい実施態様において、テロメラーゼ活性は、分化に先立ってまたは分化の間に胚性の生殖細胞または幹細胞において本発明のベクターによって生じる。

30

40

【0343】

また、本発明は、不妊を処置するに有用な方法および組成物を提供する。ヒト生殖系細胞（例えば、精原細胞、それらの祖先または子孫）は不定期に増殖し得、そして高テロメラーゼ活性によって特徴付けられる。異常なまたは低下したレベルのhTERT遺伝子産物は、例えば、精子の不適切または異常な産生を生じ、不妊または生殖の障害に至る。従って、「

50

テロメラーゼをベースとする」不妊は、テロメラーゼレベルを増加させるための本明細書に記載した方法および組成物を用いて処置され得る。同様に、テロメラーゼの阻害は、精子形成、卵子形成、および精子および卵子の生存能に負に影響 (impact) し得るので、本発明のテロメラーゼ阻害性組成物は、生殖系列細胞におけるhTERT遺伝子産物レベルを低下させるために使用される場合、避妊効果を有し得る。

【0344】

さらに、本発明は、テロメラーゼ活性を低下させることによって、テロメラーゼ陽性細胞（例えば、活性化リンパ球および造血幹細胞）の増殖能力を減少させるに有用な方法および組成物を提供する。従って、本発明は、免疫抑制を行う手段を提供する。逆に、本発明の方法および試薬は、処置的介入に先立って、低レベルのテロメラーゼを発現するかまたは

10

【0345】

D) 介入の態様

前記の議論から明らかなように、細胞のテロメラーゼのレベルまたはテロメラーゼ活性の調節は、細胞の増殖能力に対して絶大な効果を有し得、従って、疾患の処置において顕著な有用性を有する。やはり明らかなように、この調節は、テロメラーゼ活性の減少または活性の増大のいずれであってもよい。本発明のテロメラーゼ調節分子は、多数のメカニズムにより作用し得る；これらのうちのいくつかを、このサブセクションおよび以下のサブセクションに、処置剤を選択する際に実施者を助けるために記載する。しかしながら、本

20

【0346】

テロメラーゼ活性は、いくつかのメカニズムのうちの任意のもの、またはメカニズムの組合せにより減少させ得る。1つのメカニズムは、テロメラーゼ活性を低下させるためのhTERT遺伝子発現の低下である。この低下は、hTERT遺伝子のmRNAへの転写、プロセッシング（例えば、スプライシング）、mRNAの核輸送または安定性、hTERTタンパク質を産出するためのmRNAの翻訳、またはhTERTタンパク質の安定性および機能のレベルにおけるものであり得る。別のメカニズムは、本明細書中に開示した方法を用いて同定され得るか、あるいは本明細書に開示した組成物によって供される阻害性の核酸、ポリペプチドまたは他の薬剤（例

30

【0347】

細胞の増殖能を低下させる関連方法は、異常なテロメリック反復が合成されるように、低い忠実度合を有するhTERT変異型（すなわち、高い、例えば1%を超えるエラー率を有するhTERT変異型）を導入することを含む。これらの異常な反復は、テロメアタンパク質結合に影響し、そして染色体の再配置および異常に至り、そして/または細胞死に至る。

40

【0348】

同様に、テロメラーゼ活性は、いくつかのメカニズムのうちの任意のもの、またはメカニズムの組合せにより増大させ得る。これらは、細胞におけるhTERTの量を増大させることを含む。通常、これは、hTERTポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、細胞中に導入することによって行われる（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたhTERT DNA配列を含む組換えにより産生されたポリペプチド、または安定なhTERT mRNA）。あるいは、触媒的に活性なhTERTポリペプチドは、それ自体、例えば、マイクロインジェクションまたは当該分野で公知の他の手段によって、細胞または組織中に導入され得る。他のメカニズム

50

において、細胞における内因性hTERT遺伝子からの発現またはhTERT遺伝子産物の安定性は、増大させ得る。また、細胞におけるテロメラーゼ活性は、内因性テロメラーゼインヒビターとテロメラーゼRNPとの、または内因性hTERT転写リプレッサーとhTERT遺伝子との相互作用を干渉すること；hTERT転写アクチベーターの発現または活性を増大させること；および本開示を精査して当業者に明らかな他の手段によって増大させ得る。

【0349】

E) 介入薬剤

1) TRTタンパク質およびペプチド

1つの実施態様において、本発明は、（例えば、注入、リポソーム媒介融合、ヒドロゲルの腫瘍〔例えば、黒色腫〕表面への適用、ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22への融合または付着、および本明細書に記載されたおよび当該分野で公知の他の手段によって）標的細胞中に直接的に導入され得るテロメラーゼ活性を増大または減少させるテロメラーゼ調節ポリペプチド（すなわち、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチド）を提供する。第2の実施態様において、本発明のテロメラーゼ調節タンパク質およびペプチドは、所望のタンパク質またはペプチドをコードする核酸（例えば、DNA発現ベクターまたはmRNA）を細胞中に導入することによって、細胞において発現される。発現は、ベクターおよびプロモーターの選択に依存して、構成的または誘導性のいずれかであり得る（下記の議論を参照）。hTERTをコードするメッセンジャーRNA調製物は、一過性発現（例えば、テロメラーゼの一過性活性化）のみが所望である場合、特に有用である。細胞中への核酸導入および発現のための方法は、当該分野で周知である（また、本明細書の他の箇所、例えば、オリゴヌクレオチド、遺伝子治療方法のセクションを参照）。

【0350】

本発明の1つの局面において、細胞においてテロメラーゼ活性を増大させるテロメラーゼ調節ポリペプチドが提供される。1つの実施態様において、ポリペプチドは、ヒトテロメリックDNAの合成（hTRのようなRNAテンプレートと組み合わせた）を指示し得る触媒的に活性なhTERTポリペプチドである。この活性は、例えば、TRAPアッセイのようなテロメラーゼ活性アッセイを用い、前記のように、測定され得る。1つの実施態様において、ポリペプチドは、配列番号2の1132残基の配列を有するか、またはその配列と実質的に同一の配列を有する完全長hTERTタンパク質である。別の実施態様において、ポリペプチドは、配列番号2のhTERTタンパク質の変異型（例えば、融合ポリペプチド、誘導体化ポリペプチド、短縮型ポリペプチド、保存的に置換されたポリペプチド、活性が修飾されたポリペプチドなど）である。融合または誘導体化タンパク質は、細胞膜を横切るポリペプチドの能力を増大させるか、あるいはポリペプチドを特定された細胞タイプ（例えば、肝臓細胞または腫瘍細胞）または細胞区画（例えば、核区画）に優先的に送達されるようにする標的化部分（targeting moiety）を含み得る。標的化部分の例は、脂質テイル、アミノ酸配列（例えば、アンテナペディアペプチド）または核局在化シグナル（NLS；例えば、Xenopusヌクレオプラスミン Robbinsら, 1991, Cell 64:615）を含む。天然に存在するhTERTタンパク質（例えば、配列番号2の配列またはそれと実質的に同一な配列を有する）は、細胞核で作用する。従って、配列番号2の1またはそれ以上のサブ配列（例えば、残基193~196(PRRR)および残基235~240(PKRPRR)）は、核局在化シグナルとして作用するようである。この小領域は、多くのNLSが、塩基性アミノ酸（KまたはR）から構成されるか、あるいは3塩基性アミノ酸（KまたはR）およびHまたはPから構成される4残基パターン；Pから始まり、3残基内に、4残基のうちに3つのKまたはR残基を含有する塩基性セグメントが続くパターンを含むという観察（例えば、Nakaiら, 1992, Genomics 14:897を参照）に基づくNLSであるようである。これらの配列のうちの1つまたは両方および/またはさらなる局所化配列の欠失は、核へのhTERT輸送に干渉し、そして/またはhTERTの代謝回転を増加させると予測され、その核基質へのテロメラーゼの接近を妨げ、そして増殖能力を減少させるために有用である。さらに、NLSを欠く変異型hTERTポリペプチドは、テロメア長を維持し得ないためRNPに組み立て得る。何故ならば、得られる酵素が核に侵入し得ないからである。

10

20

30

40

50

【0351】

本発明のhTRTポリペプチドは、代表的には、特に、それらが、細胞におけるテロメラーゼ活性を増大させるために使用される場合、標的細胞においてテロメラーゼRNA（例えば、hTR）とで会合する。1つの実施態様において、導入されたhTRTポリペプチドは内因性hTRと会合して、触媒的に活性なRNP（例えば、hTRおよび配列番号2の配列を有する完全長ポリペプチドを含むRNP）を形成する。また、このように形成されたRNPは、他のタンパク質（例えば、テロメラーゼ会合タンパク質）と会合し得る。他の実施態様において、テロメラーゼRNP（hTRTタンパク質、hTRおよび必要に応じて他の成分を含有する）は、複合体として標的細胞に導入される。

【0352】

関連する実施態様において、hTRT発現ベクターは、テロメラーゼRNA（例えば、hTR）発現ベクターを同時にまたは引き続いて導入されるか、または前もって導入された細胞（またはこの細胞の子孫）に導入される。この実施態様において、hTRTタンパク質およびテロメラーゼRNAは、細胞において共発現され、そして集合（assemble）してテロメラーゼRNPを形成する。好ましいテロメラーゼRNAは、hTRである。細胞におけるhTRの発現に有用な発現ベクターは、前述されている（米国特許第5,583,016号を参照）。さらに別の実施態様において、hTRTポリペプチドおよびhTR RNA（または均等物）は、インビトロで会合して複合体を形成し、次いで、この複合体は、例えば、リポソーム媒介移入によって標的細胞に導入される。

【0353】

別の局面において、本発明は、細胞においてテロメラーゼ活性を低下させるに有用なhTRTポリペプチドを提供する。上記のように、これらの「阻害性」ポリペプチドは、直接的に、または組換え核酸の発現によって細胞に導入され得る。ペプチド模倣物、または非標準的アミノ酸（すなわち、遺伝コードによりコードされる20アミノ酸またはそれらの通常の誘導体以外のアミノ酸）を含むポリペプチドは、代表的には、直接的に導入されることが理解される。

【0354】

1つの実施態様において、テロメラーゼ活性の阻害は、正確なテロメア伸長に必要とされる成分の隔離に由来から生じる。このような成分の例は、hTRTおよびhTRである。従って、hTRに結合するが、テロメラーゼ触媒活性を有しないポリペプチドの投与は、細胞において内因性テロメラーゼ活性を低下させ得る。関連する実施態様において、hTRTポリペプチドは、hTR以外の細胞成分（例えば、1またはそれ以上のテロメラーゼ会合タンパク質）に結合され得、それにより細胞においてテロメラーゼ活性に干渉する。

【0355】

別の実施態様において、本発明のhTRTポリペプチドは、内因性に発現されるhTRTタンパク質と、テロメラーゼ機能に必要な別の細胞成分（例えばhTR、テロメリックDNA、テロメラーゼ会合タンパク質、テロメア会合タンパク質、テロメア、細胞周期制御タンパク質、DNA修復酵素、ヒストンまたは非ヒストン染色体タンパク質など）の相互作用に（例えば、競合によって）干渉する。

【0356】

内因性に発現されるhTRTタンパク質と他の細胞成分との相互作用に影響する本発明の分子（例えば、ポリペプチド）を選択することにおいて、本明細書に記載されるように、hTRTタンパク質の1またはそれ以上の保存されたモチーフを含む分子が好ましくあり得る。これらの領域の進化論的保存は、これらのモチーフが寄与するヒトテロメラーゼの適切な機能化において重要な機能を示し、従ってこのモチーフは、一般的には、hTRTタンパク質機能を変化させて、本発明の変異型hTRTタンパク質を作製するための有用な部位である。従って、保存されたモチーフ変異を有する変異型hTRTポリペプチドは、本発明のいくつかの適用に特に有用である。

【0357】

別の実施態様において、内因性hTRT遺伝子の発現は、大量のhTRTポリペプチド（例えば、

10

20

30

40

50

代表的には、内因レベルより少なくとも2倍多い、よりしばしば、少なくとも約10倍～約100倍)の細胞への導入によって抑制される。この大量のhTERTは、フィードバックループを介して作用して、hTERT遺伝子の転写、hTERTプレmRNAのプロセッシング、hTERT mRNAの翻訳、またはテロメラーゼRNPの組立および輸送を阻害する。

【0358】

2) オリゴヌクレオチド

a) アンチセンス構築物

本発明は、hTERT遺伝子産物の発現をインビトロまたはインビボで低下させるために使用され得る、方法およびアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド試薬を提供する。本発明のアンチセンス試薬の標的細胞への投与は、テロメラーゼ活性の低下を生じ、そして高テロメラーゼ活性によって特徴付けられる疾患(例えば、ガン)の処置に特に有用である。いずれかの特定のメカニズムに限定する意図はないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、センスhTERT mRNAに結合し、センスhTERT mRNAの翻訳に干渉すると考えられている。あるいは、アンチセンス分子は、hTERT mRNAをヌクレアーゼ消化に対して感受性とし、転写に干渉し、プロセッシング、局在化またはそうでなければRNA前駆体(「プレmRNA」)に干渉し、hTERT遺伝子からのmRNAの転写を抑制し、あるいはいくつかの他のメカニズムを介して作用し得る。しかし、アンチセンス分子がhTERT発現を低下させる特定のメカニズムは、重要ではない。

【0359】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、hTERTをコードするmRNAまたはhTERT遺伝子から転写されるmRNA由来の配列に特異的にハイブリダイズする、少なくとも7～10～代表的には20またはそれ以上のヌクレオチドのアンチセンス配列を含む。よりしばしば、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、約10～約50ヌクレオチド長、または約14～約35ヌクレオチド長である。他の実施態様において、アンチセンスポリヌクレオチドは、約100ヌクレオチド未満または約200ヌクレオチド未満のポリヌクレオチドである。一般に、アンチセンスポリヌクレオチドは、安定な二重鎖を形成するに十分な長さであるが、所望であれば、インビボに投与するに、十分に短く(送達の様式に応じて)あるべきである。標的配列への特異的ハイブリダイゼーションに必要なポリヌクレオチドの最小の長さは、とりわけ、いくつかの因子(例えばG/C含有量、ミスマッチ塩基の位置(もしあれば)、標的ポリヌクレオチドの集団と比較した場合の配列の独自性の程度、およびポリヌクレオチドの化学的性質(例えば、メチルホスホネート骨格、ペプチド核酸、ホスホロチオエート))に依存する。

【0360】

一般に、特異的ハイブリダイゼーションを確実にするために、アンチセンス配列は、標的hTERT mRNA配列と実質的に相補的である。特定の実施態様において、アンチセンス配列は、標的配列に正確に相補的である。しかし、アンチセンスポリヌクレオチドはまた、hTERT RNAまたはその遺伝子に対応する関連標的配列への特異的結合が、ポリヌクレオチドの機能的特性として保持される限り、ヌクレオチドの置換、付加、欠失、トランジション、転位、または修飾、あるいは他の核酸配列または非核酸部分を含み得る。

【0361】

1つの実施態様において、アンチセンス配列は、hTERT mRNAの比較的接近可能な配列(例えば、二次構造を比較的欠く配列)に相補的である。これは、例えば、MFOLDプログラム(Genetics Computer Group, Madison, WI)を用いて、予測されるRNA二次構造を解析し、そして当該分野で公知のようにインビトロまたはインビボで試験することによって決定され得る。hTERT機能のアンチセンス抑制について、細胞において試験され得るオリゴヌクレオチドの例は、配列番号1の配列の以下の位置: 40-60; 260-280; 500-520; 770-790; 885-905; 1000-1020; 1300-1320; 1520-1540; 2110-2130; 2295-2315; 2450-2470; 2670-2690; 3080-3110; 3140-3160; および3690-3710にハイブリダイズし得る(すなわち、実質的に相補的であり得る。)オリゴヌクレオチドである。効果的なアンチセンス組成物を同定するために有用な別の方法は、オリゴヌクレオチドの組合せ整列(combinatorial arra

10

20

30

40

50

y)を使用する(例えば、Milnerら、1997、Nature Biotechnology 15:537)。

【0362】

また、本発明は、アンチセンス配列に加えて(すなわち、アンチhTRTセンス配列に加えて)、配列を有するアンチセンスポリヌクレオチドを提供する。この場合、アンチセンス配列は、より長い配列のポリヌクレオチド内に含まれる。別の実施態様において、ポリヌクレオチドの配列は、アンチセンス配列から実質的になるか、あるいはアンチセンス配列である。

【0363】

アンチセンス核酸(DNA、RNA、修飾されたもの、アナログなど)は、核酸を生成する任意の適切な方法(例えば、化学合成および本明細書に開示された組換え法)を用いて作製され得る。1つの実施態様において、例えば、本発明のアンチセンスRNA分子は、デノボ(denovo)化学合成によって、あるいはクローニングによって調製され得る。例えば、hTRT mRNAにハイブリダイズするアンチセンスRNAは、ベクター(例えば、プラスミド)中のプロモーター作動可能に逆方向に連結したhTRT DNA配列(例えば、配列番号1、またはそのフラグメント)を、挿入(連結)することによって作製され得る。プロモーターならびに、好ましくは終止シグナルおよびポリアデニル化シグナルが適切に配置される場合、非コード鎖に対応する挿入された配列の鎖が転写され、そして本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとして作用する。

【0364】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、無細胞抽出物、細胞および動物(哺乳動物およびヒトを含む)においてテロメラーゼ活性を阻害するために使用され得る。例えば、以下のホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドはテロメラーゼ活性を阻害するために使用され得る：

【0365】

【化1】

- A) 5'-GGCATCGCGGGGGTGGCCGGG
- B) 5'-CAGCGGGGAGCGCGCGGCATC
- C) 5'-CAGCACCTCGCGGTAGTGGCT'
- D) 5'-GGACACCTGGCGGAAGGAGGG

【0366】

10マイクロモル濃度において、各オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドAおよびB；A、B、CおよびD；ならびにA、CおよびDの混合物は、1日当たり1回、7日間処理した場合、293個の細胞においてテロメラーゼ活性を阻害した。また、アンチセンスhTR分子(5'-GCTCTAGAATGAAGGGTG-3'がオリゴヌクレオチドA、BおよびC；A、BおよびD；ならびにAおよびCと併用された場合、阻害が観察された。このような実験で有用なコントロールオリゴヌクレオチドは：

【0367】

【化2】

- S1) 5'-GCGACGACTGACATTGGCCGG
- S2) 5'-GGCTCGAAGTAGCACCGGTGC
- S3) 5'-GTGGGAACAGGCCGATGTCCC

【0368】

を含む。

【0369】

目的の特定の適用のために最適な本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを決定するために、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドのセットを用いてスキャンを行い得る。

1つの例示的なセットは、hTRT mRNAにわたり(span)、そしてあるものから次のものへ15ヌクレオチドだけずれる30量体オリゴヌクレオチドである(すなわち、ON1は位置1-30に

10

20

30

40

50

対応し、TCCCACGTGCGCAGCAGGACGCAGCGCTGCであり、ON2は位置16-45に対応し、GCCGGGGCCA GGGCTTCCCACGTGCGCAGCであり、ON3は位置31-60に対応し、GGCATCGCGGGGTGGCCGGGGCCAGGG CTであり、そしてmRNAの最後まで同様に続く)。このセットの各メンバーは、本明細書に 開示するように阻害活性について試験され得る。次いで、目的の条件下で阻害活性を示す オリゴヌクレオチドは、目的の領域を同定し、そして目的の領域に対応する本発明の他の オリゴヌクレオチド(すなわち、8量体、10量体、15量体など)が、適用のための好まし い活性を有するオリゴヌクレオチドを同定ために試験され得る。

【0370】

アンチセンスポリヌクレオチドに関する一般的方法については、ANTISENSE RNA AND DNA, (1988), D.A. Melton編, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を 参照。また、Dagleら, 1991, Nucleic Acids Research, 19:1805も参照。アンチセンス処 置の概説については、例えば、Uhlmannら, Chem. Reviews, 90:543-584 (1990)を参照。

【0371】

b) 三重鎖のオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド

本発明は、(例えば、hTERT RNAの折り畳まれた領域(folded region)において、またはh TERT遺伝子において)二本鎖または二重鎖のhTERT核酸に結合し、三重らせん含有または「 三重鎖」の核酸を形成するオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド(例えば、DNA、R NA、PNAなど)を提供する。三重らせんの形成は、例えば、hTERT遺伝子の転写を妨げるこ とによってhTERT発現の阻害を生じ、従って、細胞においてテロメラーゼ活性を低下させる かまたは消失させる。いずれかの特定のメカニズムに限定する意図はないが、三重らせん 対合は、ポリメラーゼ、転写因子、または調整分子の結合が起こるに十分に、二重らせん が開く能力を弱めると考えられる。

【0372】

本発明の三重鎖のオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、三重らせん形成の塩基 対合則(例えば、Chengら, 1988, J. Biol. Chem. 263: 15110; FerrinおよびCamerini-O tero, 1991, Science 354: 1494; Ramdasら, 1989, J. Biol. Chem. 264:17395; Strobel ら, 1991, Science 254:1639; およびRigasら, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 :9591; これらのそれぞれを本明細書中で参考として援用する)ならびにhTERT mRNAおよび /または遺伝子配列を用いて構築される。代表的には、本発明の三重鎖形成オリゴヌクレ オチドは、hTERT RNAまたは遺伝子中の特定配列に「相補的な」、約10から少なくとも約25 ヌクレオチドまたはそれ以上の特定配列を含む(すなわち、安定な三重らせんを形成する に十分長い、所望であれば、送達の様式に応じて、インビボに投与するに十分短い)。 この意味で、「相補的な」とは、安定な三重らせんを形成し得ることを意味する。1つの 実施態様において、オリゴヌクレオチドは、hTERT遺伝子の調節領域(例えば、hTERT5'フラ ンキング配列、プロモーターおよびエンハンサー)、あるいは転写開始部位(例えば、転 写開始部位から-10と+10と間)に特異的に結合するように設計される。三重鎖DNAを用い る最近の処置の進歩の概説については、Geeら, 1994, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROA CHES (Huber およびCarr), Futura Publishing Co. Mt Kisco NY、およびRinislandら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5854 (共に本明細書中で参考として援用する)。 を参照。

【0373】

c) リボザイム

本発明はまた、テロメラーゼ活性の阻害に有用なリボザイムを提供する。本発明のリボザ イムはhTERT mRNAに結合し、それを特異的に切断し、不活化する。有用なリボザイムはhTR T mRNAに相補的な5'および3'末端配列を含み得、そして本明細書に開示されるhTERT mRN A配列に基づいて当業者によって設計され得る(PCT国際公開WO 93/23572参照、前掲)。 本発明のリボザイムは、グループIイントロリボザイム(Cech, 1995, Biotechnology 13:323)、およびハンマーヘッドリボザイムの他のもの(Edgington, 1992, Biotechnolog y 10:256)の特徴を有するものを含む。

【0374】

本発明のリボザイムはGUA、GUUおよびGUCのような切断部位を有するものを含む。本発明におけるテロメラーゼ活性のリボザイム媒介阻害のための他の最適切断部位は、PCT国際公開W0 94/02595およびW0 93/23569（共に、本明細書中で参考として援用する）に記載されたものを含む。切断部位を含有する標的hTERT遺伝子の領域に対応する長さが15および20リボヌクレオチドの間の短いRNAオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドをより望ましくし得る二次構造の特徴について評価され得る。切断部位の適合性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへの接近性を試験することによって、あるいは当該分野で公知の標準的な手法に従ってインビトロリボザイム活性について試験することによって、評価され得る。

【0375】

10

Huら、PCT国際公開W0 94/03596（本明細書中で参考として援用する）によって記載されているように、アンチセンスおよびリボザイム機能を単一オリゴヌクレオチドにおいて組み合わせ得る。さらに、リボザイムは、本発明の例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの記載と組み合わせた、前記のように、1以上の修飾されたヌクレオチドまたはヌクレオチド間の修飾された結合を含み得る。

【0376】

1つの実施態様において、本発明のリボザイムはインビトロで生成され、細胞または患者に導入される。別の実施態様において、遺伝子治療法が、エクスピボまたはインピボでの標的細胞におけるリボザイムの発現のために使用される。

【0377】

20

d) オリゴヌクレオチドの投与

典型的には、本発明の治療方法は、インピボ生理学的条件下でテロメラーゼ活性を阻害または刺激するように機能し、かつ治療的效果のために十分な時間の間その条件下で比較的安定であるオリゴヌクレオチドの投与を含む。前記したように、修飾された核酸は、このような安定性を付与することにおいて、ならびに所望の組織、器官、または細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を標的化するために有用であり得る。

【0378】

オリゴ- およびポリ- ヌクレオチドは、適切な医薬処方物中の薬物として直接的に、あるいは本明細書に記載されるようなリボソーム、イムノリボソーム、パリスティックス、細胞への直接取り込みなどを含む、核酸の細胞への導入手段によって間接的に送達され得る。疾患の治療のために、本発明のオリゴヌクレオチドは、治療的有效量で患者に投与される。治療的有效量は、疾患の徴候を寛解するのに、あるいは例えば、TRAPアッセイもしくはテロメラーゼの生物学的機能の他の適切なアッセイを用いて測定できるように、標的細胞におけるテロメラーゼ活性を調節させるのに十分な量である。治療目的のためのオリゴヌクレオチドの送達に有用な方法は、本明細書中で参考として援用する米国特許第5,272,065号に記載されている。薬学的に活性な化合物の投与の他の詳細は下記にて提供する。他の実施態様において、オリゴ- およびポリ- ヌクレオチドは、本発明の遺伝子治療および組換えDNA発現プラスミドを用いて送達され得る。

30

【0379】

3) 遺伝子治療

40

遺伝子治療とは、それが導入される（典型的には）哺乳動物細胞において医学的に有用な表現型効果を生じる外因性ポリヌクレオチドの導入をいう。1つの局面において、本発明は、テロメラーゼ関連状態の処置のための遺伝子治療法および組成物を提供する。例示的な実施態様において、遺伝子治療は、hTERT遺伝子産物（例えば、テロメラーゼ活性を増加させるための配列番号2の配列を有するhTERTポリペプチドに実質的に類似したhTERTタンパク質）または活性を低下させるための阻害性hTERTポリペプチドを発現するか、hTERT遺伝子またはmRNA配列を有する核酸（例えば、テロメラーゼ活性を低下させるためのアンチセンスRNA）を発現するか、hTERT遺伝子産物の発現に影響するポリペプチドまたはポリヌクレオチド（例えば、テロメラーゼ活性を低下させるためのhTERT mRNAに指向するリボザイム）を発現するか、あるいは内因性hTERT配列を置換または破壊する（例えば、それぞれ、遺

50

伝子置換および「遺伝子ロックアウト」)ベクターを細胞に導入することを含む。多数の他の実施態様が、本明細書の開示を考慮して当業者に明らかである。1つの実施態様において、hTRをコードするベクターもまた導入される。他の実施態様において、テロメラーゼ会合タンパク質をコードするベクターもまたhTRのためのベクターと共にまたはそれをとまなうことなく導入される。

【0380】

hTRT遺伝子治療で有用なベクターはウイルスまたは非ウイルスであり得、本発明のhTRT発現系に関連して上記したものを含む。遺伝子治療ベクターが本開示で記載されているようなプロモーターおよび他の調節またはプロセシング配列を含み得ることは当業者によって理解される。通常、ベクターは、オリゴリボヌクレオチドの転写を駆動するように働くプロモーターおよび、必要に応じて(プロモーター配列内に含まれるいずれかのものとも別の)エンハンサー、ならびに所望であれば、エピソーム維持または染色体組込みおよび高レベル転写を提供する他の調節エレメントを含む。遺伝子治療に有用なプラスミドは、選択マーカー、同定領域、および他の配列のような他の機能的エレメントを含み得る。さらなる配列は、細胞外部または細胞内の両方における安定性の付与、特定の器官、組織、または細胞集団へのhTRTヌクレオチド配列(センスまたはアンチセンス)の送達の標的化、細胞への侵入の媒介、細胞の核への侵入の媒介、および/または核DNA内への組込みの媒介において役割を有し得る。例えば、アプタマー様DNA構造、または他のタンパク質結合部位を用いて、細胞表面レセプター、またはレセプターへ結合する血清タンパク質へのベクターの結合を媒介させ、それにより細胞へのDNA導入の効率を増大させ得る。他のDNA部位および構造は、核膜中のレセプター、あるいは核に進みそれによりベクターの核取り込みを促進する他のタンパク質に直接的にまたは間接的に結合し得る。

【0381】

適切な遺伝子治療ベクターは、複製起点を有しても有していなくてもよい。例えば、患者への投与前のベクターの増殖のためにベクター中に複製起点を含ませることは有用である。しかし、宿主染色体DNAに組み込まれるか、あるいは宿主mRNAまたはDNAに結合するようにベクターを設計すれば、投与前に複製起点をしばしば除去できる。いくつかの状況(例えば、腫瘍細胞)において、外因性DNAを導入細胞に安定に取り込ませる必要はないであろう。なぜなら、一過性発現は腫瘍細胞を死滅させるのに十分であり得るからである。

【0382】

上記のように、本発明はまた、遺伝子置換処置(すなわち、内因性hTRT遺伝子の組換え遺伝子での相同組換えによる置換)のための方法および試薬を提供する。相同組換えによる組込みのために特別に設計したベクターを使用することもできる。相同組換えを最適化するための重要な因子は、染色体配列に対する配列同一性の程度および相同性の長さを含む。相同組換えを媒介する特異的配列もまた重要である。何故ならば、組込みは転写的に活性なDNAでかなり容易に起こるからである。相同標的化構築物を構築するための方法および材料は例えばMansourら, 1988, Nature 336:348; Bradleyら, 1992, Bio/Technology 10:534によって記載されている。また、米国特許第5,627,059号;第5,487,992号;第5,631,153号;および第5,464,764号も参照のこと。1つの実施態様において、遺伝子置換処置は、調節すべきhTRT遺伝子の発現を制御する調節配列の全てまたは一部を改変または置換することを含む。例えば、hTRTプロモーター配列(例えば、配列番号6に見い出されるような)は、(hTRT発現を低下させるか、あるいは転写調節部位を廃止させるために破壊され得、あるいは外因性プロモーターは、(例えば、hTRT発現を増加させるために)置換され得る。

【0383】

本発明はまた、hTRT「遺伝子ロックアウト」(すなわち、組換えにより産生されたベクターを用いる内因性hTRT遺伝子の相同組換えによる欠失または破壊)のための方法および試薬を提供する。遺伝子ロックアウトにおいて、標的化される配列は調節配列(例えば、hTRTプロモーター)、またはRNAもしくはタンパク質コード配列であり得る。内因性遺伝子の発現を変化させるための相同組換えの使用は米国特許第5,272,071号(および上記で引

10

20

30

40

50

用した米国特許)、WO 91/09955、WO 93/09222、WO 96/29411、WO 95/31560、およびWo 91/12650に詳細に記載されている。また、Moynahanら、1996、Hum. Mol. Genet. 5:875参照。

【0384】

本発明は、さらに、細胞に対して毒性であるタンパク質の発現を調節するためのhTRT遺伝子プロモーターを用いて、テロメラーゼ陽性細胞を特異的に死滅させるか、あるいはテロメラーゼ陰性細胞のテロメラーゼ陽性状態への形質転換を妨げるための方法を提供する。実施例14に示すように、hTRTプロモーター配列は、このプロモーターの活性化がレポーター遺伝子によってコードされるタンパク質の発現が生じるように、レポーター遺伝子に作動可能に連結させられ得る。レポータータンパク質の代わりに、コードされるタンパク質が細胞に対して毒性である場合、プロモーターの活性化は細胞の病的状態または死滅に至る。本発明の1つの実施態様において、毒性タンパク質をコードする遺伝子に作動可能に連結したhTRTプロモーターを含むベクターは、ヒト細胞(例えばヒト患者の細胞)のような細胞に導入され、hTRTプロモーター活性化因子が発現されるガン細胞のような細胞の細胞死を生じる。関連する実施態様において、コードされるタンパク質はそれ自体細胞に対して毒性ではないが、細胞を他の非毒性薬物に対して感受性にする活性をコードする。例えば、hTRT - プロモーター - ヘルペスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子融合構築物を腫瘍細胞に導入し、そしてガンシクロビル(gancyclovir)またはその等価物を投与することによって腫瘍を処置し得る(例えば、MooltonおよびWells, 1990, J. Nat'l Canc. Inst. 82:297参照)。当該分野では、本開示を考慮して当業者により本発明に従って改変され、そして適用され得る(hTRT以外のプロモーター配列を用いる)多数の他の適切な毒性のまたは潜在的に毒性のタンパク質および系が知られている。

【0385】

遺伝子治療ベクターは、インビボ、インビトロ、またはエクスピボで細胞または組織に導入され得る。エクスピボ治療のために、ベクターは、細胞、例えば、患者から採取され、同一患者に自己移植で戻すためにクローン的に増殖させられる幹細胞に導入され得る(例えば、その開示が本明細書中で参考として採用される米国特許第5,399,493号および第5,437,994号参照)。標的細胞のテロメラーゼ活性を増加させることを狙ったhTRT遺伝子治療のために標的化され得る細胞としては、胚幹細胞または胚細胞、前記した特に霊長類またはヒト細胞、造血幹細胞(AIDSおよび化学療法後)、血管内皮細胞(心臓および大脳血管病)、皮膚線維芽細胞および基底皮膚ケラチノサイト(創傷治癒および火傷)、軟骨細胞(関節炎)、脳の膠星状細胞および小膠細胞(アルツハイマー病)、骨芽細胞(骨粗鬆症)、網膜細胞(眼病)、および膵臓島細胞(I型糖尿病)および下記表8~17に列挙した細胞のいずれか、ならびに分裂することが知られている任意の他の細胞タイプが挙げられるが、これらに限定されない。

【0386】

本発明の1つの実施態様において、TRT(例えばhTRT)コード配列(または変異体)に作動可能に連結した誘導性プロモーターは、インビボまたはインビトロで細胞の増殖能力を調節するために用いられる。特別の実施態様において、例えば、誘導性プロモーターの制御下にあるhTRT発現ベクターでトランスフェクトしたインスリン - 産生膵臓細胞が患者に導入される。次いで、細胞がそれまで可能であったよりも増殖することを可能にするプロモーター活性化剤(例えば、テトラサイクリン)の患者への投与によって、細胞の増殖能力を制御することができる。次いで、治療する医師によって望まれるように、細胞増殖が停止され、継続され、あるいは再開される。

【0387】

4) ワクチンおよび抗体

hTRT配列を有する免疫原性ペプチドおよびポリペプチドは、患者において抗hTRT免疫応答を誘発し得る(すなわち、ワクチンとして作用し得る)。例示的な免疫原性hTRTペプチドおよびポリペプチドは後記実施例6および8に記載される。免疫応答は、目的のポリペプチドをコードするプラスミドベクターの送達(すなわち、「ネイクドDNA」の投与)によ

10

20

30

40

50

って惹起させ得る。目的の核酸は、注入、リポソーム、または他の投与手段によって送達することができる。1つの実施態様において、被検体においてテロメラーゼ発現細胞に対するクラスI MHC拘束細胞傷害性リンパ球応答を誘発する免疫様式が選択される。一旦免疫化されれば、個体または動物は、高レベルのテロメラーゼを発現する細胞（例えば、悪性細胞）に対して高い免疫応答を誘発する。

【0388】

抗hTERT抗体（例えば、ネズミ、ヒト、またはヒト化モノクローナル抗体）が患者に投与されて（例えば、受動免疫化）、テロメラーゼ発現細胞に対する免疫応答を達成し得る。

【0389】

F) 薬学的組成物

関連する局面において、本発明は、hTERTオリゴおよびポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体、アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターを単独で、または安定化化合物、希釈剤、担体、または別の成分または薬剤のような他の薬剤と組み合わせて含む薬学的組成物を提供する。

【0390】

本発明の治療用薬剤は、任意の無菌生体適合性薬学的キャリアー（生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、および水を含むが、それらに限定されない）中で投与され得る。これらの分子のいずれも、適切な賦形剤、アジュバント、および/または薬学的に受容可能なキャリアーと混合する薬学的組成物中にて、単独で、あるいは他の薬剤、薬物、またはホルモンと組み合わせて患者に投与され得る。本発明の1の実施態様において、薬学的に受容可能なキャリアーは薬学的に不活性である。

【0391】

薬学的組成物の投与は経口または非経口により達成される。非経口送達の方法としては、局所、動脈内（例えば、腫瘍に直接的に）、筋肉内、皮下、髄内、クモ膜下腔内、脳室内、静脈内、腹腔内、または鼻孔内の投与が挙げられる。活性成分に加えて、これらの薬学的組成物は、賦形剤または薬学的に使用できる製剤への活性化化合物のプロセッシングを促進する他の化合物を含む適切な薬学的に受容可能なキャリアーを含有し得る。処方および投与のための技術のさらなる詳細は「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES」(Maack Publishing Co., Easton, PA)の最終版に見い出され得る。

【0392】

経口投与のための薬学的組成物は、経口投与に適した投与形において当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアーを用いて処方され得る。このような担体は、薬学的組成物が患者による摂取に適した錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物などに処方されることを可能とする。PCT国際公開W0 93/23572参照。

【0393】

経口使用のための薬学的組成物は、活性化化合物を固体賦形剤と組合せ、所望により得られた混合物を粉砕し、所望ならば、錠剤または糖衣剤のコアを得るために、適切なさらなる化合物を添加した後、顆粒の混合物をプロセッシングすることを介して得られ得る。適切な賦形剤は炭水化物またはタンパク質充填剤であり、以下を含むが、それらに限定されない：ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖；トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース；ならびにアラビアゴムおよびトラガcantゴムを含むゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質。所望ならば、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウム）のような崩壊剤または可溶化剤が添加され得る。

【0394】

糖衣剤コアは、濃縮糖溶液のような適切なコーティングとともに提供される。これはまた、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポルゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラツカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混

10

20

30

40

50

合液をも含有し得る。製品同定のため、または活性化合物の量（すなわち、用量）を特徴付けるために、染料または色素が錠剤または糖衣剤に添加され得る。

【0395】

経口で使用され得る薬学的製剤は、ゼラチンよりなる押込ばめ（push-fit）カプセル、ならびにゼラチンおよびコーティング（例えば、グリセロールまたはソルビトール）よりなるソフト封着カプセルを含む。押込ばめカプセルは、ラクトースまたは澱粉のような充填剤またはバインダー、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定化剤と混合した活性な成分を含有し得る。ソフトカプセルでは、活性化合物は、安定化剤とともにまたはともなわずに脂肪油、流動パラフィンまたは液状ポリエチレングリコールのような適切な液体に溶解または懸濁され得る。

10

【0396】

非経口投与用の薬学的処方物は活性化合物の水溶液を含む。注射のために、本発明の薬学的組成物は水溶液、好ましくはハンクスの溶液、リンゲル溶液、または緩衝化生理食塩水のような生理学的に適合する緩衝液中に処方され得る。水性注射懸濁物は、懸濁物の粘度を増加させる物質（例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストラン）を含有し得る。さらに、活性化合物の懸濁物は、適切な油状注射懸濁物として調製され得る。適切な親油性溶媒またはビヒクルは、ゴマ油のような脂肪酸、あるいはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを含む。所望により、懸濁物は、高濃度溶液の製剤を可能にする安定化剤または化合物の溶解度を増加させる適切な薬剤または試薬を含有し得る。

20

【0397】

局所または鼻孔投与のために、浸透されるべき特定のバリアに対して適切な浸透剤が処方物中で使用される。このような浸透剤は一般に当該分野で公知である。

【0398】

本発明の薬学的組成物は、当該分野で公知の様式と同様の様式（例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣剤作製、水簸、乳化、カプセル化、包括、または凍結乾燥の手段によって）で製造され得る。

【0399】

薬学的組成物は塩として提供され得、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、コハク酸等を含むが、それらに限定されない多くの酸を用いて形成され得る。塩は、対応する遊離塩基形態である水性溶媒または他のプロトン性溶媒により可溶性である傾向にある。他の場合において、好ましい調製物は、使用に先だって、緩衝液と組み合わせた、4.5 ~ 5.5のpH範囲の1mM-50mMヒスチジン、0.1% ~ 2%スクロース、2% ~ 7%マンニトール中の凍結乾燥粉体であり得る。

30

【0400】

受容可能なキャリアー中に処方した本発明の化合物を含む薬学的組成物が調製された後、それらは適切な容器に入れられ、そして示された状態の治療のために標識され得る。ヒトテロメラーゼタンパク質および核酸の投与のために、このような標識は投与の量、頻度、および方法を含む。

【0401】

40

本発明で使用するのに適した薬学的組成物は、活性成分が意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を含む。「治療的有效量」または「薬理学的有効量」は十分に認識されているフレーズであり、意図される薬理学的結果を生じるのに有効な薬剤の量をいう。従って、治療的有效量は、処置されるべき疾患の徴候を軽減するのに十分な量である。所定の適用のための有効量（例えば、治療的有效量）を確認する1つの有用なアッセイは、標的細胞におけるテロメラーゼ活性に対する効果を測定することである。実際に投与される量は、処置が適用されるべき個体に依存し、好ましくは、所望の効果が顕著な副作用をとまなうことなく達成されるように最適化された量である。治療的有效量の決定は十分に当業者の能力内にある。

【0402】

50

いずれの化合物についても、治療の有効用量は、細胞培養アッセイまたは任意の適切な動物モデルのいずれかにおいて、最初に見積もられ得る。動物モデルはまた、所望の濃度範囲および投与経路を達成するために用いられる。次いで、このような情報を用いて、ヒトにおける投与に有用な用量および経路を決定することができる。

【0403】

治療の有効量とは、徴候または状態を軽減するタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、オリゴまたはポリヌクレオチド、アゴニスト、またはアンタゴニストの量をいう。このような化合物の治療効果および毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順（例えば、ED₅₀、集団の50%において治療的に有効な用量；およびLD₅₀、集団の50%に対して致死性である用量）によって決定され得る。治療効果と毒性効果との間の用量比は治療係数であり、それは比率ED₅₀ / LD₅₀として表され得る。大きな治療係数を呈する薬学的組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータが、ヒトでの使用のための量の範囲を公式化するのに使用される。このような化合物の用量は、好ましくは、毒性をほとんどまたは全くともなわないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にある。この用量は、使用される投与形態、患者の感受性、および投与経路に依存してこの範囲内で変化する。

【0404】

正確な用量は、治療されるべき患者を考慮して、個々の臨床医によって選択される。用量および投与は、十分なレベルの活性部分を提供するか、または所望の効果を維持するように調整される。考慮され得るさらなる因子としては、疾患状態の重症度（例えば、腫瘍のサイズおよび位置；患者の年齢、体重、および性別；投与の食餌制限時間、および頻度、薬物組合せ、反応感受性、および治療に対する耐性/応答）が挙げられる。特定の処方物の半減期およびクリアランス速度に応じて、持続作用性薬学的組成物は、3～4日毎に、毎週、または2週間に1回、投与され得る。特定の用量および送達の方法に関するガイドは文献に提供されている（本明細書中で参考として援用する米国特許第4,657,760号；第5,206,344号；および第5,225,212号参照）。当業者は、典型的には、タンパク質またはそれらのインヒビターよりもヌクレオチドについての異なる処方物を使用する。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、状態、位置などに対して特異的であり得る。

【0405】

VIII. 不死化した細胞、細胞株および動物の増大した増殖能力および産生

前記で議論したように、ほとんどの脊椎動物細胞は、培養において限定された数の分裂（例えば、50～100分裂）の後に老化する。しかしながら、ある変異細胞は、培養中に無限に分裂し得（例えば、HeLa細胞、293細胞）、そしてこの理由により、研究および産業的適用に有用である。通常、これらの不死化細胞株は自然発生的に生じる腫瘍に由来するか、あるいは照射または腫瘍誘導ウイルスもしくは化学物質にさらすことによる形質転換に由来する。あいにく、分化した細胞機能を示す細胞株（特にヒト細胞株）の限定的選択しか利用できない。さらに、現在利用可能な不死化細胞株は染色体異常（例えば、異数性、遺伝子再編成、または変異）によって特徴付けられる。さらに、多くの長期間樹立細胞株は比較的未分化である（例えば、それらは特定の組織または器官をユニークに特徴付ける種類の高度に特殊化した産物を産生しない）。従って、不死化細胞（特にヒト細胞）を生成する新しい方法に対する必要性がある。不死化細胞についての1つの用途は、天然タンパク質および組換えタンパク質（例えば、エリスロポエチン、ヒト成長ホルモン、インスリン等のような治療的ポリペプチド）、または抗体の生産においてであり、そのために安定で遺伝的に正常な細胞株が好適である。いくつかの組換えタンパク質の生産について、特殊化された細胞型もまた好適であり得る（例えば、ヒトインスリンの産生のための膵臓細胞）。さらには不死化細胞について、または（非改変細胞と比較して）増大した増殖能力を有する死ぬべき運命の細胞でさえ、別の用途は、遺伝子治療のため、または疾患もしくは損傷細胞または損傷組織の置換のための患者への導入である。例えば、本発明の組換えhTERT遺伝子またはポリペプチドを含有するまたは発現する自己免疫細胞を、攻撃的ガン

10

20

30

40

50

治療（例えば全身照射）の後に、患者における細胞置換のために使用し得る。不死化細胞についての別の用途は、治療的用途のための「人工」組織または器官（例えば、皮膚）のエキスピボ産生のためである。このような細胞について別の用途は、テロメラーゼ阻害性薬物のような薬物のスクリーニングまたは有効化のため、あるいはワクチンまたは生物学的試薬の生産における使用のためである。本発明の細胞のさらなる用途は当業者に明らかである。

【0406】

本発明の不死化細胞および細胞株、ならびに単に複製能力の増大したものは、細胞においてテロメラーゼ活性を増加させることによって作成される。テロメラーゼ活性を増加させるための本明細書に開示した任意の方法が使用され得る。従って、1つの実施態様において、細胞は、細胞中のhTERTポリペプチドの量を増加させることによって不死化される。1つの実施態様において、hTERTレベルは、（時々は好ましい安定なトランスフェクションにより）hTERT発現ベクターを細胞に導入することによって増大される。先に議論したように、hTERTコード配列は、通常、細胞中で誘導性または構成的に活性であり得るプロモーターに作動可能に連結される。

10

【0407】

1つの実施態様において、配列番号2（この配列はプロモーター（例えば、構成的に発現されるプロモーター、例えば、配列番号6の配列）に作動可能に連結している）のポリペプチドをコードする配列からなるポリヌクレオチドを細胞に導入する。1つの実施態様において、ポリヌクレオチドは配列番号1の配列を含む。好ましくは、ポリヌクレオチドはポリアデニル化および終結シグナルを含む。別の実施態様において、エンハンサーまたは前出議論の他のもののようなさらなるエレメントが含まれる。別の実施態様において、ポリヌクレオチドはプロモーター配列を含まず、このような配列は導入されたポリヌクレオチドの組み込み（例えば、組換え、例えば、相同組換え）により標的細胞の内因性ゲノムによって提供される。ポリヌクレオチドは、リポフェクション、エレクトロポレーション、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、ネイクドDNAのような本明細書中に開示された任意の方法を含むあらゆる方法によって標的細胞に導入され得る。

20

【0408】

本発明の方法を用いて、任意の脊椎動物細胞が、培養において、増大した増殖能力を有するように誘導され得るか、または不死化されそして培養において無限に維持されるようにさえされ得る。1つの実施態様において、細胞は哺乳動物のものであり、ヒト細胞が多くの適用について好ましい。不死化され得るヒト細胞の例は表8～17に列挙されたものを含む。

30

【0409】

後記する本発明の「診断」アッセイを用いて、本発明の不死化細胞を同定および特徴付け得ることが理解される。

【0410】

【表8】

hTERT発現が増大され得るヒト細胞

角質化上皮細胞

表皮のケラチノサイト（分化する表皮細胞）

表皮の基底細胞（幹細胞）

手指の爪および足指の爪のケラチノサイト

爪床の基底細胞（幹細胞）

10

毛髪長幹細胞

髄質、皮質、クチクラ；毛髪根鞘細胞、クチクラ、ハックスレイ層のもの、ヘンレ層外部のもの；毛髪マトリックス細胞（幹細胞）

湿潤重層バリア上皮の細胞

舌、口腔、食道、肛門、末端尿道、膣の重層偏平上皮の表面上皮細胞

これらの上皮の基底細胞（幹細胞）

外部角膜上皮の細胞

20

尿上皮の細胞（内層膀胱および尿管）

外分泌のための特殊化した上皮細胞

唾液腺の細胞

粘膜細胞（多糖が豊富な分泌）

漿液細胞（糖タンパク質酵素が豊富な分泌）

舌のフォンエブナー腺の細胞（味蕾上の洗浄のための分泌）

乳を分泌する乳腺の細胞

30

涙を分泌する涙腺の細胞

耳あかを分泌する耳の耳道腺の細胞

糖タンパク質を分泌するエクリン汗腺の細胞（暗色細胞）

小分子を分泌するエクリン汗腺の細胞（透明細胞）

アポクリン汗腺の細胞（発香性分泌、性ホルモン感受性）

40

【 0 4 1 1 】

【 表 9 】

眼瞼のモル腺の細胞（特殊化した汗腺）脂質豊富な皮脂を分泌する皮脂腺の細胞
 鼻のボーマン腺の細胞（嗅覚上皮上の洗浄のための分泌）
 粘液および酵素のアルカリ性溶液を分泌する十二指腸のブルナー腺の細胞
 フルクトース（泳ぐ精子の燃料）を含む精液の成分を分泌する精液小胞の細胞
 精液の他の成分を分泌する前立腺の細胞
 粘液を分泌する尿道球腺の細胞
 陰潤滑液を分泌するバルトリン腺の細胞 10
 粘液を分泌するリトル腺の細胞
 主として炭水化物を分泌する子宮内膜の細胞
 粘液を分泌する、呼吸管および消化管の単離された杯細胞
 胃の内層の粘膜細胞
 ペプシノゲンを分泌する胃腺の酵素原細胞
 HClを分泌する胃腺の胃酸分泌性細胞
 消化酵素および重炭酸イオンを分泌する膵臓の腺房細胞 20
 リゾチームを分泌する小腸のパーネト細胞
 界面活性剤を分泌する肺のII型肺胞細胞
 肺のクラウラ細胞
 ホルモンの分泌のための特殊化した細胞
 成長ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、プロラクチン、副腎皮質
 刺激ホルモン、および甲状腺刺激ホルモンを分泌する、下垂体前葉の細胞
 メラニン細胞刺激ホルモンを分泌する中間部下垂体の細胞 30
 オキシトシン、バソプレッシンを分泌する後部下垂体後葉の細胞
 セロトニン、エンドルフィン、ソマトスタチン、ガストリン、セクレチン、コレ
 シストキニン、インスリンおよびグルカゴンを分泌する消化管の細胞
 甲状腺ホルモン、カルシトニンを分泌する甲状腺の細胞
 副甲状腺ホルモン、好酸性細胞を分泌する副甲状腺の細胞
 エピネフリン、ノルエピネフリン、およびステロイドホルモン：鉱質コルチコイ
 ド、糖質コルチコイドを分泌する副腎の細胞 40

【 0 4 1 2 】

【 表 1 0 】

以下を分泌する性腺の細胞

テストステロン（精巣のライディヒ細胞）

エストロゲン（卵胞の卵胞膜内膜細胞）

プロゲステロン（破壊された卵胞の黄体細胞）

腎臓の傍糸球体装置の細胞

傍糸球体細胞（レニンを分泌する）

緻密斑細胞

10

極周囲細胞

血管間膜細胞

消化管、外分泌腺および尿生殖管における上皮吸収性細胞

（微絨毛を有する）腸の刷子縁細胞

外分泌腺の横紋管細胞

胆嚢上皮細胞

20

腎臓の近位細管の刷子縁細胞

腎臓の遠位細管細胞

輸出管の非線毛細胞

副睪丸の主細胞

副睪丸の基底細胞

代謝および貯蔵のための特殊化した細胞

肝細胞（肝臓細胞）

30

脂肪細胞

白色脂肪

褐色脂肪

肝臓の脂肪細胞

主としてバリアー機能を果たす、肺、消化管、外分泌腺、および尿生殖管を内層
する上皮細胞

I 型肺胞細胞（肺の気道を内層する）

40

【 0 4 1 3 】

【 表 1 1 】

膀胱管細胞（房心細胞）

汗腺、唾液腺、乳腺の非線条管細胞

腎臓糸球体の壁細胞

腎臓糸球体の有足突起

（腎臓中の）ヘンレのループの薄いセグメントの細胞

（腎臓中の）収集管細胞

精液小胞の管細胞、前立腺

10

密閉された内部身体腔を内層する上皮細胞

血管およびリンパ管の血管内皮細胞

有窓性

連続性

脾性

滑膜細胞（関節腔を内層する、ヒアルロン酸を大量に分泌する）

20

漿膜細胞（腹膜腔、胸膜腔、および血管周辺腔を内層する）

耳の外リンパ腔を内層する偏平上皮細胞

耳の内リンパ腔を内層する細胞

偏平上皮細胞

内リンパ嚢柱状（columnar）細胞

微絨毛有り

微絨毛無し

30

「暗」細胞

前庭膜細胞（脈絡叢細胞に類似する）

血管条基底細胞

血管条縁細胞

クラウジウス（Claudius）の細胞

ベットチェール（Boettcher）の細胞

40

【 0 4 1 4 】

【 表 1 2 】

脈絡叢細胞（脳脊髄液を分泌する）

軟膜クモ膜の偏平上皮細胞

目の毛様体上皮の細胞

着色

非着色

角膜「内皮」細胞

前方突進機能を有する線毛細胞

10

呼吸器管のもの

卵管のものおよび子宮内膜のもの（女性）

精巣網および輸尿管のもの（男性）

中枢神経のもの（脳腔を内層する上皮の細胞）

細胞外マトリックスを分泌するための特殊化した細胞

上皮細胞

20

エナメル芽細胞（歯のエナメルを分泌する）

耳の前庭装置の半月面細胞（プロテオグリカンを分泌する）

コルチ器の歯間細胞（コルチ器の毛細胞を覆う天蓋「膜」を分泌する）

非上皮細胞（結合細胞）

繊維芽細胞（緩い結合組織、角膜、腱、骨髄の網様組織などの種々のもの）

毛細血管の血管周囲細胞

椎骨間円板の核髄性細胞

30

セメント芽細胞／セメントサイト（歯根の骨様セメント質を分泌する）

ぞうげ芽細胞／オドントサイト（歯のぞうげ質を分泌）

軟骨細胞

硝子軟骨のもの、線維軟骨のもの、弾性軟骨のもの

骨芽細胞／オステオサイト

骨先祖細胞（骨芽細胞の幹細胞）

40

【 0 4 1 5 】

【 表 1 3 】

目の硝子体の硝子体細胞

耳の外リンパ腔の星細胞

収縮細胞

骨格筋細胞

赤色（遅い）

白色（速い）

中間

10

筋紡錘－核袋

筋紡錘－核鎖

衛星細胞（幹細胞）

心筋細胞

通常

結節性

20

ピルキニエ（Purkinje）繊維

平滑筋細胞

筋上皮細胞

虹彩のもの

外分泌線のもの

血液および免疫系の細胞

30

赤血球細胞

巨核細胞

マクロファージ

単球

結合組織マクロファージ（各種）

ランゲルハンス細胞（表皮中）

破骨細胞（骨中）

40

樹状細胞（リンパ組織中）

小神経膠細胞（中枢神経中）

【 0 4 1 6 】

【 表 1 4 】

好中球	
好酸球	
好塩基	
肥満細胞	
Tリンパ球	
ヘルパーT細胞	
サプレッサーT細胞	10
キラーT細胞	
Bリンパ球	
IgM	
IgG	
IgA	
IgE	20
キラー細胞	
血液および免疫系についての幹細胞（各種）	
二次トランスデューサー	
光レセプター	
桿体	
錐体	
青色感受性	30
緑色感受性	
赤色感受性	
聴覚	
コルチ器の内毛細胞	
コルチ器の外毛細胞	
加速および重力	40
耳の前庭装置のI型毛細胞	
耳の前庭装置のII型毛細胞	

【 0 4 1 7 】

【 表 1 5 】

味覚

II型味蕾細胞

臭覚

嗅覚ニューロン

嗅覚上皮の基底細胞（嗅覚ニューロンについての幹細胞）

血液Ph

頸動脈体細胞

10

I 型

II型

触覚

表皮のメルケル（Merkel）細胞

触覚のために特殊化された一次感知ニューロン

温度

20

温度のために特殊化された一次感知ニューロン

冷感受性

熱感受性

痛覚

痛覚のために特殊化された一次感知ニューロン

筋骨格系における立体感および力

固有受容一次感知ニューロン

30

自律神経性ニューロン

コリン作動性

アドレナリン作動性

ペプチド作動性

感覚器官および末梢ニューロンの支持細胞

【 0 4 1 8 】

40

【 表 1 6 】

コルチ器の支持細胞

内部柱細胞

外部柱細胞

内部指節骨細胞

外部指節骨細胞

境界細胞

ヘンセン (Hensen) 細胞

10

前庭装置のの支持細胞

味蕾の支持細胞 (I 型味蕾細胞)

嗅覚上皮の支持細胞

シュワン (Schwann) 細胞

衛星細胞 (被包性末梢神経細胞体)

腸神経膠細胞

20

中枢神経系のニューロンおよび神経膠細胞

ニューロン

神経膠細胞

星状神経膠細胞

稀突起神経膠細胞

レンズ細胞

30

前レンズ上皮細胞

レンズ繊維 (クリスタリン含有細胞)

色素細胞

メラノサイト

網膜着色上皮細胞

生殖細胞

卵原細胞／卵母細胞

40

精母細胞

【 0 4 1 9 】

【 表 1 7 】

精原細胞（精母細胞のための幹細胞）

栄養細胞

卵胞細胞

セルトリ（Sertori）細胞（睾丸中）

胸腺上皮細胞

幹細胞

胚性幹細胞

胚性生殖細胞

成人幹細胞

胎児幹細胞

10

【0420】

IX. 診断アッセイ

A) はじめに

20

1) TRTアッセイ

本発明は、TRT、好ましくはhTRTおよびテロメラーゼに対する非常に多様なアッセイを提供する。これらのアッセイは、とりわけ、ガンがその例示的な例である多数のヒトの疾患の診断および予後について、感度良好、安価、簡便で広範囲に適用できるアッセイの基礎を提供する。前記したように、hTRT遺伝子産物（タンパク質およびmRNA）は、通常、ほとんどの正常な死すべき細胞に対する不滅化ヒト細胞（すなわち、テロメラーゼ - 陰性細胞およびほとんどのテロメラーゼ - 陽性正常成体細胞）において上昇する。従って、1つの局面において、本発明は、（悪性腫瘍細胞のような）不滅化または（成体におけるほとんどの正常体細胞のような）死すべき、あるいはテロメラーゼ陽性または陰性として細胞を、特徴付けるために、ヒトまたは他の哺乳動物あるいは真核生物細胞からの、またはそれを含む試料におけるhTRT遺伝子産物の存在、不存在または量を検出または測定するのに有用なアッセイを提供する。

30

【0421】

hTRT遺伝子産物（すなわち、タンパク質またはRNA）の存在または不存在によって特徴付けられるいずれの障害も、本明細書に開示する方法および物質を用いて診断され得る。後記にてより十分に記載するように、これらは、ガン、加速された細胞増殖の他の疾患、免疫学的障害、受精、不妊症その他を含む。さらに、テロメラーゼ活性がガン細胞において上昇する程度は転移能力のような腫瘍の特徴と相関するので、hTRT、mRNAまたはタンパク質レベルのモニタリングを用いて、腫瘍の将来のありそうな進行を見積もりまたは予測することがされ得る。

40

【0422】

1の局面において、本発明の診断および予後方法は、ヒトTRT遺伝子産物が（例えば、患者由来の）生物学的試料中に存在するか否かを測定することを含む。第2の局面において、（例えば、患者由来の）生物学的試料におけるhTRT遺伝子産物の豊富さを測定し、コントロール試料（例えば、正常細胞または組織）における存在量と比較する。第3の局面において、hTRT遺伝子産物の細胞または細胞内局在性を細胞または組織試料において決定する。第4の局面において、宿主（例えば、患者）細胞をアッセイして、異常hTRT遺伝子発現（異常な量、調節、または産物）についての遺伝性の性質に特徴的な配列を持つ核酸を同定する。これは、例えば遺伝子スクリーニングまたは遺伝カウンセリングにおいて有用である。第5の局面において、本発明のアッセイを用いて、（例えば、患者血清中の）抗

50

hTERT抗体の存在を検出する。以下にいくらか詳細に記載する方法は、本明細書中に開示した配列および関係を用いて実施し得る有用なアッセイを示す。しかし、これらのアッセイの多数の変形または他の適用は、本開示を考慮すれば、当業者に明らかである。

【0423】

後記するアッセイは診断および予後方法につき提示するが、それらはhTERT遺伝子、遺伝子産物、または変異体が検出され、定量され、あるいは特徴付けられる場合はいつでも使用され得ることは認識される。従って、例えば、後記する「診断」方法は、hTERTまたはヒトテロメラーゼの生産および精製の間におけるhTERTまたはテロメラーゼのアッセイに、（例えば、不死株を同定するための）ヒト細胞に由来する細胞株の特徴付けに、ヒトTERT遺伝子または遺伝子産物（またはそのフラグメント）を含む細胞、非ヒト動物、植物、菌類、細菌または他の生物の特徴付けに有用である。

10

【0424】

本明細書中で用いる用語「診断」は、病気（例えば、ガン）、障害（例えば、不妊症、活性化）、または状態（例えば、受精）の存在または性質を同定するその通常の意味を有し、そして用語「予後」は、疾患または障害のありそうな進展および/または結果を予測するその通常の意味を有する。これらの2つの用語は臨床的な場では幾分異なるように使用されるが、「診断の」との関係において以下に開示されるアッセイまたはアッセイ様式のいずれも予後の判定に同等に適していることが理解される。なぜならば、より高いテロメラーゼ活性レベルはガン患者についてのより貧弱な予後に関係することが、十分確立されており、そして本発明が、細胞中のテロメラーゼ活性と密接に相関するレベルで発現される、hTERTに特異的な検出方法を提供するからである。

20

【0425】

2) ガンの診断および予後

正常または標準範囲を超えるhTERT遺伝子、mRNAまたはタンパク質のレベルの測定は、テロメラーゼ - 陽性細胞または不死化細胞（ある種の腫瘍がその例である）の存在の指標となる。ある種の胚性および胎児細胞、ならびにある種の成体幹細胞はテロメラーゼを発現するので、本発明はまた、母血液からのテロメラーゼ陽性胎児細胞の検出または単離によって、妊娠のような他の状態を測定する方法も提供する。これらの値を用いて、細胞がガン性として分類されていない、あるいは伝統的方法を用いて検出もしくは分類されていない場合でさえ、診断、あるいは診断の補助をすることができる。従って、本発明の方法は、少なくともいくつかの例においては初期の段階において、増大した信頼性をもって、テロメラーゼに関連するガン性または他の障害の検出または検証を可能とする。本発明のアッセイは、hTERT遺伝子または遺伝子産物についての定量的アッセイを供し、それにより適切な治療レジメンの選択および正確な診断を容易とすることにより、ヒト腫瘍または他の細胞増殖病の異なるクラスおよびグレードの間に区別を可能とする。さらに、テロメラーゼ活性のレベルを用いて、良性および悪性腫瘍の間を識別し得（例えば、米国特許第5,489,508号；Hiyamaら, 1997, Proc. Am Ass. Cancer Res. 38:637）、侵潤の内在性を予測し（例えば、米国特許第5,639,613号；Yashimaら, 1997, Proc. Am Ass. Cancer Res. 38:326）、そして転移可能性と相関付け得る（例えば、米国特許第5,648,215号；Panditaら, 1996, Proc. Am Ass. Cancer Res. 37:559）ので、これらのアッセイは広範囲のヒトガンの予防、検出および治療に有用である。

30

40

【0426】

ガン（または上昇したテロメラーゼによって特徴付けられる他の疾患または障害）の予後については、特定の腫瘍タイプ、クラスまたはグレードについてのhTERT遺伝子産物（mRNAまたはタンパク質）または活性の予後値を後記するように測定する。患者におけるhTERTタンパク質またはmRNAレベルまたはテロメラーゼ活性はまた（例えば、本明細書中に開示したアッセイを用いて）測定し、予後レベルと比較し得る。

【0427】

使用するアッセイに応じて、ある場合には、試料中のhTERT遺伝子産物の存在量は、アッセイで検出され得る場合は常に上昇していると考えられる。テロメラーゼ - 陽性細胞におい

50

てさえhTERT mRNAおよびタンパク質の存在量は低く、そしてこれらの遺伝子産物は、正常またはテロメラーゼ - 陰性細胞中では希薄であるかまたは存在しないため、もし正常細胞中に少しでも存在するならば、hTERT遺伝子産物を検出するためには、高感度のアッセイ必要がある。もし感度のより低いアッセイが選択されると、hTERT遺伝子産物は健康組織では検出不能であるが、テロメラーゼ陽性ガンまたは他のテロメラーゼ陽性細胞では検出可能である。代表的には、上昇した試料におけるhTERT遺伝子産物の量は、テロメラーゼ陰性コントロール細胞または成体における健康組織由来の細胞におけるレベルよりも少なくとも約5倍、頻繁には少なくとも約10倍、より頻繁には少なくとも約50倍、非常に頻繁には少なくとも約100～1000倍高く、ここで、テロメラーゼ陽性正常細胞のパーセントは非常に低い。

10

【0428】

本発明の診断および予後の方法は、あらゆる起源のあらゆる細胞もしくは組織型でも使用され得、そしてそれを用いて、あらゆる起源の不死化または新生物細胞または腫瘍組織、あるいはガンも検出することができる。検出され得るガンの型は、hTERTの治療的適用の議論で前記でリストした全てのものを含むが、これらに限定されない。

【0429】

また、本発明のアッセイは、抗ガン剤レジメンで治療されている患者において治療介入の効果をモニターするのに有用である。モニターされ得る抗ガン剤レジメンは（化学療法、放射線療法および外科手術を含めた）全ての現在認められている治療を含み、また、本明細書に記載するようにテロメラーゼ阻害または活性化療法のような将来承認される治療をも含む（例えば、PCT国際公開第96/01835号および第96/40868号および米国特許第5,583,016号を参照のこと。それらは全て、その全体が、本明細書中に参考として援用される）。

20

【0430】

別の局面において、後記するアッセイは、テロメラーゼ活性の異常調節に関連したガンまたは他の障害（不妊症、早期老化）に関して偏向を示すhTERT遺伝子配列におけるある種の変異（変異および遺伝性hTERT対立遺伝子）を検出するのに有用である。

【0431】

3) ガン以外の障害の診断

ガンの診断に加えて、本発明のアッセイは多数の他の適用を有する。本発明は、細胞におけるテロメラーゼまたはhTERT遺伝子産物の過小または過剰発現により特徴付けられる障害または疾患の試薬および方法/診断を提供する。成体においては、低レベルのテロメラーゼ活性は、通常、正常ヒト体細胞、例えば幹細胞、活性化リンパ球および生殖細胞の限定された補集合中に見い出され、そして他の体細胞では存在しない。従って、通常は存在せずまたは不活化されている細胞におけるhTERTまたはテロメラーゼ活性の検出、またはhTERTが通常は低レベルで存在する細胞（例えば、幹細胞、活性化リンパ球および生殖細胞）における異常（すなわち、正常よりも高いまたは低い）レベルでの検出は、テロメラーゼ関連疾患または障害の診断となり得るか、あるいはそれを用いて特定の細胞型を同定または単離（すなわち、幹細胞を単離）し得る。このような疾患および障害の例として、細胞増殖の疾患、免疫学的障害、不妊症、免疫細胞機能の疾患、妊娠、胎児異常、早期老化などが挙げられる。さらに、本発明のアッセイは、患者または細胞 - もしくは動物 - ベースのアッセイにおいて、（テロメラーゼ活性を調節する薬物を含むが、これらに限定されない）治療介入の有効性をモニターするのに有用である。

30

40

【0432】

1つの局面において、本発明は、不妊症を診断するのに有用なアッセイを提供する。ヒト生殖細胞（例えば、精原細胞、それらの祖先または子孫）は無限増殖が可能であり、そして高テロメラーゼ活性によって特徴付けられる。hTERT遺伝子産物の異常なレベルまたは産物あるいは低下したレベルは、不適当なまたは異常な精子の産生をもたらす得、それは不妊症または生殖障害につながる。従って、本発明は、「テロメラーゼベースの」生殖障害の診断および治療のためのアッセイ（方法および試薬）を提供する。同様に、該アッセイ

50

を用いて、精子生産を標的とするかあるいはそれに間接的に影響する（そして、hTERTレベルまたはテロメラーゼ活性を低下させる）避妊薬（例えば、男性避妊薬）の効率をモニターし得る。

【0433】

別の局面において、本発明は、幹細胞、胎児細胞、胚細胞、活性化リンパ球および造血幹細胞におけるテロメラーゼおよびhTERTのレベルおよび機能を分析するためのアッセイを提供する。例えば、hTERT遺伝子産物検出についてのアッセイを用いて、（例えば、活性化リンパ球の罹患率または始原幹細胞の存在量をモニターすることにより）一般的に免疫機能をモニターし、（上昇したhTERTレベルに基づいて）活性化リンパ球または幹細胞を同定しまたは選択しまたは単離し、そして、これらの組織を標的とする治療介入（例えば、免疫抑制剤または幹細胞集団を増やす治療的試み）の効率をモニターし得る。

10

【0434】

本発明はまた、（患者由来の血清中に見い出される）抗テロメラーゼおよび抗TERT免疫グロブリンの同定のための有用なアッセイも提供する。本明細書中に記載される物質およびアッセイを用いて、このような自己免疫抗体が見い出される患者を同定し、その免疫グロブリンに関連する障害の診断および治療を可能にし得る。

【0435】

4) 培養中細胞のモニタリング

本明細書中に記載されるアッセイはまた、エクスピボまたはインピトロの細胞中のhTERT遺伝子産物の発現およびhTERT遺伝子の特徴付けをモニターするのにも有用である。上昇したhTERTレベルは不死化細胞に特徴的であるので、本発明のアッセイは、例えば、不死化細胞をスクリーニング、または同定するのに、あるいはhTERT発現または機能を阻害することにより不死化細胞を死化し得る薬剤を同定するのに使用され得る。例えば、このアッセイは、細胞におけるhTERTの増大した発現によって、例えば、組換えhTERTの発現により、あるいは内因的にコードされたhTERTの（例えば、プロモーター活性化による）増大した発現により不死化した細胞を同定するのに有用である。

20

【0436】

同様に、これらのアッセイを用いて、トランスジェニック動物または細胞（例えば、hTERT遺伝子を含む酵母またはヒト細胞）におけるhTERT発現をモニターし得る。特に、本発明のhTERTを発現するヒトおよび非ヒト細胞におけるhTERTレベルに対するある種の処置（例えば、公知のまたは推定テロメラーゼアンタゴニストの適用）の効果は、有用な薬物および薬物候補（例えば、テロメラーゼ - 活性調節薬物）を同定するのに使用され得る。

30

【0437】

B) 正常な診断値、および予後値

hTERT遺伝子産物の存在または量についてのアッセイは、アッセイ形式、アッセイすべき試料の性質および求められる情報に依存して、種々の方法で行われ、その結果は解釈され得る。例えば、hTERT遺伝子産物の定常状態の存在量はほとんどのヒト体細胞で組織では非常に低いので、特定のアッセイにより検出不能である。さらに、一般に、これらの組織の細胞ではテロメラーゼ活性はなく、活性の確認をかなり容易とする。逆に、hTERTタンパク質および/またはhTERT mRNAまたはテロメラーゼは、他のテロメラーゼ陽性組織、例えば悪性腫瘍においては十分に豊富であり、従って、同じことが同一のアッセイを用いて検出され得る。低レベルのテロメラーゼ活性が通常は検出され得る体細胞タイプにおいてさえ（例えば、幹細胞およびある種の活性化された造血系細胞）、hTERT mRNAのレベルおよびテロメラーゼ活性は不死化細胞においてレベルの小分率（例えば、約1%またはそれ未満と見積もられる）であり；従って、不死化および死すべき細胞は本発明の方法により容易に区別され得る。「感度がより低い」アッセイを用いる場合、生物学的試料におけるhTERT遺伝子産物の単なる検出は、さらなる分析の必要性なくして、それ自体で診断となり得ると理解される。さらに、後記するアッセイはかなり高感度となし得るが、それらはまた、所望ならば、（例えば、緩衝液、洗浄条件、増幅のラウンド数、試薬の賢明な選択、および/またはシグナル増幅剤の選択により）低感度にもされ得る。従って、実質的にあらゆるア

40

50

ッセイか、それが、hTERT遺伝子産物が特別の濃度にて、例えば健康なまたは他のコントロール組織よりも高濃度で存在する生物学的試料においてのみhTERT遺伝子産物を検出するように設計され得る。この場合、hTERT mRNAまたはタンパク質のあらゆる検出可能なレベルが、（造血細胞および他の幹細胞以外の）誕生後ヒト体細胞組織由来の細胞中で上昇すると考えられる。

【0438】

しかし、いくつかの場合には、特に、正常体細胞に存在し得るhTERT遺伝子産物の非常に低レベルを検出し得る非常に高感度のアッセイが用いられる場合には、hTERT遺伝子産物発現レベルについて正常またはベースライン値（または範囲）を確立するのが望ましい。発現または正常発現産物の正常レベルは、当業者に周知の方法に従い且つ本発明の方法および試薬を用いて、生物のあらゆる特定の集団、サブ集団、またはグループについても決定され得る。一般に、hTERTタンパク質またはhTERT mRNAのベースライン（正常）レベルは、正常な（健常な）被験体、例えばヒト被験体から得られた生物学的試料（例えば、体液、細胞または組織）におけるhTERTタンパク質および/またはhTERTmRNAの量を定量することにより測定される。特定の試料および目的のために、細胞当たり、または腫瘍細胞当たりのペースでhTERT遺伝子産物の量を定量することを所望し得る。試料の細胞性(cellularity)を測定するために、構成的に発現される遺伝子産物または試料が採取されたタイプの細胞における既知レベルで発現される他の遺伝子産物のレベルを測定し得る。あるいは、hTERTタンパク質またはhTERT mRNAの正常値は、疾患（または恐らくは疾患の）細胞が収集されたのと同じ患者から、または健常な個体から得られる、健康であることが知られた細胞または組織におけるhTERTタンパク質/RNAの量を定量することにより測定され得る。あるいは、ベースラインレベルは、培養中の非不死化ヒト体細胞に存在するレベルとして、ある場合には定義され得る。正常（ベースライン）値は、異なる細胞型の間で（例えば、hTERT mRNAレベルは腎臓よりも睾丸において高い）、患者の年齢、性別または身体的状態に従って、幾分異なり得る可能性がある。従って、例えば、アッセイを用いてガンに関連するhTERTレベルの変化を測定する場合は、hTERT遺伝子産物発現の正常範囲を測定するのに使用される細胞は、調査の性質に依存して、同一または異なる年齢の個人からの細胞であり得る。分子遺伝学で使用される標準的な統計方法の適用は、発現のベースラインレベルの決定を可能とし、ならびにこのようなベースラインレベルからの有意な偏差の同定を可能とする。

【0439】

前記した本発明の診断および予後方法を行うにおいて、「診断値」および「予後値」に言及するのが時には有用である。本明細書中で用いる「診断値」とは、hTERT遺伝子産物の正常（または「ベースライン」）範囲と比較して、疾患の存在の指標となる試料中に検出されたhTERT遺伝子産物について決定された値をいう。この疾患は高テロメラーゼ活性（例えば、ガン）、テロメラーゼ活性の不存在（例えば、不妊症）、またはいくつかの中間体値により特徴付けられ得る。「予後値」とは、その疾患（例えば、ガン）について特定の診断および予後に合致する所与の細胞型（例えば、悪性腫瘍細胞）中に検出されたhTERT遺伝子産物の量をいう。試料中に検出されたhTERT遺伝子産物の（ゼロ量を含める）量は、その値の相対的比較が疾患の存在または疾患（例えば、ガン）の進行のありそうな結果を示すように、細胞についての予後値と比較される。1つの実施態様において、例えば、腫瘍予後を評価するために、データが収集され、異なる腫瘍クラスまたはグレートに関するhTERTレベルの統計的に有意な相関を得る。既知の臨床的結果を有する被験体から得られた同一の細胞または組織試料につき、所定の範囲のhTERTレベルを確立する。十分な数の測定を行い、比較がなされる統計的に有意な値（または値の範囲）を得る。次いで、所与の細胞または組織試料についての所定の範囲のhTERTレベルまたは活性を用いて、有利な（または不利ではない）予後（例えば、ガンの場合には「低レベル」）に相関するhTERT遺伝子産物のレベルについての値または範囲を測定する。ガンの場合の不利な（またはより不利な）予後に相関する「高レベル」に対応する範囲が同様に測定され得る。次いで、生物学的試料（例えば、患者試料）からのhTERT遺伝子産物のレベルを測定し、低いおよび高い範囲と比

10

20

30

40

50

較し、それを用いて臨床的結果を予測し得る。

【0440】

前記議論は、例示としてガンに対して言及するものであるが、診断値および予後値はまた他の疾患（例えば、細胞増殖の疾患）および障害についても測定され得、そして、ガン以外の疾患または障害については、「高」レベルは所望の結果と相関され得、「低」レベルは不利な結果と相関され得ることが理解される。例えば、いくつかの疾患は、幹細胞、活性化リンパ球、または生殖系細胞におけるテロメラーゼ活性の欠陥（例えば、低レベル）により特徴付けられ得る。このような場合、（例えば、他の患者または特定の患者における他の組織由来の）同様の年齢および/またはタイプの細胞に対するhTERT遺伝子産物の「高」レベルは有利な結果と相関させられ得る。

10

【0441】

このアッセイ方法は、そのように所望されない限り、hTERTの絶対値の測定を必ずしも要しないことが理解される。なぜならば、相対値は本発明の方法の多くの適用で十分だからである。定量が望ましい場合、本発明は、遺伝子産物を定量するためのあらゆる既知の方法が実質的に使用され得るような試薬を提供する。

【0442】

また本発明のアッセイを用いて、動物実験、臨床試験において、あるいは個々の患者の処置をモニターするにおける、特定の治療的処置レジメンの効率を評価し得る。これらの場合、治療を開始する前に患者に対してベースラインを確立し、通常は正規ベースに基づいて、治療経過を介して1回以上アッセイを反復し、治療の結果として、所望の終点（例えば、アッセイがガンについてのものであればhTERTの発現の低下）に向かってhTERTレベルが動いているか否かを評価するのが望ましい。

20

【0443】

当業者は、hTERT遺伝子産物の量または存在量に加えて、正常発現レベルおよび正常発現産物との比較により、変異体または異常な発現パターン（例えば、RNAスプライシング変異体の異常量）あるいは変異体または異常発現産物（例えば、変異した転写体、切り詰められたもしくはナンセンスポリペプチド）が同定され得ることを認識する。これらの場合において、「正常」または「ベースライン」の測定は、健康な生物および/または組織（すなわち、hTERT発現不調または新生物増殖のない生物および/または組織）を同定する工程、および変異体hTERT遺伝子産物（例えば、スプライシング変異体）の発現レベルを測定する工程、あるいはhTERT遺伝子、mRNA、または逆転写されたcDNAを配列決定しまたは検出して、代表的な（正常な）配列変化を得るまたは検出する工程を含む。分子遺伝学で使用される標準的な統計方法の適用は、このようなベースラインレベルからの有意な偏りの決定を可能とする。

30

【0444】

C) TERT遺伝子産物の検出および定量

本明細書中で強調してきたように、hTERT遺伝子産物は通常は極端に低いレベルにてほとんどの正常体細胞で見い出される。例えば、hTERTタンパク質をコードするmRNAは、これまでに調べた全てのテロメラーゼ - 陰性細胞型では極端に稀であるかまたは存在しない。293細胞のような不死化細胞においては、hTERT mRNAは細胞当たり約100コピーのみで存在し得る一方、正常な体細胞は細胞当たり1または0コピーしか有し得ない。このように、hTERT遺伝子産物につき高感度のアッセイが望まれる場合、シグナルまたは標的増幅技術のアッセイ形式に組み入れるのが時々有利であることが明らかである。例えば、Plenatら, 1997, Ann. Pathol. 17:17 (フルオレセインル-チラミドのシグナル増幅); Zehbeら, 1997, J. Pathol. 150:1553 (触媒されたレポーター沈殿); 本明細書中に挙げた他の文献(例えば、bDNAシグナル増幅、PCRおよび他の標的増幅形式につき); および当該分野で知られた他の技術を参照のこと。

40

前記したように、本明細書で開示するアッセイではhTERT mRNAまたはタンパク質を定量する必要のないことが多い。なぜならば、（その産物がコントロールの中で、例えばテロメラーゼ陰性細胞では検出されないアッセイ条件下での）hTERT遺伝子産物の検出はそれ自体

50

で診断に十分だからである。別の例として、試験（例えば、腫瘍）およびコントロール（例えば、健常細胞）試料中に見い出された産物のレベルが直接比較される場合、定量は不必要であり得る。

【0445】

しかし、所望ならば、本明細書中に記載するアッセイで測定されるhTRT遺伝子産物の量は、測定の方法および便宜に依存して、種々の方法で記載され得る。従って、正常、診断、予後、高量または低量のhTRTタンパク質/mRNAは、生物学的試料の量当たりの重量の標準単位として（例えば、グラム組織当たりのピコグラム、 10^{12} 細胞当たりのピコグラム）、生物学的試料の量当たりの分子の数として（例えば、転写物/細胞、モル/細胞）、細胞当たりまたは他の単位量当たりの活性の単位として、あるいは同様の方法により表現され得る。hTRT遺伝子産物の量はまた、別の分子の量に対して表現され得；その例として：試料中のhTRT転写物の数/試料中の28S rRNA転写物の数：hTRTタンパク質のナノグラム/全タンパク質のナノグラム等が挙げられる。

10

【0446】

2つ（またはそれ以上）の異なる試料におけるhTRT遺伝子産物を測定する場合、2つの試料に対する比較の共通のベースを有することが時々有用である。例えば、正常組織の試料とガン性組織の試料とを比較する場合、等量の組織（重量、容量、細胞数等）が比較され得る。あるいは、マーカー分子の等価物（例えば、28S rRNA、hTR、テロメラーゼ活性、テロメア長、アクチン）が使用され得る。例えば、28S rRNAの10ピコグラムを含む健常組織試料中のhTRTタンパク質の量が、28S rRNAの同一量を含む疾患組織の試料と比較され得る。

20

【0447】

また、本明細書中に記載したあらゆるアッセイが実質的に定量的であるように設計され得ることは当業者により認識される。代表的には、既知の量または供給源のhTRT遺伝子産物（例えば、本発明の方法および組成物を用いて生産したもの）を用いて該アッセイを較正する。

【0448】

特定の実施態様において、試料中（または代表的なサンプリング中の）各細胞におけるhTRT対立遺伝子または遺伝子産物の存在、不存在、または存在量を検出するアッセイ形式が選択される。このような形式の例として、組織学（例えば、シグナル増強または標的増強増幅工程を伴う免疫組織化学）または蛍光活性化細胞分析もしくは細胞ソーティング（FACS）によるシグナルを検出するものが挙げられる。これらの形式は、高度に異種の細胞集団（例えば、1または数個のタイプのみが上昇したhTRTレベルを有する多数の細胞型、または異なるレベルでテロメラーゼを発現する同様の細胞の集団を含む）を取り扱う場合は、特に有用である。

30

【0449】

D) 試料収集

hTRT遺伝子または遺伝子産物（すなわち、mRNAまたはポリペプチド）は、好ましくは、生物学的試料中で検出および/または定量される。このような試料は、限定されるものではないが、細胞（全細胞、細胞画分、細胞抽出物、および培養された細胞または細胞株を含む）、組織（血液、血液細胞（例えば、白血球細胞）、および（例えば、前立腺、乳房、甲状腺等からの）微小針バイオプシー試料のような組織試料、体液（例えば、尿、痰、羊膜液、血液、腹腔液、胸腔液、精液）またはそれから収集した細胞（例えば、尿からの膀胱細胞、血液からのリンパ球）、培地（培養細胞または細胞株からのもの）、および洗液（例えば、膀胱および肺）を含む。また、生物学的試料は、組織学的目的で採取された凍結切片のような組織の切片も含む。ガンの診断および予後では、試料はガン性または前ガン性あるいは疑われるガン性組織または腫瘍から得られる。後者の分析では（例えば、薬物処理の効果をモニターする場合）、生物学的試料を凍結するのが時々望ましいであろう。

40

【0450】

50

ある場合には、細胞または組織は、分析の前に分画される。例えば、患者からの組織パイプシーにおいて、周知の方法に従い、セルソーター（例えば、蛍光活性化セルソーター）を使用して、表面抗原（例えば、腫瘍表面抗原）の発現のような特徴に従って細胞を分けることができる。

【0451】

試料は典型的にはヒト患者または細胞株から採取されるが、このアッセイを用いて、他の動物からの試料におけるhTRT相同遺伝子または遺伝子産物を検出し得る。あるいは、hTRT遺伝子および遺伝子産物は、ヒトTRTタンパク質または核酸配列を発現するトランスジェニック動物または生物でアッセイし得る。

【0452】

試料は、所望すれば、適切な緩衝溶液での希釈によって必要により前処理し得、あるいは濃縮し得る。生理学的pHでのリン酸塩、トリス緩衝液等のような種々の緩衝液を使用する任意の多数の標準的水性緩衝液が使用され得る。

【0453】

患者から得られた「生物学的試料」は、「生物学的試料」または「患者試料」のいずれかとして呼び得る。「患者試料」の分析が患者からの細胞または組織の除去を必ずしも要しないことが認識される。例えば、適切に標識されたhTRT結合剤（例えば、抗体または核酸）を患者に注射し、標準的な画像化技術（例えば、CAT、NMR等）を用いて（標識に結合している場合には）可視化し得る。

【0454】

E) 核酸アッセイ

1つの実施態様において、本発明は、（スプライシングまたは配列変異体およびオルナナティブ対立遺伝子を含む）hTRT mRNAの発現を検出および/または定量する方法を提供する。別の実施態様において、本発明は、正常または異常なhTRT遺伝子（またはそのフラグメント）を検出し、そして分析する方法を提供する。このような定性または定量アッセイの形態は、限定されるものではないが、シグナルを増幅するまたは増幅しない増幅に基づくアッセイ、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイ、および組合せ増幅ハイブリダイゼーションアッセイを含み得る。ハイブリダイゼーションと増幅との間の区別は便宜的にすぎないと当業者によって認識される；以下の実施例で説明するように、多くのアッセイ様式はハイブリダイゼーションおよび増幅の両方の要素を含み、そのため、類別はある場合では幾分任意的である。

【0455】

1) 核酸の調製

いくつかの実施態様において、試験すべき細胞、組織、生物、または細胞株から単離した核酸の試料で核酸アッセイを行う。核酸（例えば、ゲノムDNA、RNAまたはcDNA）は、当業者に周知の任意の多数の方法に従って試料から「単離」され得る。この文脈で、「単離された」とは、混合物中の任意の他の物質から検出されるべき種または標的のいずれかの分離をいうが、標的の精製の有意な程度を必ずしも示さない。当業者は、hTRT遺伝子のコピー数の変化を検出すべき場合、ゲノムDNAが検出すべき標的であることを認識する。逆に、遺伝子または複数の遺伝子の発現レベルを検出すべき場合、RNAが核酸に基づくアッセイで検出すべき標的である。1つの好ましい実施態様において、核酸試料は生物学的試料中の全mRNA（すなわち、ポリ(A)⁺RNA）である。核酸を単離する方法は、当業者に周知であり、そして例えば、Tijssen, P. 編 LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, PART I. THEORY AND NUCLEIC ACID PREPARATION, Elsevier, N.Y. (1993)第3章（本明細書中で参考として援用される）に記載されている。1つの実施態様において、全核酸は、酸グアニジニウム - フェノール - クロロホルム抽出法を用いて所定の試料から単離され、そしてオリゴ - dTカラムクロマトグラフィーによって、あるいは(dT)_n磁性ビーズを用いることによって、ポリ(A)⁺mRNAは単離される（例えば、Sambrookら、およびAusubelら、前出を参照）。

【0456】

別の実施態様において、増幅、ハイブリダイゼーションまたは他のアッセイを行う前に核酸（例えば、全RNAまたはポリA⁺RNA）を生物学的試料から単離する必要はない。これらの実施態様は、hTERT RNAを測定すべき場合にある利点を有する。なぜなら、それらは単離および取り扱いの間にhTERT mRNAの喪失の可能性を低下させるからである。例えば、前記PCRおよびRT-PCRのような多くの増幅技術を、浸透した細胞（組織学的検体およびFACS分析）、全溶解細胞、またはある細胞抽出物のような粗細胞画分を用いて行い得る。好ましくは、工程は、要すれば、標的核酸（例えば、mRNA）の完全性を保持するように行われる（例えばRNAaseインヒビターの添加）。増幅およびハイブリダイゼーションアッセイはまた、例えば、バイオプシー試料からの薄い組織切片または細胞単層（例えば、血液細胞または解離させた組織培養細胞）からの薄い組織切片においてインサイチュで行い得る。増幅はまた、インタクトな全細胞または固定した細胞で行い得る。例えば、標的hTERT RNAまたはDNAを増幅するために、固定し、予め浸透させた、またはマイクロインジョンした細胞について、ポリメラーゼまたはリガーゼ、プライマー、および（デオキシ）リボヌクレオシド三リン酸（ポリメラーゼを使用する場合）、および逆転写酵素およびプライマー（RNAを転写し、cDNAを検出すべき場合）を用いて、インサイチュで当該分野で周知のように、PCR、RT-PCR、またはLCR増幅法を行い得る。次いで、hTERT RNAを含有する細胞（例えば、テロメラーゼ陽性細胞）または目的のhTERT DNA配列を検出し得る。この方法は、蛍光標識dNTP、プライマーまたは他の成分を顕微鏡、FACS分析または同等のものと組み合わせて使用する場合にしばしば有用である。

10

【0457】

20

2) 増幅に基づくアッセイ

1つの実施態様において、本発明のアッセイは、hTERT遺伝子または遺伝子産物の検出のための増幅に基づくアッセイである。増幅に基づくアッセイにおいて、hTERT遺伝子または転写物（例えば、mRNAまたはcDNA：本明細書中以後、「標的」ともいう）の全てまたは一部を増幅し、次いで、増幅産物を直接的または間接的に検出する。テンプレートとして作用すべき基礎となる遺伝子または遺伝子産物がない場合、（例えば、予測されるサイズの）増幅産物は生産されず、あるいは増幅は非特異的であり、そして典型的には、単一の増幅産物はない。対照的に、基礎となる遺伝子または遺伝子産物が存在する場合、標的配列が増幅され、基礎となる遺伝子またはmRNAの存在および/または量の指標が提供される。標的の増幅に基づくアッセイは当業者に周知である。

30

【0458】

本発明は、hTERT遺伝子および遺伝子産物を検出するための広範囲のプライマーおよびプローブを提供する。このようなプライマーおよびプローブは、標的核酸にハイブリダイズするためにhTERT遺伝子または遺伝子産物に対して十分に相補的である。プライマーは、典型的には、少なくとも6塩基、通常は約10と約100塩基との間、典型的には、約12と約50塩基との間の長さであり、そしてしばしば約14と約25塩基との間の長さである。本開示を再検討した当業者は、日常的方法を用いて、プライマーを選択してhTERT遺伝子または遺伝子産物の全部または任意の部分を増幅するか、あるいは変異体遺伝子産物とhTERT対立遺伝子等との間を区別し得る。表2はhTERT、または特定のhTERT遺伝子産物または領域のPCR増幅に有用な例示的プライマーを列挙する。当該分野で知られているように、単一オリゴマー（例えば、米国特許第5,545,522号）、オリゴマーのネステッド組、またはオリゴマーの変性プールさえも、例えば、後出のTetrahymena TRT cDNAの増幅によって例示されるように、増幅について使用され得る。

40

【0459】

本発明は、ポリメラーゼ鎖反応（全ての改変、例えば、逆転写酵素-PCR; Sunrise Amplification System (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD); および当該分野で公知の多数の他のものを含む）を含む、hTERT遺伝子または遺伝子産物を増幅しそして検出するための多数の方法を提供する。1つの例示的实施態様において、PCR増幅は、核酸試料（例えば、hTERT RNAの逆転写を介して得られたcDNA）、100 μlの各dNTP（dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP; Pharmacia LKB Biotechnology, NJ）、hTERT - 特異的PCRプライマー、1単位/Taqポリメラ

50

ーゼ (Perkin Elmer, Norwalk, CT)、1×PCR緩衝液 (50mM KCl、10mM Tris、室温でpH8.3、1.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチン) を含有する50μl溶液中で行い、94 で45秒間、55 で45秒間および72 で90秒間の約30サイクルの増幅を行う。しかし、評価されるように、多数の改変を行って、任意の特定の反応のためにPCR増幅を最適化し得る。

【0460】

他の適切な標的増幅法は、リガーゼ鎖反応 (LCR: 例えば、Wu およびWallace, 1989, Genomics 4:560; Landegrenら, 1988, Science, 241:1077, Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189およびBarringerら, 1990, Gene, 89:117); 鎖置換増幅 (SDA: 例えば、Walkerら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396); 転写増幅 (例えば、Kwohら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173); 自己維持配列複製 (3SR; 例えば、Fahyら, 1992, PCR Methods Appl. 1:25, Guatelliら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874); 核酸配列に基づく増幅 (NASBA, Cengage, Mississauga, Ontario; 例えば、Compton, 1991, Nature 350:91); 転写に基づく増幅系 (TAS); および自己維持配列複製系 (SSR) を含む。前記した文献のそれぞれを本明細書中で参考として援用する。1つの有用なPCRの改変はPCR ELISAである (例えば、Boehringer Mannheimカタログ番号1636111) であり、ここで、ジゴキシゲニン-dUTPがPCR産物に組み込まれる。PCR反応混合物を変性し、そしてPCR産物の内部配列にアニールするように設計されたビオチン標識化オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション産物をストレプトアビジン被覆プレートに固定化し、抗ジゴキシゲニン抗体を用いて検出する。インビトロ増幅法を介して当業者を指示するのに十分な技術の例は、PCR TECHNOLOGY: PRINCIPLES AND APPLICATION FOR DNA AMPLIFICATION, H. Erlich編、Freeman Press, New York, NY (1992); PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Innis, Gelfand, SniskyおよびWhite編、Academic Press, San Diego, CA (1990); Mattilaら, 1991, Nucleic Acids Res. 19:4967; EckertおよびKunkel, (1991) PCR METHODS AND APPLICATIONS 1:17; PCR, McPherson, QuirkiesおよびTaylor編、IRL Press, Oxford, 米国特許第4,683,195号、第4,683,202号および第4,965,188号; Barringerら, 1990, Gene, 89:117; Lomellら, 1989, J. Clin. Chem., 35:1826 (すべての目的についてそれぞれを本明細書中に参考として援用する) に見い出される。

【0461】

増幅産物を、例えば、ゲル電気泳動により決定されたサイズによって; ビーズ、膜、スライドまたはチップのような固体支持体に固定化した標的核酸へのハイブリダイゼーションによって; 配列決定によって; 免疫学的に、例えば、PCR-ELISAによって、蛍光、リン光、または放射性シグナルによって; または任意の種々の他の周知の手段によって直接分析し得る。例えば、検出方法の例示的な例は、プライマーが折り畳みが解けてそれらの標的に結合し、複製が起こる場合のみ蛍光が放射されるように、フルオレセインに連結したヘアピンループおよびクエンチャーとして働く安息香酸誘導体で増加したPCRプライマーを使用する。

【0462】

hTERT mRNAは、典型的には、テロメラーゼ陽性細胞においてさえ非常に低レベルの極度に稀な転写物として発現するので、増幅工程から生じたシグナルを最適化または増大することがしばしば望ましい。これを行う1つの方法は、増幅のサイクル数を増加することである。例えば、20~25サイクルが標準的な反応条件下でポリメラーゼ鎖反応反応を用いるほとんどのmRNAの増幅に適するが、多くの試料におけるhTERT mRNAの検出は、検出様式および増幅の効率に応じて、30~35サイクルもの増殖を要し得る。増幅サイクル数を含む増幅条件の賢明な選択を用いて、試験試料中の標的の閾値量が存在する場合のみ (すなわち、高レベルのhTERT mRNAを有する試料のみが「陽性」結果を生じる) 増幅産物が生じるアッセイを設計し得ることが認識される。さらに、標的配列の増幅によって産生されたシグナルを増加するための方法は既知である。増幅された標的を検出する能力を増加させる方法は: 分岐DNAシグナル増幅 (例えば、米国特許第5,124,246号; Urdea, 1994, Bio/Tech. 12:926); チラミドシグナル増幅 (TSA) 系 (Du Pont): 触媒的シグナル増幅 (CSA; Dako);

10

20

30

40

50

Q レプリカーゼ系 (Tyagiら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 93:5395)等のようなシグナル増幅系を含む。

【0463】

当業者は、いずれの増幅法を用いても、定量が所望であれば、当該分野で公知の種々の定量方法を使用し得ることを認識する。例えば、所望の場合、2以上のポリヌクレオチドを単一試料において共増幅し得る。この方法は試料中のhTRT mRNAの量を定量する簡便な方法として使用し得る。なぜなら、逆転写反応および増幅反応を標的およびコントロールのポリヌクレオチドに対して同一反応で行うからである。コントロールのポリヌクレオチド (通常は既知の濃度またはコピー数で存在させる) の共増幅を、試料中のhTRTの量と比較して試料中の細胞数に対する正規化に使用し得る。共増幅反応のための適切なコントロールのポリヌクレオチドは、ハウスキープینگ遺伝子、構成的に発現される遺伝子から発現されたDNA、RNA、および反応混合物に添加されたインビトロ合成されたRNAまたはDNAを含む。内因性コントロールのポリヌクレオチドは試料中に既に存在するものであり、一方、外因性コントロールのポリヌクレオチドは試料に添加されて、「スパイク」反応を生じる。例示的なコントロールのRNAは、アクチンRNA、GAPDH RNA、snRNA、hTRおよび内因的に発現された28S rRNAを含む (Khanら, 1992, Neurosci. Lett. 147:114参照)。外因性コントロールのポリヌクレオチドは合成AW106 cRNAを含み、これはT7ポリメラーゼによってpAW106からセンス鎖として合成され得る。共増幅法が定量に有用となるためには、コントロールおよび標的のポリヌクレオチドが典型的には共に直線的範囲で増幅されなければならないことが理解される。定量PCRについての詳細なプロトコルは、PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Innisら, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)およびAusubelら, 前出 (Unit 15) およびDiaco, R. (1995) 定量PCRアッセイの設計のための実質的な考察 84-108頁, Innisら編, Academic Press, New Yorkに見出し得る。

【0464】

内因性または外因性標準のための配列に応じて、異なるプラスマーのセットを共増幅反応について使用し得る。競合増幅と呼ばれる1つの方法において、定量PCRは、標的核酸の増幅に使用される同一プライマー (2つのプライマーのうち1対) を用いて、既知の量のコントロールの配列を同時に共に増幅することを含む。非競合的競合として公知の別の実施態様において、コントロールの配列および標的配列 (例えば、hTRT cDNA) を異なるプライマー (すなわち、2つのプライマーのうち2対) を用いて増幅する。半競合的増幅と呼ばれる別の実施態様において、3つのプライマーを用い、このうちの1つはhTRT特異的であり、このうちの1つはコントロール特異的であり、このうちの1つは標的およびコントロールの配列の両方にアニールすることができる。半競合的増幅は、本明細書中で参考として援用される米国特許第5,629,154号に記載される。

【0465】

3) ハイブリダイゼーションをベースとするアッセイ

a) 一般

核酸ハイブリダイゼーション技術を用いる特異的DNAおよびRNA測定のための種々の方法が当業者に公知である (Sambrookら, 前出)。ハイブリダイゼーションに基づくアッセイとは、プローブ核酸が標的核酸にハイブリダイズするアッセイをいう。通常、本発明の核酸ハイブリダイゼーションプローブは、hTRT遺伝子またはRNA配列の隣接配列に全くまたは実質的に同一である。好ましくは、核酸プローブは少なくとも約10塩基、しばしば少なくとも約20塩基、そして時々は少なくとも約200塩基以上の長さである。核酸ハイブリダイゼーションで用いる核酸プローブ配列を選択する方法は、Sambrookら (前出) に議論されている。いくつかの様式において、標的およびプローブのうちの少なくとも一方を固定化する。固定化核酸は、DNA、RNAまたは別のオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであり得、そしてまた、天然または非天然に存在するヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、または骨格を含み得る。このようなアッセイはサザンブロット、ノーザンブロット、ドットブロットおよびスロットブロット、高密度ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアレイ (例えば、GeneChipTM Affymetrix)、ディップスティック、ピン、チップ、また

はビーズを含む任意のいくつかの様式のいずれかであり得る。これらの技術の全ては当該分野で周知であり、多くの市販の診断キットの基礎である。ハイブリダイゼーション技術は、一般に、Hamesら編、NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH IRL Press, (1985); GallおよびPardue, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 63:378-383 (1969); およびJohnら, Nature, 223: 582-587 (1969)に記載される。

【0466】

種々の核酸ハイブリダイゼーション様式が当業者に公知である。例えば、1つの通常の様式は、直接ハイブリダイゼーションであり、ここで、標的核酸は標識された相補的なプローブにハイブリダイズする。典型的には、標識された核酸をハイブリダイゼーションに使用し、この標識は検出可能なシグナルを供する。hTERT mRNAの存在、不在または量を評価する1つの方法は、実施例2に例示されるように、試料からのRNAのノーザン転移および標識hTERT特異的核酸プローブのハイブリダイゼーションを行うことである。前述したように、全てが存在する場合、hTERT mRNAは、ほとんどの細胞で非常に少ない量で存在する。従って、ノーザンハイブリダイゼーションを用いる場合、増幅工程（または、あるいは、大量の出発RNA）を用いることがしばしば望ましい。試料中のhTERTタンパク質をコードするDNAの存在、不在または量を評価するための有用な方法は、試料からのDNAのサザン転移および標識hTERT特異的核酸プローブのハイブリダイゼーションを含む。

10

【0467】

他の通常のハイブリダイゼーション様式は、サンドイッチアッセイおよび競合アッセイまたは置換アッセイを含む。サンドイッチアッセイは、核酸配列を検出するかまたは単離する商業的に有用なハイブリダイゼーションアッセイである。このようなアッセイは、固体支持体に共有結合により固定化された「捕獲」核酸および溶液中の「シグナル」核酸を利用する。生物学的または臨床的試料は標的核酸を提供する。「捕獲」核酸および「シグナル」核酸プローブは標的核酸とハイブリダイズして、「サンドイッチ」ハイブリダイゼーション複合体を形成する。効果的にするために、シグナル核酸は捕獲核酸とはハイブリダイズし得ない。

20

【0468】

b) チップに基づくアッセイおよびスライドに基づくアッセイ

本発明はまた、hTERT核酸がそれにハイブリダイズし得る（すなわち、固定化オリゴ - またはポリ - ヌクレオチドのいくらかに対して、しかし通常は全てではなくほとんどである）固定化オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのアレイを使用するhTERT遺伝子産物のためのプローブに基づくハイブリダイゼーションアッセイを提供する。高密度オリゴヌクレオチドアレイまたはポリヌクレオチドアレイは、標的核酸（例えば、hTERT遺伝子、mRNAまたはcDNA）の存在および特徴（例えば、配列）を効率的に検出するための手段を提供する。インサイチュ合成のための写真平板技術を用いる表面上で規定された位置で、定義された配列に相補的な数1000のオリゴヌクレオチドを含有するアレイを産生する技術（例えば、米国特許第5,578,832号；第5,556,752号；および第5,510,270号；Foderら, 1991, Science 251: 767; Peaseら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5022; およびLockhartら, 1996, Nature Biotech 14:1675)または規定されたオリゴヌクレオチドの迅速な合成および沈積のための他の方法（Blanchardら, 1996, Biosensors & Bioelectronics, 11:687)が公知である。これらの方法を用いる場合、既知配列のオリゴヌクレオチド（例えば、20マー）を誘導体化されたガラススライドのような表面上に直接合成する。通常、産生されたアレイは冗長であり、検出されるべきhTERTポリヌクレオチドに特異的なチップ上のいくつかのオリゴヌクレオチドプローブを有する。

30

40

【0469】

オリゴヌクレオチドプローブの組合せは、オルタナティブスプライシングされたmRNAを検出するか、または種々のhTERT対立遺伝子のどれが特定の試料で発現するかを同定するように設計し得る。

【0470】

1つの例示的な実施態様において、試験細胞からの全RNAの逆転写によって調製されたcDN

50

Aを増幅する（例えば、PCRを用いて）。典型的には、増幅産物を、例えば、蛍光標識したdNTPの取り込みによって標識する。次いで、標識cDNAを、hTERT遺伝子の種々のサブ配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを含むチップにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの位置を、（例えば、Shalonら、1996、Genome Research 6:639またはShenら、1996、Genome Res. 6:639の一般的な方法に従い）決定し、そして配列（または他の情報）を当該分野で周知の手段によってハイブリダイゼーションパターンから推定する。

【0471】

1つの実施態様において、2つのcDNA試料（それぞれ異なる蛍光基で標識される）を同一チップにハイブリダイズさせる。次いで、hTERT遺伝子に相補的な部位への各標識試料のハイブリダイゼーションの比率をアッセイする。両試料が同一量のhTERT mRNAを含有するならば、2つの蛍光の比率は1：1である（蛍光由来のシグナルは蛍光のモル感度のいずれの差異のために調節する必要はないことが認識される）。対照的に、第1の試料が健康（またはコントロール）組織由来であり、第2の試料がガン性組織由来のものであれば、第2の試料で使用する蛍光は優勢である。

【0472】

c) インサイチュハイブリダイゼーション

hTERTタンパク質をコードする遺伝子の発現を検出する別の手段は、インサイチュハイブリダイゼーションである。インサイチュハイブリダイゼーションアッセイは周知であり、一般に、Angererら、METHODS ENZYMOL., 152:649-660 (1987)およびAusubelら、前出に記載されている。インサイチュハイブリダイゼーションアッセイでは、細胞または組織検体を、代表的には浸透状態で、代表的にはガラススライド上の固体支持体に固定する。次いで、細胞を中程度の温度でハイブリダイゼーション溶液と接触させて、hTERTに完全にまたは実質的に相補的な標識核酸プローブ（例えば、³⁵S-標識リボプローブ、蛍光標識プローブ）のアニーリングを行う。当該分野で公知のように、洗浄および/またはヌクレアーゼ消化によって遊離プローブを除去し、そしてオートラジオグラフィまたは適切な画像化技術によって結合プローブをスライド上で直接可視化する。

【0473】

4) 変異体の特異的検出

前記および実施例（例えば、実施例9）で説明するように、増幅プライマーまたはプローブを選択して、特定の欠失、切形、および挿入にまたがり、それによりhTERT mRNAにおける特定の変異体または異常性の検出を容易とする増幅産物を供し得る。

【0474】

検出され得るhTERT変異体遺伝子産物の1つの例は、前記および実施例9に記載された産物（配列番号4）のようなhTERT RNAである。182変異体の、生物学的機能は、あったとしても、知られていない；しかしながら、この変異体によって推定的にコードされる切形hTERTタンパク質は、例えば、テロメラーゼ成分を決定する非機能的テロメラーゼRNPを組み立てることによって、テロメラーゼ活性の調節に関与し得る。あるいはテロメラーゼ活性の負の調節は、全長mRNAを除去し、そしてhTERT mRNAレベルを低下させ、そして182 hTERT RNAレベルを増加させるに至るように、hTERTプレmRNA（未成熟のmRNA）のプロセッシングを指示することによって達成され得る。これらおよび他の理由で、182変異体を検出し得ることは有用である。さらに、それらの相対的および/または絶対的な量を比較することは、（182 hTERT RNA、および全長hTERTタンパク質をコードするhTERT RNAのような）hTERT RNAの2つの種が存在する試料においては時には望ましい。

【0475】

本発明は182変異型を検出するための種々の方法を提供する。例えば、182塩基対欠失をまたがるプライマー対を用いる増幅により、欠失および非欠失のhTERT RNAに対応する異なるサイズの産物が得られる。もし両者が存在すれば、（例えば、ゲル電気泳動によって）サイズに基づいて区別できる。182bp欠失をまたがる領域を増幅するのに有用なプライマー対の例は、TCP1.14およびTCP1.15（プライマー組1）、またはTCP1.25およびbTCP6（プライマー組2）を含む（表2～6参照）。これらのプライマー対を、個々に、あるいはブ

ライマー組 1 をまず用いるネステッドPCR実験で 사용할 ことができる。また、本発明の hTRT 核酸プローブを用いるハイブリダイゼーション方法（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション）または RNase 保護アッセイを用いて hTRT RNA 変異体を検出し、そして区別することができることは、当業者には明らかである。

【0476】

別の適切な方法は、3つのプライマーを用いるPCR増幅（または同等のもの）を含む。前記にてより詳細に記載した半競合的な定量的PCR方法と類似して、1つのプライマーは、（例えば、表18に例示するように）hTRT RNA種のそれぞれに対して特異的であり、そして1つのプライマーは、両方の種に相補的である（例えば、TCP1.25(2270-2288)）。配列番号1に特異的なプライマーの例は、182ヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1のヌクレオチド2345～2526）内にアニールするものである（例えば、TCP1.73(2465～2445)）。例えば、配列番号4（182変異体）に特異的なプライマーは、配列番号4のヌクレオチド2358～2339（すなわち、配列番号1における182ヌクレオチド挿入に対応する部位）にてアニールするものである。182 hTRT mRNA種の絶対的な量、または全長hTRTタンパク質をコードする種と比較したその相対的な量を、細胞状態（例えば、無限増殖の能力）に対して相関させるために分析することができる。多数の他のプライマーまたは増幅方法もしくは検出方法を本開示に基づいて選択できることが認識される。

【0477】

【表18】

例示的プライマー

Δ182 種 （例えば、配列番号 4） 特異的プライマー：

5'-GGCACTGGACGTAGGACGTG-3'

hTRT（配列番号 1） 特異的プライマー（TCP1.73）：

5'-CACTGCTGGCCTCATTACAGGG-3'

共通（正方向）プライマー（TCP1.25）：

5'-TACTGCGTGCGTCGGTATG-3'

【0478】

検出できる他の変異体hTRTの遺伝子または遺伝子産物は、成熟前の停止コドン、欠失、置換、または挿入によって特徴付けられるものを含む。欠失は、遺伝子、mRNA転写物、またはcDNAの減少したサイズによって検出できる。同様に、挿入は、遺伝子、mRNA転写物、またはcDNAの増加したサイズによって検出できる。挿入および欠失はまた、成熟前の停止コドンまたはより長いオープンリーディングフレームに至るリーディングフレームのシフトを引き起こし得る。置換、欠失、および挿入は、またプローブハイブリダイゼーションによっても検出できる。変化はまた、（例えば、ウェスタン分析によって）変異体hTRTポリペプチドのサイズの変化を観察することによって、あるいは適切にようにハイブリダイゼーションまたは特異的増幅によって検出され得る。あるいは、変異は、標準的な方法に従って遺伝子または遺伝子産物を配列決定することによって決定することができる。さらに、前記のように、増幅アッセイおよびハイブリダイゼーションプローブを選択して、特定の異常性を特異的に標的化することができる。例えば、欠失、置換、または挿入を含む領域に、それぞれ、特異的に、ハイブリダイズするか、あるいはそれを増幅する核酸プローブまたは増幅プライマーが選択され得る。hTRT遺伝子がそのような変異を有する場合、プローブは、（1）ハイブリダイズしないか、あるいは増幅反応は特異的な増幅を提供しないか、または増幅産物もしくはハイブリダイゼーションシグナルのサイズの変化を引き起こすか；あるいは（2）プローブまたは増幅反応は、全欠失または欠失のいずれかの端部

(欠失連結部)を含むか;あるいは(3)同様に、プローブおよび増幅プライマーは、点変異または挿入を特異的に標的化するように選択できるかのいずれかである。

【0479】

5) 変異hTERT対立遺伝子の検出

hTERT遺伝子中の変異は、疾患開始の原因となり得るか、あるいは疾患状態に寄与し得る。hTERTのゲノムDNAの変化は、遺伝子転写のレベルに影響し、hTERTタンパク質中のアミノ酸残基を変化させ、産生されるべき切形hTERTポリペプチドの産生を引き起こし、プレmRNAのプロセッシング経路を変化させ(これは、hTERT mRNAレベルを変化させ得る)、同様に他の結果を引き起こし得る。

【0480】

非hTERT遺伝子座におけるゲノムDNAの変化はまた、hTERT、hTR、およびテロメラーゼ会合タンパク質の発現およびプロセッシングならびにRNPアセンブリーおよび輸送の調節を担う酵素または細胞プロセスを変化させることによってhTERTまたはテロメラーゼの発現に影響し得る。hTERTの発現、プロセッシング、またはRNPアセンブリーに影響する変化は、ガンの進行、加齢の疾患、DNA損傷疾患、およびその他で重要であり得る。

【0481】

hTERT mRNAまたはその遺伝子および遺伝子制御エレメントにおける変異の検出は、複数の方法にて、本明細書中の方法に従って達成することができる。例示的な例は以下のものを含む: プライマースクリーニングと呼ばれる技術を使用できる; その3'末端が、恐らくは変異した試料DNA(またはRNA)中のヌクレオチドにアニールするPCRプライマーを設計する。このDNA(またはRNA)をプライマーによって増幅する場合、3'末端は遺伝子中のヌクレオチドにマッチする; このDNAが増幅されない場合、一方または両方の末端は遺伝子中のヌクレオチドにマッチせず、これは、変異が存在したことを示す。同様のプライマー設計を用いて、リガーゼ連鎖反応(LCR、前記)を用いて点変異についてアッセイすることができる。制限フラグメント長多型、RFLP(Pourzand, C., Cerutti, P. (1993) *Mutat. Res.* 288:113-121)は、本方法で適用できる別の技術である。種々の制限酵素で消化したヒトゲノムDNAのサザンブロットを、hTERT特異的プローブで探る。試料とコントロールとの間のフラグメントの数またはサイズの差は、実験試料の変化、通常は挿入または欠失を示す。一本鎖コンホメーション多型、SSCP(Orrita, M.ら(1989) *PNAS USA* 86:2766-70)は、本方法で適用され得る別の技術である。SSCPは、変性した野生型および変異体の一本鎖DNA(通常はPCRによって生じる)の異なる移動に基づく。一本鎖DNAは、配列特異的な三次元コンホメーションを採る。1塩基変化ほどの少ない配列の差異は、非変性ゲルでの移動度の変化をもたらす。SSCPは、その簡便さのために最も広範囲に使用される変異スクリーニング方法の1つである。変性グラジエントゲル電気泳動、DGGE(Myers, R. M., Maniatis, T.およびLerman, L., (1987) *Methods in Enzymology*, 155:501-527)は、本方法で適用され得る別の技術である。DGGEは、二本鎖DNAの融解挙動に基づいて変異を同定する。特殊化された変性電気泳動装置を利用して、実験およびコントロールDNAの融解プロフィールを観察する; 変異を含むDNAは、これらのゲル系においてコントロールと比較して異なる移動度を有する。議論した例は、通常に使用される方法を示す; 当業者により公知であり、そして本明細書における教示に従って適用され得る多くの他の技術が存在する。

【0482】

F. 核型分析

本発明は、さらに、hTERT配列プローブを用い、および/またはヒト患者、ヒト細胞株、または非ヒト細胞由来の染色体におけるhTERT遺伝子配列を検出するかまたは位置決定する核型分析または他の染色体分析用の方法および試薬を提供する。1つの実施態様において、増幅(すなわち、コピー数の変化)、欠失(すなわち、部分的欠失)、挿入、置換、またはhTERT遺伝子の染色体位置の変化(すなわち、転座)を、病理学的状態の存在または病理学的状態(例えば、ガン)を発症する素因と関連付けることができる。

【0483】

10

20

30

40

50

本発明により、正常ヒト細胞において、hTERT遺伝子が染色体5pのテロメアの近くにマップされると決定された（後記実施例5参照）。最も近いSTSマーカーはD5S678である（実施例8参照）。この位置を用いて、hTERT遺伝子に密接に連鎖しているマーカーを同定することができる。このマーカーを用いて、YAC、STS、コスミド、BAC、ラムダ、またはP1ファージ、あるいはhTERTゲノム配列またはコントロールエレメントを含む他のクローンを同定することができる。このマーカーまたは遺伝子の位置を用いて、ガンまたは疾患のタイプの出現と関連する正常hTERT遺伝子位置、編成化または配列の変化についてヒト組織試料を調べることができる。この情報は、関連する疾患またはガンについての診断または予後の方法で使用できる。さらに、hTERT遺伝子に対するいずれかの変化の性質は、細胞が不死化する性質に関する情報を与えることができる。例えば、転座事象は、hTERT発現の活性化が、hTERTプロモーターを不適切な様式でhTERT転写を指示する別のプロモーターで置き換えることによってある場合には生じることが示し得る。このタイプの本発明の方法および試薬を用いて、hTERT活性化を阻害することができる。この位置はまた、正常体細胞におけるhTERT遺伝子抑制の性質、例えば、この位置が非発現性のヘテロクロマチンの一部であるか否かを決定するために有用であり得る。ヘテロクロマチンおよびユークロマチンを区別するためのヌクレアーゼ過剰感度アッセイは、例えば、Wuら、1979, Cell 16:797; GroudineおよびWeintraub, 1982, Cell 30:131 GrossおよびGarrard, 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:159に記載されている。

【0484】

1つの実施態様において、hTERT遺伝子に対する変化は、当該分野で公知の種々の方法のいずれかを用いる核型分析によって同定される。1つの有用な技術はインサイチュハイブリダイゼーション（ISH）である。典型的には、インサイチュハイブリダイゼーション技術を核型分析で使用する場合、検出可能なまたは検出可能に標識されたプローブをインサイチュで染色体試料にハイブリダイズさせて、hTERT遺伝子配列の位置を決定する。一般に、ISHは、以下の1つ以上の工程よりなる：（1）分析すべき組織、細胞、または他の生物学的組織の固定；（2）標的DNAの接近性を増大させ（例えば、加熱またはアルカリでの変性）、および（例えばヒトゲノムDNAを用い、反復配列のハイブリダイゼーション能力を、例えばブロックすることによって）非特異的結合を低下させるための、生物学的組織のプレハイブリダイゼーション処理；（3）1種以上の核酸プローブ（例えば、通常の核酸、PNA、または他の核酸アナログを含有するプローブ）の、生物学的組織または組織中の核酸へのハイブリダイゼーション；（4）ハイブリダイゼーションにおいて結合しなかった核酸フラグメントを除去するためのハイブリダイゼーション後の洗浄；および（5）ハイブリダイズした核酸フラグメントの検出。これらの各工程で使用する試薬およびそれらの使用のための条件は、個々の適用に応じて変化する。これらの工程が当業者に周知の種々の方法で改変できることは理解される。

【0485】

ISHの1つの実施態様において、hTERTプローブを蛍光標識で標識する（蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、「FISH」）。典型的には、二重色素蛍光インサイチュハイブリダイゼーションの使用が望ましく、これは、2つのプローブを利用し、それぞれは異なる蛍光色素によって標識される。目的のhTERT配列にハイブリダイズする試験プローブを1つの色素で標識し、そして異なる領域にハイブリダイズするコントロールプローブを第2の色素で標識する。動原体領域のような、目的の染色体の安定な部分にハイブリダイズする核酸を、コントロールプローブとして用いることができる。このようにして、試料間でハイブリダイゼーションの効率の差を設けることができる。

【0486】

染色体の異常性を検出するためのISH方法（例えば、FISH）は、対象核酸のナノグラム量に対して行うことができる。新鮮なまたは凍結した材料、組織または切片で可能なように、パラフィン包埋した正常組織または腫瘍の切片を用いることができる。FISHは限定された材料に適用され得るので、非培養の原発性腫瘍から調製したタッチ(touch)調製物もまた使用できる（例えば、Kallioniemiら、1992, Cytogenet. Cell Genet. 60:190）。例え

10

20

30

40

50

ば、腫瘍由来の小さなバイオブシー組織試料を、タッチ調製物に使用できる（例えば、Kallioniemiら、前掲参照）。吸引バイオブシーから得られた少数の細胞、または体液（例えば、血液、尿、痰等）中の細胞も分析できる。出生前診断において、適切な試料は、羊水、母親血液等を含む。本明細書に開示する方法および試薬に適用可能な有用なハイブリダイゼーションプロトコルは、Pinkeloら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:9138 ; EPO公開第430,402号 ; Choo編, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 第33巻 ; IN SITU HYBRIDIZATION PROTOCOLS, Humana Press, Totowa, New Jersey, (1994) ; およびKallioniemiら、前掲に記載されている。

【0487】

核型分析に有用な他の技術は、例えば、生物学的試料中の染色体におけるhTERT配列の増幅、欠失、挿入、置換、または他の再配置を同定するのに使用され得る本発明のhTERTプローブおよびプライマーを用いる、定量的サザンブロッティング、定量的PCR、または比較ゲノムハイブリダイゼーション（Kallioniemiら、1992, Science, 258:818）のような技術を含む。

【0488】

G. TERTポリペプチドアッセイ

1) 一般

本発明は、hTERTポリペプチドを検出し、そして定量する方法および試薬を提供する。これらの方法は、電気泳動、質量分析、ゲルシフト、キャピラリー電気泳動のような分析生化学的方法、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高拡散クロマトグラフィー等のようなクロマトグラフィー方法、あるいは流体またはゲル沈降素反応、免疫拡散（一重または二重）、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロッティングのような質量分析などの免疫学的方法、および後記の、そして本開示を考慮して当業者に明らかな他のものを含む。

【0489】

2) 電気泳動アッセイ

1つの実施態様において、hTERTポリペプチドは電気泳動タンパク質分離で検出される；1つの局面において、二次元電気泳動系が使用される。電気泳動技術を用いるタンパク質の検出手段は当業者に周知である（一般に、R. Scopes (1982) PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990) METHODS IN ENZYMOLOGY 第182巻: GUIDE TO PROTEIN PURIFICATION, Academic Press, Inc. N.Y.）。

【0490】

関連する実施態様において、移動度シフトアッセイ（例えば、Ausubelら、前掲参照）を使用する。例えば、標識hTERTは、hTERTと会合し、非変性ポリアクリルアミドゲル等での電気泳動に際して変化した移動度で移動する。従って、例えば、もし（必要に応じて標識された）hTERTプローブまたは（必要に応じて標識された）テロメラーゼプライマーを、hTERTを含有する試料と混合するか、あるいは（例えば、無細胞発現系において）hTERTと共に共発現させれば、試料中のhTERTタンパク質（またはhTERTをコードするポリヌクレオチド）の存在は、hTERT移動度の検出可能な変化をもたらす。

【0491】

3) イムノアッセイ

a) 一般

本発明はまた、本発明の1種以上の抗体試薬を使用するhTERTポリペプチドの検出のための方法を提供する（すなわち、イムノアッセイ）。本明細書中で使用されるように、イムノアッセイは、hTERTポリペプチドまたはエピトープと特異的に結合する抗体（本明細書では広く定義されるように、そして特に、フラグメント、キメラおよび他の結合剤を含む）を利用するアッセイである。本発明の抗体は、例えば、前記したように、当業者に周知の種々の手段によって作成できる。

【0492】

10

20

30

40

50

本発明の実施に適した多数の十分に確立された免疫学的結合アッセイ形式が公知である（例えば、米国特許第4,366,241号；同第4,376,110号；同第4,517,288号；および同第4,837,168号参照）。例えば、METHODS IN CELL BIOLOGY 第37巻：ANTIBODIES IN CELL BIOLOGY, Asai編, Academic Press, Inc. New York (1993)；BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY 第7版, Stites & Terr編, (1991)；HarlowおよびLane, 前掲[例えば、第14章]、およびAusubelら, 前掲[例えば、第11章]（そのそれぞれは、参考として、その全体および全目的で援用される）参照。典型的には、免疫学的結合アッセイ（またはイムノアッセイ）は、分析物に特異的に結合し、そしてしばしばこれを固定化する「捕獲剤」を利用する。1つの実施態様において、捕獲剤は、抗hTRT抗体のような、hTRTポリペプチドまたはサブ配列に特異的に結合する部分である。別の実施態様において、捕獲剤は、hTRT会合分子が（もしhTRT会合分子が固定化されれば、hTRTタンパク質が同様に固定化されるように）hTRTに結合されたままとなる条件下でhTRT会合タンパク質またはRNAに結合することができる。hTRT会合分子が捕獲されるアッセイにおいては、例えば、抗hTRT抗体等を用い、会合するhTRTタンパク質が通常存在し、従って、出でることが理解される。タンパク質複合体を検出するイムノアッセイは当該分野で公知である（例えば、HarlowおよびLane（583頁）前掲参照）。

【0493】

通常、アッセイされるhTRT遺伝子産物は、検出可能な標識を用いて直接的または間接的に検出される。アッセイで使用する個々の標識または検出可能な基は、アッセイで使用する抗体の特異的な結合を有意に妨害しない限り、通常、本発明の重要な局面ではない。標識は、捕獲剤（例えば、抗TRT抗体）に共有結合により結合させることができるか、あるいは別の抗体のような第3の部分に結合させることができる。それは、例えば以下のものに特異的に結合する：（捕獲剤によって認識される異なるエピトープにおいて）hTRTポリペプチド、捕獲剤（例えば、抗（第1の抗体）免疫グロブリン；抗TRT抗体；抗TRT抗体に結合する抗体；または（例えば、テロメラーゼ関連タンパク質のような関連分子への結合を介する）抗体/テロメラーゼ複合体。プロテインAまたはプロテインGのような、アッセイで使用する抗体を結合し得る他のタンパク質をまた、標識してもよい。いくつかの実施態様において、2つ以上の標識分子（すなわち、相互に区別できるもの）を使用することは有用である。さらに、捕獲剤（例えば、抗hTRT抗体）によって結合した（例えば、固定化された）標的が、複合体（すなわち、hTRTとTRT会合タンパク質、hTR、または他のTRT会合分子との複合体）である場合、タンパク質またはhTRTタンパク質と会合したRNAを認識する標識抗体が使用できる。複合体がタンパク質-核酸複合体（例えば、TRT-hTR）である場合、レポーター分子は、この複合体のRNA成分を認識するポリヌクレオチドまたは他の分子（例えば、酵素）であり得る。

【0494】

特定のイムノアッセイ形式は、標識成分の使用を要しない。例えば、凝集アッセイを用いて、標的抗体の存在を検出することができる。この場合、標的抗体を含む試料によって抗原でコートされた粒子は凝集する。この形式において、この成分は標識されている必要はなく、標的抗体の存在は単純な視覚的観察によって検出できる。

【0495】

b) 非競合的アッセイ形式

本発明は、hTRTポリペプチドを検出する競合的および非競合的イムノアッセイのための方法および試薬を提供する。非競合的イムノアッセイは、捕獲された分析物（この場合、hTRT）の量が直接的に測定されるアッセイである。1つのこのようなアッセイは、hTRTタンパク質上の2つの非干渉性エピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を利用する2部位モノクローナルに基づくイムノアッセイである。背景情報については、例えば、Maddoxら, 1983, J. Exp. Med., 158:1211参照。1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイにおいて、捕獲剤（例えば、抗TRT抗体）を固定化される固体基板に直接的に結合させる。次いで、これらの固定化抗体は、試験試料中に存在する任意のhTRTタンパク質を捕獲する。次いで、このように固定化されたhTRTは、すなわち標識を有する第2の抗hTRT抗体に結

10

20

30

40

50

合させることによって標識することができる。あるいは、第2の抗hTRT抗体は、標識を欠くものであってもよいが、第2の抗体が由来する種の抗体に対して特異的な標識された第3の抗体によって結合されてもよい。あるいは、酵素標識のストレプトアビジンのような、第3の標識分子が特異的に結合できるビオチンのような検出可能部分で、第2の抗体を修飾することができる。

【0496】

c) 競合アッセイ形式

競合アッセイにおいて、試料中に存在するhTRTタンパク質の量は、試料中に存在するhTRTタンパク質によって捕獲剤（例えば、抗TRT抗体）から置き換えられた（または、競合し
てはずされた）添加された（外因性）hTRTの量を測定することによって間接的に測定され
る。1つの競合アッセイにおいて、既知量の標識hTRTタンパク質を試料に添加し、次いで
、試料を捕獲剤（例えば、hTRTタンパク質を特異的に結合する抗体）と接触させる。抗体
に結合した外因性（標識）hTRTタンパク質の量は、試料中存在するhTRTタンパク質の濃度
に反比例する。1つの実施態様において、抗体を固体基質に固定化する。抗体に結合した
hTRTタンパク質の量は、TRT/抗体複合体中に存在するhTRTタンパク質の量を測定するこ
と、あるいは残存する非複合体化TRTタンパク質の量を測定することのいずれかによって
決定され得る。hTRTタンパク質の量は、標識されたhTRT分子を提供することによって検出
され得る。

【0497】

ハプテン阻害アッセイは、競合アッセイの別の1例である。このアッセイでは、hTRTタン
パク質を固体基質に固定化する。既知量の抗TRT抗体を試料に添加し、次いで、試料を固
定化したhTRTタンパク質と接触させる。この場合、固定化したhTRTタンパク質に結合した
抗TRT抗体の量は、試料中に存在するhTRTタンパク質の量に反比例する。固定化抗体の量
は、抗体の固定化画分または溶液中に残存する抗体の画分のいずれかを検出することによ
って検出され得る。この局面において、検出は、抗体が標識される場合は、直接的であり
得、または上記のように抗体に特異的に結合する分子に標識を結合させる場合は間接的で
あり得る。

【0498】

d) 他のアッセイ形式

本発明はまた、イムノブロット（ウェスタンブロット）形式を使用することによって、試
料中のhTRTの存在を検出および定量するための試薬および方法を提供する。この形式にお
いては、試料中のhTRTポリペプチドを（例えば、分子量に基づいて）ゲル電気泳動によっ
て他の試料成分から分離し、分離されたタンパク質を適切な固体支持体（例えば、ニトロ
セルロースフィルター、ナイロンフィルター、誘導体化ナイロンフィルターなど）に移し
、そして支持体を本発明の抗TRT抗体と共にインキュベートする。抗TRT抗体は、固体支持
体上のhTRTまたは他のTRTに特異的に結合する。これらの抗体は、直接標識され得るか、
あるいはその後標識された抗体（例えば、標識されたヒツジ抗マウス抗体）または抗TRT
抗体に特異的に結合する他の標識試薬を用いて検出され得る。

【0499】

他のアッセイ形式は、リポソームイムノアッセイ（LIA）を含み、これは特定の分子（例
えば、抗体）に結合し、そしてカプセルに包まれた試薬またはマーカーを放出するように
設計されたリポソームを使用する。次いで、放出された化学物質を、標準的な技術に従っ
て検出し得る（Monroeら，1986，Amer. Clin. Prod. Rev. 5:34参照）。

【0500】

前記したように、FACS（および同等の機器または方法）を用いるアッセイ形式は、不均一
な試料（例えば、正常細胞および悪性細胞の両方を含有するバイオプシー試料）中のhTRT
遺伝子産物を測定する場合に利点を有する。

【0501】

e) 基質、固体支持体、メンブレン、フィルター

前記したように、アッセイに応じて、抗原、標的抗体、または抗hTRT抗体を含む様々な成

10

20

30

40

50

分を、固体表面または支持体（すなわち、基質、メンブレン、または濾紙）に結合させ得る。種々の固体表面に生体分子を固定化する多くの方法は、当該分野で公知である。例えば、固体表面は、メンブレン（例えば、ニトロセルロース）、マイクロタイターディッシュ（例えば、PVC、ポリプロピレン、またはポリスチレン）、試験管（ガラスまたはプラスチック）、計量棒（例えば、ガラス、PVC、ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックスなど）、微量遠心分離管、またはガラスもしくはプラスチックのビーズであり得る。所望の成分を、非特異的結合を介して共有結合または非共有結合させることができる。

【0502】

広範囲な種々の有機ポリマーおよび無機ポリマー（天然および合成の両方）を、固体表面のための材料として使用し得る。例示的なポリマーは、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、レーヨン、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)、シリコーン、ポリホルムアルデヒド、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロースなどを含む。使用され得る他の材料は、紙、ガラス、セラミックス、金属、メタロイド、半導体材料、セメントなどを含む。さらに、タンパク質（例えば、ゼラチン）、リポ多糖、シリケート、アガロース、およびポリアクリルアミドのようなゲルを形成する物質を使用し得る。デキストラン、ポリアルキレングリコールのようないくかの水相を形成するポリマー、またはリン脂質、長鎖（12~24個の炭素原子）アルキルアンモニウム塩などのような界面活性剤も適切である。固体表面が多孔質である場合、システムの性質に応じて種々の孔サイズを使用し得る。

【0503】

表面の調製において、複数の異なる材料を、特にラミネートとして使用して、種々の特性を得ることが可能である。例えば、ゼラチンのようなタンパク質コーティングを用いて、非特異的結合の回避、共有結合の単純化、シグナル検出の増強などを行い得る。

【0504】

化合物と表面との間の共有結合が所望される場合、表面は、通常、多官能性であるか、または多官能性化され得る。表面に存在し、そして、結合に使用され得る官能基は、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基などを含み得る。広範囲の種々の化合物を種々の表面に結合させる方法は周知であり、そして文献に十分に説明される。例えば、Immobilized Enzymes, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York, 1978およびCuatrecasas (1970), J. Biol. Chem. 245 3039参照。

【0505】

共有結合に加えて、アッセイ成分を非共有結合させる種々の方法を使用し得る。非共有結合は、典型的には表面への化合物の非特異的吸着である。

【0506】

当業者は、イムノアッセイにおいて非特異的結合を低下させるのがしばしば望ましいことを認識する。特に、アッセイが固体基質上に固定化された抗原または抗体を含む場合、基質への非特異的結合の量を最小化するのが望ましい。このような非特異的結合を低下させる手段は、当業者に周知である。典型的には、これは、タンパク質組成物で基質をコーティングすることを含む。特に、ウシ血清アルブミン(BSA)、脱脂粉乳、およびゼラチンのようなタンパク質組成物が広く使用され、粉乳が時々好ましい。あるいは、表面を、それが1つの成分に非特異的に結合するが、別の成分には有意に結合しないように設計する。例えば、コンカナバリンAのようなレクチンを有する表面は、炭水化物含有化合物を結合するが、グリコシル化を欠く標識タンパク質には結合しない。アッセイ成分の非共有結合に用いられる種々の固体表面は、米国特許第4,447,576号および同第4,254,082号に概説される。

【0507】

H) 抗TRT抗体についてのアッセイ

本発明はまた、hTRT特異的免疫グロブリンを検出するための試薬およびアッセイを提供する。1つの実施態様において、固定化hTRT（例えば、マイクロアッセイプレートウェルに

10

20

30

40

50

結合した組換えhTERT)を、抗hTERT抗体が存在する場合、固定化hTERTを結合する条件下で患者からの血清と共にインキュベートする。洗浄して非特異的に結合した免疫グロブリンを除去した後、結合した血清抗体を、もしこれらが存在する場合、検出可能に標識された抗(ヒトIg)抗体を添加することによって検出し得る(別の実施態様および変形は当業者に周知である;例えば、Harlow、前出、第14章参照)。これらのアッセイは、動物もしくはヒトの血清または生理食塩水のようなキャリアを含むいずれかの供給源中の抗hTERT抗体を検出するのに有用である。1つの実施態様において、アッセイを用いて、患者におけるhTERTタンパク質に対する免疫応答、特に自己免疫(例えば、抗テロメラーゼ)応答を検出またはモニターする。抗hTERT抗体は、自己免疫疾患または他の病的状態を罹る患者からの血清または他の組織または液体中に存在し得る。

10

【0508】

I) アッセイの組合せ

本明細書に記載される診断アッセイおよび予後アッセイは、種々の組み合わせで実施し得、そしてまた他の診断試験または予後試験と組み合わせで実施し得る。例えば、本方法を使用して患者の試料中に存在するガン細胞の存在を検出する場合、hTERTの存在を用いて、疾患の段階、特定の腫瘍が隣接する組織を侵襲しそうか、または遠くの位置に転移しそうか、およびガンの再発がありそうかを決定し得る。さらなる情報を提供し得る試験は、バイオプシー試料の顕微鏡分析、腫瘍形成性に関連する抗原(例えば、細胞表面マーカー)の検出(例えば、組織細胞化学、FACSなどを用いて)、画像化方法(例えば、患者への標識した抗腫瘍抗体の投与に際して)、テロメラーゼ活性アッセイ、テロメア長アッセイ、hTRアッセイなどを含む。このような組合せ試験は、疾患の進行に関する有用な情報を提供し得る。

20

【0509】

アッセイの組合せが有用な情報を提供し得ることもまた認識される。例えば、前記したように、hTERT mRNAについてのアッセイをhTR(ヒトテロメラーゼRNA)についてのアッセイまたはテロメラーゼ活性(すなわち、TRAP)アッセイと組み合わせ、テロメラーゼのアセンブリーおよび機能についての情報を提供し得る。

【0510】

J) キット

本発明はまた、テロメラーゼに関連する病的状態を有する患者のスクリーニング、モニタリング、診断、および予後に、または細胞または細胞株におけるhTERTの発現レベルの決定に有用なキットを提供する。キットは、hTERT遺伝子産物(RNAまたはタンパク質)の存在または非存在を測定するため、またはhTERT遺伝子の発現を定量するための1つ以上の試薬を含む。好ましい試薬は、hTERTの遺伝子、RNA、cDNA、またはその部分に特異的に結合する核酸プライマーおよびプローブに加えて、タンパク質、ペプチド、抗体、ならびにコントロールのプライマー、プローブ、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチドおよび抗体を含む。酵素(例えば、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、リガーゼ)、緩衝液、試薬(標識、dNTP)を含む他の材料を含み得る。

30

【0511】

あるいは、キットは、本明細書に記載されるいずれかの他の成分、hTERTポリペプチドまたはそのサブ配列に特異的に結合する抗体を含み得るか、またはそれらと組み合わせ得る。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗体を、標識のような別の部分に結合させ得るか、および/またはそれを固体支持体(基質)上に固定化し得る。キット(単数または複数)はまた、hTERTポリペプチド/抗体複合体の検出のため、またはハイブリダイズした核酸プローブ、ならびにコントロールまたは他の試薬として使用する1つ以上のhTERTペプチドまたはhTERTタンパク質の検出のための第2の抗体を含み得る。

40

【0512】

抗体またはハイブリダイゼーションプローブは、遊離であるか、または試験管、マイクロタイタープレート、計量棒などのような固体支持体に固定化され得る。キットはまた、TRTの検出のためのアッセイにおける、抗体またはハイブリダイゼーションプローブの使用

50

を教示する説明教材を含み得る。キットは、標識の検出のため、または陽性コントロールおよび陰性コントロールを標識するための適切な試薬、洗浄溶液、希釈緩衝液などを含み得る。

【0513】

1つの実施態様において、キットは、hTERT mRNAを増幅するためのプライマー対を含む。このようなキットはまた、hTERTの増幅されたDNAについてのプローブ、および/またはポリメラーゼ、緩衝液、dNTPなどを含み得る。別の実施態様において、キットは、プローブ、任意に、標識されたプローブを含む。別の実施態様において、キットは抗体を含む。

【0514】

X. テロメラーゼ活性のモジュレーターの同定

10

A. 概説

本発明は、テロメラーゼまたはテロメラーゼ成分（例えば、hTERTタンパク質）の活性または発現を調節する化合物および処理を提供する。本発明はまた、テロメラーゼの活性または発現を調節する化合物および処理を同定するためのアッセイおよびスクリーニング方法（高処理量スクリーニングを含む）を提供する。テロメラーゼの活性および発現のこれらのモジュレーター（本明細書では以後、「モジュレーター」という）は、テロメラーゼアゴニスト（これはテロメラーゼの活性および/または発現を増加させる）およびテロメラーゼアンタゴニスト（これはテロメラーゼの活性および/または発現を減少させる）を含む。

【0515】

20

本発明のモジュレーターは、広範囲の種々の用途を有する。例えば、テロメラーゼモジュレーターはヒトの疾患の処置のための有効な処置用薬剤であることが意図される。アゴニスト活性および転写もしくは翻訳のアクチベーターについてのスクリーニングは、細胞内のテロメラーゼ活性（テロメア依存性複製能、または「部分的」テロメラーゼ活性を含む）を増加させる組成物を提供する。このようなアゴニスト組成物は、有用なタンパク質を発現し得る細胞を含む、他の点では正常な非形質転換細胞を不死化させる方法を提供する。このようなアゴニストはまた、細胞老化を制御する方法を提供し得る。逆に、アンタゴニスト活性についてのスクリーニングは、テロメア依存性複製能を低下させ、それにより、ガン細胞のように、そうでなければ不死の細胞を有寿命にする(mortalizing)組成物を提供する。アンタゴニスト活性についてのスクリーニングは、テロメラーゼ活性を低下させ、それにより、ガン細胞のような調節されない細胞増殖を示す細胞の無制限な細胞分裂を防ぐ組成物を提供する。モジュレーターを用いて処置され得る例示的な疾患および病的状態は、本明細書において、例えば、第VII節および第IX節（前出）に列記される。一般に、本発明のモジュレーターは、細胞または生物においてテロメラーゼ活性を増加または減少させるのが所望される場合は常に使用され得る。従って、疾患の処置での使用に加えて、hTERTの発現レベルを増大させるモジュレーターを用いて、一般的には第VIII節（前出）に記載される特性を有する培養ヒト細胞株を作製し得、そして当業者に明らかである種々の他の用途に使用され得る。

30

【0516】

化合物または処置は、化合物の投与または処置がテロメラーゼ成分をコードする遺伝子（例えば、hTERT mRNAをコードする遺伝子）の転写の速度またはレベルを変化させるか、テロメラーゼ成分をコードするRNAの安定性または転写後プロセッシング（例えば、輸送、スプライシング、ポリアデニル化、または他の修飾）に影響を与えるか、コードされるタンパク質（例えば、hTERT）の翻訳、安定性、翻訳後プロセッシング、または修飾に影響を与えるか、あるいはさもなければ機能的（例えば、触媒的に活性な）テロメラーゼRNPのレベルを変化させる場合に、テロメラーゼまたはテロメラーゼ成分の「発現」を調節する。化合物または処置は化合物の投与または処置が、第IV(B)章（前出）に記載されたいずれかの活性（例えば、進行的または非進行的なテロメラーゼ活性；テロメラーゼ進行性；従来の逆転写酵素活性；核酸分解活性；プライマーまたは基質結合活性；dNTP結合活性；RNA結合活性；テロメラーゼRNPアセンブリー；およびタンパク質結合活性を含む）のような

40

50

テロメラーゼ活性を変化させる場合、テロメラーゼ「活性」に影響を与える。「活性」における変化と「発現」における変化との間には必ずしもはっきりした記述ないこと、およびこれらの用語は限定のためではなく議論を容易にするために使用されることが認識される。本発明のモジュレーターが、例えば、標的細胞の非特異的毒殺によってテロメラーゼ成分の発現を低下させるよりもむしろ、テロメラーゼの活性または発現に特異的に（例えば、一般に、アクチンのようなハウスキーピングタンパク質の発現を変化させることなく）影響を与えるべきであることもまた認識される。

【0517】

B. テロメラーゼモジュレーターの同定のためのアッセイ

本発明は、テロメラーゼまたはテロメラーゼ成分の発現に影響を与えることができるか、
テロメラーゼのDNA複製能を改変し得るか、あるいはさもなければテロメラーゼ酵素およびTRTタンパク質がテロメリックDNAを合成する能力（「全活性」）を改変する組成物または化合物をスクリーニングするための方法および試薬を提供する。本発明はまた、hTRTの「部分的活性」のいずれかまたは全てのモジュレーターについてのスクリーニングを提供する。従って、本発明は、例えば、通常はhTRTタンパク質またはテロメラーゼが発現されない細胞においてそれを発現させることによって、またはテロメラーゼ陽性細胞においてテロメラーゼの活性レベルを増加させることによって、テロメラーゼの活性を増加させる薬剤をスクリーニングするのに使用され得るアッセイを提供する。

【0518】

テロメラーゼまたはテロメラーゼサブユニットタンパク質またはそれらの触媒的または免疫原性のフラグメントまたはそのオリゴペプチドを、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて処置的化合物をスクリーニングするのに使用し得る。このような試験で使用されるフラグメントは、溶液中で遊離であるか、固体支持体に付着しているか、細胞表面に生じるか、または細胞内に位置し得る。テロメラーゼまたはサブユニットタンパク質と試験される薬剤との間の結合複合体の形成は測定され得る。

【0519】

種々の実施態様において、本発明は、酵素の活性部位に結合するか；そのRNA部位、テロメラーゼ会合タンパク質、ヌクレオチド、またはテロメリックDNAのテロメラーゼまたはhTRTタンパク質への会合を阻害するか；酵素複合体の解離を促進するか；テロメラーゼRNA部位（例えば、hTR）の転写を妨げるか；または本明細書に記載される「部分活性」のいずれかを阻害するアンタゴニストをスクリーニングする方法を含む。本発明は、hTRとhTRTとの会合またはhTRTとp80もしくはp95のヒトホモログまたは別の関連タンパク質との会合、またはhTRTとテロメラーゼもしくはヌクレオチドとの会合のような、核酸および/またはテロメラーゼ関連組成物とhTRTとの会合を阻害する組成物についてスクリーニングする方法；hTRまたはhTRTに対する抗体のような、酵素複合体の解離を促進するか、またはその会合（すなわち、アセンブリー）を促進する組成物についてスクリーニングする方法；酵素の進行的に影響を与える薬剤についてスクリーニングする方法；およびhTRに相補的な核酸のような、テロメラーゼに結合する、核酸および他の組成物についてスクリーニングする方法を提供する。本発明は、さらに、hTRT遺伝子の転写および/またはhTRT遺伝子産物の翻訳を増加または減少させる組成物についてのスクリーニングを意図する。本発明はまた、1つの実施態様において、トランスジェニック動物のような動物において、テロメラーゼ活性または抗テロメラーゼ活性を再構成することによって、動物におけるテロメラーゼモジュレーターをスクリーニングする方法を意図する。本発明は、「ロックアウト」モデルを含むインビボアッセイシステムを提供し、ここで、1または数単位の内因性テロメラーゼ、テロメラーゼRNA部位、および/またはテロメラーゼ会合タンパク質が欠失または阻害される。内因性テロメラーゼ活性（完全または部分的）が残存または欠損し得る。1つの実施態様において、外因性テロメラーゼ活性（完全活性または部分的）を再構成する。

【0520】

本発明の1つの実施態様において、テロメラーゼ活性の種々の異なるクラスのモジュレー

10

20

30

40

50

ターを同定するための、種々の部分的活性テロメラーゼアッセイが提供される。本発明の「部分的活性」アッセイは、「全活性」テロメラーゼアッセイで検出されないかも知れないクラスのテロメラーゼ活性モジュレーターの同定を可能とする。1つの部分的活性アッセイは、TRTおよびテロメラーゼの非進行的活性を含む。テロメラーゼの進行的性質は、Morin (1989) Cell 59:521-529に記載される; Prowse (1993) 「Identification of a non processive telomerase activity from mouse cells」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1493-1497も参照。本発明の別の部分的活性アッセイは、テロメラーゼの「逆転写酵素様」活性を利用する。これらのアッセイでは、hTRTタンパク質の逆転写酵素活性をアッセイする。Lingner (1997) 「Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase」 Science 276:561-567参照。本発明の別の部分的活性アッセイは、プライマーの3'鎖からの少なくとも1つのヌクレオチド、典型的にはグアノシンの酵素の除去を含む、hTRTおよびテロメラーゼの「核酸分解活性」を利用する。この核酸分解活性は、Collins (1993) 「Tetrahymena telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation」 Genes Dev 7:1364-1376による、テトラヒメナテロメラーゼにおいて観察されている。本発明の別の部分的活性アッセイは、この酵素的進行的DNA重合活性の一部としてヌクレオチドに結合する、hTRTおよびテロメラーゼの能力を分析することを含む。本発明の別の部分的活性アッセイは、テロメア合成のためのテンプレートとして使用される、そのRNA部位、すなわちヒト細胞についてのhTRに結合する、hTRTまたはテロメラーゼの能力を分析することを含む。本発明のさらなる部分的活性アッセイは、インビボで染色体に結合する、またはインビトロもしくは再構成システムにおいてオリゴヌクレチオドプライマーに結合する、あるいは染色体構造に関連するタンパク質(このようなタンパク質の例については、Harrington (1995) J Biol Chem 270: 8893-8901を参照)に結合する、hTRTおよびテロメラーゼの能力を分析することを含む。hTRTに結合する染色体構造は、例えば、テロメリック反復DNA、テロメアタンパク質、ヒストン、核マトリックスタンパク質、細胞分裂/細胞周期制御タンパク質などを含む。

【0521】

1つの実施態様において、モジュレーターの同定のためのアッセイは、1つ以上の細胞(すなわち、「試験細胞」)を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物が細胞においてテロメラーゼ(またはテロメラーゼ成分)の発現または活性に影響を与えるか否かを決定する工程を含む。通常、この決定は、試験化合物と接触させていない同様の細胞または複数の細胞(すなわち、コントロール細胞)に対して、試験細胞における活性または発現を比較する工程を含む。あるいは、細胞抽出物を、インタクトな細胞の代わりに使用し得る。関連する実施態様において、試験化合物を多細胞生物(例えば、植物または動物)に投与する。テロメラーゼまたはテロメラーゼ成分は、細胞または多細胞生物にとって全く内因性であり得るか(すなわち、天然に生じる内因性遺伝子によってコードされる)、または1種以上の組換えにより発現されるテロメラーゼ成分(例えば、hTRT、hTR、テロメラーゼ会合タンパク質)を含む組換え細胞またはトランスジェニック生物であり得るか、または内因性成分および組換え成分の両方を有し得る。従って、1つの実施態様において、テロメラーゼ活性モジュレーターを有寿命細胞に投与する。別の実施形態において、テロメラーゼ活性モジュレーターを不死化細胞に投与する。例えば、推定の阻害性組成物を、ガン細胞のような顕著な量のテロメラーゼ活性を示すことが知られる細胞に投与し、そしてテロメラーゼ活性、テロメア長、または増殖能力の減少(これらの全てがアンタゴニスト活性を有する化合物の指標である)が観察されるか否かを測定することによって、テロメラーゼ媒介DNA複製のアンタゴニストを同定し得る。

【0522】

別の実施態様において、TRT(例えば、hTRT)およびテンプレートRNA(例えば、hTR)を含むリボ核タンパク質複合体(RNP)のテロメラーゼ活性の変化をモニターすることによってモジュレーターが同定され、(例えば、実施例7、後出に記載されているように)そのRNPはインビトロで再構築される。

【0523】

10

20

30

40

50

さらに別の実施態様において、細胞、動物、インビトロ発現系、または他の発現系において、TRT遺伝子産物（例えば、RNAまたはタンパク質）の発現の変化をモニターすることによってモジュレーターが同定される。

【0524】

さらに別の実施態様において、プロモーターまたはエンハンサーのような天然に存在するTRT調節要素によって全体的にまたは部分的にその発現が調節される、実施例15に記載のような、レポーター遺伝子の発現を変化させることによってモジュレーターが同定される。関連する実施態様において、テロメラーゼ成分（例えば、hTRT）、RNA、または遺伝子調節配列（例えば、TRT遺伝子プロモーター）に結合する試験化合物の能力をアッセイする。

10

【0525】

別の実施態様において、hTRTブレ mRNA プロセッシング、例えば、オルタナティブスプライシングされた産物、オルタナティブポリ - アデニル化事象、RNA切断などの変化を観察することによってモジュレーターが同定される。関連する実施態様において、変異型hTRTポリペプチド（そのうちのいくつかは、優性的に陰性のテロメラーゼ調節活性を有し得る）の産生をモニターすることによってモジュレーターの活性を観察することができる。

【0526】

タンパク質の発現および活性に影響する化合物の同定のためのアッセイ様式は、バイオテクノロジーおよび医薬産業において周知であり、多数のさらなるアッセイおよび後記にて提供する例示的アッセイの変形が当業者に明らかである。

20

【0527】

テロメラーゼの活性または発現の変化は、任意の適切な方法によって測定され得る。テロメラーゼ成分（例えば、hTRTタンパク質）または前駆体（例えば、hTRT mRNA）の発現のレベルの変化は、当業者に周知の方法を用いてアッセイされ得る。そのうちのいくつかは例えば第IX節にて前記され、（例えば、本発明のTRTプローブおよびプライマーを用いる）ハイブリダイゼーション、（例えば、本発明の抗TRT抗体を用いる）イムノアッセイ、RNase保護アッセイ、増幅アッセイ、または本明細書中に記載のもしくは当該分野で公知の任意の他の適切な検出手段によってTRT遺伝子産物（例えば、タンパク質およびRNA）のレベルをモニターすることを含む。試料中の核酸の量を定量すること（例えば、RNA、例えば、hTRまたはhTRT mRNAのレベルの評価）もまた、シス - またはトランス - 転写レギュレーターを評価するにおいて有用である。

30

【0528】

同様に、テロメラーゼ活性の変化は、本明細書中に記載の方法（例えば、第（IV(B)節、前出）またはテロメラーゼ機能の他のアッセイのような方法を用いて測定され得る。望まれる場合、テロメラーゼ活性の定量は、本明細書中に記載した方法を含む任意の方法によって行い得る。テロメリック構造の喪失を引き起しまたは促進し得るテロメラーゼアンタゴニストは、インビボ、エクスピボまたはインビトロでテロメラーゼ活性に対するそれらの効果をモニターおよび測定することによって、または（染色、タグ化したハイブリダイゼーションプローブまたは他の手段の使用によって測定されたまたは検出された）テロメア長に対するそれらの効果によって、あるいはテロメラーゼ陽性ガン細胞の細胞分裂の阻害によって（テロメアの臨界的短鎖化は「危機」またはM2老化と呼ばれる現象に至る（Shay, 1991, Biochem. Biophys. Acta 1072:1-7）同定され得、それは、ガン細胞はテロメラーゼの活性化によって迂回するが、テロメラーゼの不存在下では、染色体の欠失および再配置を介するそれらの老化または死滅に至る。ヒトテロメラーゼ活性のインビボでの再構築は、任意の供給源からの細胞または動物においてテロメラーゼモジュレーターのためのスクリーニング方法を提供する。このようなアゴニストは、テロメア長の変化の測定を含む、本発明の活性アッセイで同定され得る。細胞においてテロメラーゼ活性を測定するアッセイの他の例は、テロメア構造の蓄積または喪失のためのアッセイ、TRAPアッセイまたは定量的ポリメラーゼ連鎖反応アッセイを含む。

40

【0529】

50

1つの実施態様において、本発明のアッセイはまた、試験化合物を欠く平行反応において組み込まれた標識の相対量と比較して、標識ヌクレオチドの基質への組込みによって測定して、hTRTの活性の統計学的に有意な減少を試験化合物が生じ、それにより、試験化合物がテロメラーゼインヒビターであると判断される方法を含む。

【0530】

また、本発明の方法は、科学および特許文献に記載され、そして当該分野で公知のプロトコルの改作に従う。例えば、本発明のテロメラーゼまたはTRTタンパク質を用いて、テロメラーゼ活性のモジュレーターとして作用する組成物を同定する場合、非常に多数の潜在的に有用な分子を単一の試験でスクリーニングすることができる。モジュレーターは、テロメラーゼ活性に対して阻害性（アンタゴニスト）または増強性（アゴニスト）効果を有し得る。例えば、もし1000のインヒビターのパネルをスクリーニングすべきであれば、全ての1000のインヒビターを潜在的に1つのマイクロタイターウェルに入れ、同時に試験することができる。もしこのようなインヒビターが見つければ、1000のプールを100の10プールに分け、個々のインヒビターが同定されるまでプロセスを反復することができる。

10

【0531】

薬物スクリーニングにおいて、多数の化合物をテロメラーゼモジュレーターとして作用するそれらの能力について調べる（高処理能力スクリーニングの技術によって多いに加速されるプロセス）。本明細書に記載のテロメラーゼ活性についてのアッセイ（全てまたは部分）を、高処理能力技術で使用するのに適合させることができる。この目的を達成するために多数の方法が存在することは当業者には明らかである。

20

【0532】

テロメラーゼまたはテロメラーゼタンパク質サブユニットに対して適切な結合親和性を有する化合物の高処理能力スクリーニングに適用し得る薬物スクリーニングについての別の技術は、Geysenによる「Determination of Amino Acid Sequence Antigenicity」（本明細書中で参考として援用される、Geysen, 1984年9月13日に公開されたWO国際公開84/03564）に詳細に記載されている。要約すると、非常に多数の異なる小ペプチド試験化合物を、プラスチックピンまたはいくつかの他の表面のような固体基板上で合成する。ペプチド試験化合物をテロメラーゼのフラグメントまたはテロメラーゼタンパク質サブユニットと反応させ、そして洗浄する。次いで、結合したテロメラーゼまたはテロメラーゼタンパク質サブユニットを、当該分野で周知の方法によって検出する。実質的に精製したテロメラーゼまたはテロメラーゼタンパク質サブユニットはまた、前記薬物スクリーニング技術で使用するプレート上に直接被覆され得る。あるいは、非中和抗体を用いてペプチドを捕獲し、固体支持体に固定化し得る。

30

【0533】

本発明はまた、テロメラーゼまたはサブユニットタンパク質に結合し得る中和抗体を、テロメラーゼまたはサブユニットタンパク質への結合のために試験化合物と特異的に競合させる競合的薬物スクリーニングアッセイの使用を意図する。また、抗体を用いて、テロメラーゼまたはサブユニットタンパク質で1つ以上の抗原決定基を共有する任意のペプチドの存在も検出し得る。

【0534】

テロメラーゼ活性のモジュレーターを同定するさらなる方法は、米国特許第5,645,986号に記載されており、これは、本明細書中で参考として援用される。本発明は、hTRTポリヌクレオチド、プローブおよびプライマー、高度に精製されたhTR、hTRTおよびテロメラーゼ、ならびに抗テロメラーゼおよび抗TRT抗体のような試薬（その全てを、アッセイ、例えば、コントロール、標準、結合剤またはハイブリダイゼーション剤などとして使用し得る）を供することによって部分的に、以前に知られた方法の改良を提供することが認識される。

40

【0535】

本発明の組換えにより産生されたテロメラーゼおよびTRT（例えば、hTRT）はモジュレーターの同定のためのアッセイで有用であると認識される。このスクリーニングアッセイは

50

、テロメラーゼ活性の全体的もしくは部分的再構成によって、または存在する活性の増加によって得られたテロメラーゼまたはhTRTを利用し得る。上記のように、一般に、本発明によって提供されるアッセイおよびスクリーニングを用いて、テロメラーゼのテロメリックDNAを合成する能力を試験し得るか、またはhTRTおよびTRTのいくつかまたはすべての「部分的活性」を試験し得る。このアッセイは、そのRNA部分または関連タンパク質と共にまたは無しでテロメラーゼを発現するように操作された細胞のエキスビポ改変を取り入れることができ、これらを動物に再移植し得、そしてインビポ試験で使用し得る。従って、本発明は、インビポアッセイおよびそこで有用なトランスジェニック動物を提供する。これらのインビポアッセイ系は、1または数単位の内因性テロメラーゼ酵素複合体が欠失または阻害されている「ノックアウト」細胞、ならびに外因性または内因性テロメラーゼ活性が再構成されまたは活性化されている細胞を使用し得る。

10

【0536】

（部位特異的変異によって）部位特異的様式で改変して、テロメラーゼ酵素またはTRTタンパク質のいずれかまたは全ての機能を改変または欠失させたテロメラーゼおよびTRTタンパク質もまた、治療用薬剤を発見するために本発明のスクリーニングで使用し得る。例えば、基質DNAに結合する、そのRNA部位（例えばhTR）に結合する、テロメリックDNAの付加を触媒する、デオキシヌクレオチド基質に結合する、核酸分解活性を有する、テロメア会合タンパク質または染色体構造に結合するなどのその能力を喪失するようにTRTを操作し得る。得られた「変異タンパク質」または「ムテイン（mutein）」を用いて、TRTタンパク質またはテロメラーゼの1つ、いくつかの、または全ての機能または活性を特異的に調節する化合物を同定し得る。

20

【0537】

C. 例示的テロメラーゼモジュレーター

1) 一般

前記にて言及した試験化合物は、ポリマー（例えば、オリゴペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチド）、小分子、抗体（本明細書では広く定義される）、糖、脂肪酸、ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログ、天然に存在する構造のアナログ（例えば、ペプチド模倣物、核酸アナログ等）、および多数の他の化合物を含む、広範な種々の化合物（天然および合成の両方、有機および無機の両方）であり得る。

【0538】

本発明は、任意の特定の作用メカニズムの制限なしで、全てのタイプのモジュレーターを提供する。例示目的で、モジュレーターの例は、以下の化合物または処置を含む：

30

（i）hTRTポリペプチド（例えば、酵素の活性部位）または他のテロメラーゼ成分に結合し、そしてテロメラーゼ活性に影響する；

（ii）テロメラーゼ成分（例えば、hTRTまたはhTRT-hTR RNP）の（例えば、前記第IV(D)節に記載したものを含む）テロメラーゼ会合タンパク質との会合を阻害もしくは促進し、またはそれからの解離を阻害もしくは促進する；

（iii）テロメラーゼポリペプチド（例えば、hTRT）の、テロメラーゼRNA（例えば、hTR）との会合を阻害もしくは促進し、またはそれらの解離を阻害もしくは促進する；

（iv）テロメラーゼポリペプチド（例えば、hTRT）の、染色体（例えば、テロメア）または染色体DNA（例えば、テロメリックDNA）との会合を阻害もしくは促進し、またはそれからの解離を阻害もしくは促進する；

40

（v）（例えば、hTRT遺伝子または別のテロメラーゼ成分の転写に影響する因子（例えば、転写調節タンパク質）と相互作用することによって）遺伝子または遺伝子産物に結合することによって、TRT遺伝子の転写、または遺伝子産物の翻訳、輸送または安定性の速度またはレベルを変化させることを包含する、テロメラーゼ成分遺伝子産物（例えば、hTRT遺伝子の産物）の発現を増加させまたは減少させる。

【0539】

2) ペプチドモジュレーター

テロメラーゼ活性の潜在的なモジュレーターはまた、ペプチド（例えば、阻害性ペプチド

50

モジュレーター（アンタゴニスト）およびアクチベーターペプチドモジュレーター（アゴニスト）も含む。例えば、ランダムに生じた配列を有するオリゴペプチドをスクリーニングして、テロメラーゼ活性のペプチドモジュレーター（アゴニストまたはインヒビター）を発見し得る。このようなペプチドを直接薬物として用いて、テロメラーゼ活性を阻害し得る官能基の配向または位置を見出し得、次いで、これは小分子インヒビターの設計または試験に導かれ、あるいは薬理学的利用性を増大させる化学修飾の基礎となる。ペプチドは構造的模倣物であり得、テロメラーゼ酵素およびhTRTタンパク質の特徴的二次構造および/または三次構造に基づいて模倣物を設計するための分子モデリングプログラムを用いることができる。このような構造的模倣物もまた、テロメラーゼ活性のモジュレーター（アゴニストおよびアンタゴニスト）としてインビボで治療的に用い得る。構造的模倣物はまた、抗テロメラーゼまたは抗TRTタンパク質抗体を若起するための免疫原として使用され得る。

10

【0540】

3) テロメラーゼ活性のモジュレーターとしての阻害性天然化合物

さらに、非常に多数の潜在的に有用な活性修飾化合物を、供給源物質として天然物質からの抽出物でスリーニングし得る。このような抽出物の供給源は、菌類、放線菌、藻類、昆虫、原生動物、植物および細菌の多数の種由来であり得る。次いで、阻害性活性を示すこれらの抽出物を分析して、活性分子を単離し得る。例えば、Turner (1996) J. Ethnopharmacol. 51 (1-3);39-43 ;Suh (1995) Anticancer Res. 15:233-239を参照のこと。

【0541】

20

4) 阻害性オリゴヌクレオチド

本発明によって提供される1つの特に有用な組のインヒビターは、機能的hTRTタンパク質の産生を妨げるかまたは阻害するいずれの場合にも、hTRTタンパク質をコードするmRNAまたはhTRT遺伝子のいずれかに結合し得るオリゴヌクレオチドを含む。本発明の他のオリゴヌクレオチドは、hTRのようなテロメラーゼのRNA部位と相互作用するか、あるいはテロメラーゼまたはhTRTのそのDNA標的への、または1つのテロメラーゼ成分の別の成分または基質への結合を妨げ得る。このようなオリゴヌクレオチドはまた、テロメラーゼ酵素、hTRTタンパク質、または双方のタンパク質およびRNAの両方に結合し得、そしてその進行的活性、その逆転写酵素活性、その核酸分解活性等のような上記の部分的活性を阻害する。会合は、別の核酸への配列特異的ハイブリダイゼーションによるか、またはアプタマーにおけるように一般的結合によるか、または両方により得る。

30

【0542】

テロメラーゼ活性は、hTRT mRNAに結合し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドでhTRT mRNAを標的化することによって阻害し得る。

【0543】

インヒビターの別の有用なクラスは、hTRT mRNAまたはhTRの不活化または切断を引き起こすオリゴヌクレオチドを含む。すなわち、オリゴヌクレオチドは、化学的に修飾されるか、あるいはリボザイム、EDTA結合オリゴヌクレオチド、またはプソラレンもしくはオリゴヌクレオチドに結合した他の架橋試薬のような共有結合オリゴヌクレオチドの場合のように、このような切断を生じる酵素活性を有する。上記のように、所望の活性を有するものについての多くの異なるこのようなオリゴヌクレオチドのプールをスクリーニングし得る。

40

【0544】

別の有用なクラスのインヒビターは、ポリペプチドに結合するオリゴヌクレオチドを含む。特異的なポリペプチド標的に結合する二本鎖または一本鎖のDNAあるいは二本鎖または一本鎖のRNA分子は、「アプタマー」と呼ばれる。特異的オリゴヌクレオチド-ポリペプチド会合は、静電的相互作用によって媒介され得る。例えば、アプタマーは、ポリアニオン性のヘパリンに生理学的に結合する、トロンビン上のアニオン結合性エクソサイトに特異的に結合する (Bock (1992) Nature 355:564-566)。hTRTタンパク質はhTRおよびそのDNA基質の両方に結合するので、そして本発明は大量の精製された形態のhTRTおよび他のTRTタンパク質を提供するので、当業者は本発明の方法を用い、TRT結合性アプタマーについ

50

て容易にスクリーニングし得る。

【0545】

テロメラーゼ、hTRT、hTR、またはその部分に結合するオリゴヌクレオチド（例えば、RNAオリゴヌクレオチド）は、SELEXの技術を用いて産生し得る（Tuerk, 1977, Methods Mol. Biol. 67, 2190）。この技術において、標的への結合に対して高親和性を有する分子および低親和性を有する分子の間の高程度の区別を引き起こす条件を用いて、ランダム配列核酸の非常に大きなプール（10⁶-10⁹）を標的（例えば、hTRT）に結合させる。結合した分子を非結合分子から分離し、そして末端に含まれる特異的核酸配列および適切な増幅試薬によって結合分子を増幅する。このプロセスを、標的に対して高親和性を有する比較的少数の分子が残るまで数回反復する。次いで、本明細書中に記載のように、これらの分子を

10

【0546】

テロメラーゼ媒介DNA複製のアンタゴニストはまた、リボザイムを介するように、相補的配列の認識または切断を介して、hTRの阻害（Norton (1996) Nature Biotechnology 14:615-619）に基づき得る。

【0547】

本発明の阻害性オリゴヌクレオチドは、当該分野で周知の種々の技術を用い、細胞に移入することができる。例えば、特異的修飾なしでオリゴヌクレオチドを細胞質に送達し得る。あるいは、それらは、細胞の表面膜タンパク質レセプターに付着し、その結果飲食される、細胞膜と融合するかまたは飲食されるリボソームの使用によって、すなわち、リボソームに付着した、またはオリゴヌクレオチドに直接付着したリガンドの使用により送達し得る。あるいは、細胞を透過性として、宿主細胞を傷つけることなく、オリゴヌクレオチドの細胞への輸送を増強し得る。オリゴヌクレオチドを細胞への輸送が公知の、DNA結合性タンパク質、例えばHBGF-1を使用できる。

20

【0548】

5) 阻害性リボザイム

標的RNAを切断するリボザイムの酵素部分に近くに保持されたりボザイムの標的RNA結合部分を介して標的RNAに結合することによって、リボザイムは作用する。従って、リボザイムは通常は相補的塩基対形成を介して標的RNAを認識しそれに結合し、そして一旦正しい部位に結合すれば、酵素的に作用して、標的RNAを切断し不活化させる。そのような様式における標的RNAの切断は、切断がコード配列内で起った場合、コードされたタンパク質の合成を指向するその能力を破壊する。リボザイムがそのRNA標的に結合しそれを切断した後、典型的には、それはRNAから遊離され、従って、新規の標的に反復して結合しそれを切断できる。

30

【0549】

6) モジュレーターとしての使用のためのテロメラーゼ会合タンパク質の同定本発明の1つの実施態様において、テロメラーゼを用いて、テロメラーゼ活性を調節するか、またはさもなければそれを補うテロメラーゼ会合タンパク質、すなわち、テロメラーゼアクセサリータンパク質を同定する。上記のように、これらのタンパク質またはそのフラグメントは、テロメラーゼ酵素複合体の解離を引き起こし、またはその会合を妨げることによって、テロメラーゼ複合体の構築を妨げることによって、hTRTがその核酸相補体にまたはそのDNAテンプレートに結合するのを妨げることによって、hTRTがヌクレオチドを結合することを妨げることによりまたは上記のテロメラーゼ酵素もしくはhTRTタンパク質の部分的活性のいずれか、またはいくつか、または全てを妨げ、増大させ、または阻害することによって機能を調節し得る。

40

【0550】

当業者は、本発明の方法を用いて、これらのテロメラーゼ会合タンパク質どの部分（例えば、ドメイン）がテロメラーゼに接触するのかを同定し得る。本発明の1つの実施態様において、これらのテロメラーゼ会合タンパク質またはそのフラグメントは、テロメラーゼ活性のモジュレーターとして使用される。

50

【 0 5 5 1 】

7) ドミナントネガティブ (dominant negative) 変異体としてのテロメラーゼ関連タンパク質

本発明の1つの実施態様において、テロメラーゼ会合タンパク質は、テロメラーゼ活性のモジュレーターとして使用される。テロメラーゼ活性タンパク質は、ヒストン、核マトリックスタンパク質、細胞分裂および細胞周期制御タンパク質等のような染色体構造を含む。本発明の目的のためにモジュレーターとして使用し得る他のテロメラーゼ会合タンパク質は、p80およびp95タンパク質ならびにTP1およびTRF-1のようなそれらのヒトホモログを含む (Chong, 1995, Science 270:1663-1667)。さらに、これらのテロメラーゼ会合タンパク質のフラグメントは、本発明の方法により当業者によって同定され得、そしてテロメラーゼ活性のモジュレーターとして使用し得る。

10

【 0 5 5 2 】

8) ドミナントネガティブ変異体

上記のように、8つの高度に保存されたモチーフが、異なる非ヒト種のTRTの間で同定されている (Lingner (1997) Science 276:561-567もまた、参照のこと)。図4は、*S. pombe* Trtlp, *Euplotes* p123および*S. cerevisiae* Est2pと比較して、(pGRN121からの)ヒトTRTアミノ酸配列およびRTモチーフの概略を示す。本発明は、これらのモチーフの8個全ての、それぞれにおける保存されたアミノ酸残基に対するコドンが、単独で、あるいは1以上のさらなるコドンと組み合わされて、他のコドンのそれぞれに変更された組換えおよび合成核酸を提供する。種々の得られたコード配列は非機能的hTRTを発現する。例えば、実施例16を参照のこと。従って、本発明は、例えば、テロメラーゼの部分的活性を有するが、全活性を有しない非常に広範囲の「変異した」テロメラーゼ酵素およびTRTタンパク質を提供する。例えば、1つのこのようなテロメラーゼはテロメリック構造に結合し得るが、テロメラーゼ会合RNA(すなわち、hTR)に結合し得ない。もし十分に高いレベルで発現されれば、このようなテロメラーゼ変異体は、必要なテロメラーゼ成分(例えば、hTR)を枯渇させ得、それにより、野生型テロメラーゼ活性のインヒビターとして機能する。このように作用する変異したテロメラーゼは、アンタゴニストまたはいわゆる「ドミナントネガティブ」変異体である。

20

【 0 5 5 3 】

9) 抗体

一般に、本発明の抗体を用いて、テロメラーゼ酵素およびhTRTタンパク質のいずれかのまたは全ての活性を同定し、精製し、または阻害することができる。抗体は、種々の方法、例えば、テロメラーゼ複合体またはヌクレオチドがそのDNA基質に結合するのを妨げることによって、テロメラーゼの成分が活性複合体を形成するのを妨げることによって、機能的(テロメラーゼ複合体)4次構造を維持することによって、または活性に対してアロステリック効果を有する酵素の活性部位または他の部位の1つに結合することによって、テロメラーゼ活性のアンタゴニストとして作用できる(テロメラーゼの異なる部分的活性は本明細書の他の箇所に詳細に記載されている)。

30

【 0 5 5 4 】

D) モジュレーターの合成

本発明のテロメラーゼモジュレーターは、コンビナトリアル法および合理的な薬物デザイン技術を含む、薬学的分野で周知の方法を用いて作製されることが意図される。

40

【 0 5 5 5 】

1) コンビナトリアル化学方法論

合成分子の大ライブラリーの作製および同時スクリーニングは、コンビナトリアル化学における周知の技術を用いて行い得る。例えば、van Breemen (1997) Anal. Chem. 69:2159-2164; Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145-167 (1997)参照。

【 0 5 5 6 】

上記のように、コンビナトリアル化学方法論を用いて、本発明のTRTタンパク質のような、任意の標的に対する適切な結合親和性および特異性を有する特異的オリゴヌクレオチド

50

(または化合物)について迅速にスクリーニングし得る膨大な数のオリゴヌクレオチド(または他の化合物)を作製し、利用し得る(一般的背景情報については、Gold (1995) J. of Biol. Chem. 270: 13581-13584を参照のこと)。

【0557】

2) 合理的薬物デザイン

合理的薬物デザインは、標的分子の構造解析、合成化学、および進歩したコンピューター手段を含む方法論の一体化された組を含む。テロメラーゼ酵素およびhTRTタンパク質のような、タンパク質標的のアンタゴニスト/インヒビターのようなモジュレーターを設計するのに使用する場合、合理的薬物デザインの目的は、分子の三次元の形状および化学を理解することにある。合理的薬物デザインはX線結晶解析データまたはNMRデータによって支援され、今や、本発明によって提供される方法に従い、本発明によって提供される試薬を用い、hTRTタンパク質およびテロメラーゼ酵素について測定し得る。静電気学、疎水性および溶媒接近性についての計算も助けになる。例えば、Goldren (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6635-6640を参照のこと。

【0558】

E) キット

本発明はまた、試験化合物がTRT活性のモジュレーターであるか否かの決定を助けるのに使用され得るキットを提供する。このキットは、典型的には、1つ以上の以下の成分: 実質的に精製されたTRTポリペプチドまたはポリヌクレオチド(プローブおよびプライマーを含む): 細胞または無細胞発現系に導入された場合にTRT(例えば、hTRT)を発現できるプラスミド; 細胞または無細胞発現系に導入された場合にTR(例えば、hTR)を発現できるプラスミド; 細胞または細胞株; TRT活性の変化を検出するための組成物; および試験化合物の存在下におけるテロメラーゼ活性の変化は、試験化合物がテロメラーゼ活性を調節する指標であることを示す、TRT活性の変化を検出し測定するための手段を教示する教示物質、ならびに1つ以上の容器を含む。このキットはまた、TRT活性の変化を測定するための、TRAPアッセイ試薬または定量的ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ用の試薬のような手段を含むことができる。このキットはまた、試験化合物の存在下におけるテロメラーゼ活性の変化が試験化合物がテロメラーゼ活性を調節する指標であることを示す、TRT活性の変化を検出し測定するための手段を教示する教示物質を含み得る。

【0559】

XI. トランスジェニック生物(テロメラーゼノックアウト細胞および動物モデル)

本発明はまた、コード配列または調節(例えば、プロモーター)配列であり得る、外因性TRT遺伝子配列を含むトランスジェニック非ヒト多細胞生物(例えば、植物または非ヒト動物)または単細胞生物(例えば、酵母)を提供する。1つの実施態様において、この生物は、ヒトTRTタンパク質の配列を有する外因性TRTポリペプチドを発現する。この関連する実施態様において、この生物はまた、テロメラーゼRNA成分(例えば、hTR)を発現する。

【0560】

本発明はまた、テロメラーゼ成分(例えば、TRTまたはTR)またはテロメラーゼ会合タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子が、天然のテロメラーゼが発現されないか、または野生型細胞または野生型生物と比較した場合低下したレベルまたは異なる活性で発現されるように、変異または欠失している(すなわち、コード領域または調節領域において)単細胞および多細胞生物(またはそれ由来の細胞)を提供する。このような細胞および生物は、しばしば、「遺伝子ノックアウト」細胞または生物といわれる。

【0561】

本発明は、さらに、内因性テロメラーゼ遺伝子(例えば、マウスTRT)が存在しているか、または所望により変異または欠失され、そして外因性テロメラーゼ遺伝子または変異体(例えば、ヒトTRT)が導入され発現される細胞および生物を提供する。このタイプの細胞および生物は、例えば、hTRT活性または発現のモジュレーターの同定; テロメラーゼ成分遺伝子における変異の効果の決定、およびテロメラーゼ活性の発生タイミングおよび組

10

20

30

40

50

織位置の効果の決定のような他の使用（例えば、テロメラーゼモジュレーターをいつ投与すべきかの評価、および任意の可能な副作用の評価）のためのモデル系として有用である。

【0562】

多細胞生物の例としては、植物、昆虫、ならびにマウス、ラット、ウサギ、サル、類人猿、ブタおよび他の非ヒト哺乳動物のような非ヒト動物が挙げられる。単細胞生物の例は酵母である。

【0563】

特定の遺伝子（例えば、内因性TRT遺伝子）の改変または破壊の方法は当業者に周知である。例えば、Baudinら、1993, Nucl. Acids Res. 21:3329; Wachら、1994, Yeast 10:179 10
3; Rothstein, 1991, Methods Enzymol. 194:281; Anderson, 1995, Methods Cell Biol. 48:31; Pettittら、1996, Development 122:4149-4157; Ramirez-Solisら、1993, Methods Enzymol. 225:855; およびThomasら、1987, Cell 51:503を参照のこと、そのそれぞれは、その全体が全ての目的のために本明細書中で参考として援用される。

【0564】

本発明の「ロックアウト」細胞および動物は、1または数単位の内因性テロメラーゼ酵素複合体が欠失または阻害されている細胞および動物を含む。テロメラーゼ活性の再構成は、細胞または動物を老化から、またはガン細胞については、テロメアを維持するその無能力によって引き起こされる細胞死から救済する。内因性遺伝子の発現を改変する方法は、当業者に周知である。典型的には、このような方法は、調節すべき特定の遺伝子の発現を 20
制御する全てのまたは一部の調節配列を改変するかまたは置き換えることを含む。調節配列（例えば、天然プロモーター）は改変され得る。遺伝子の標的変異のための従来の技術は、目的の遺伝子を含むゲノムDNAフラグメントをベクターに入れ、続いてチミジンキナーゼを含むベクター中の選択可能なネオマイシン - 耐性カセットの回りに標的化遺伝子の関連する2つのゲノムアームをクローニングすることを含む。次いで、この「ロックアウト」構築物を適切な宿主細胞、すなわち、マウス胚性幹（ES）細胞にトランスフェクトし、これを引き続いてロックアウトベクターで相同組換えを受けた細胞の選択を可能にする陽性選択（例えば、ネオマイシン耐性について選択するためにG418を使用）および陰性選択（例えば、チミジンキナーゼを欠く細胞を排除するためにFIAUを使用）に供する。このアプローチは、目的の遺伝子の不活化に導く。例えば、米国特許第5,464,764号 30
; 同第5,631,153号; 同第5,487,992号; および同第5,627,059号を参照のこと。

【0565】

内因性遺伝子の「ロックアウト」発現はまた、相同組換えを使用して異種の核酸を目的の遺伝子の調節配列（例えば、プロモーター）に導入することによって達成され得る。機能的酵素または産物の発現を妨ぐためには、リーディングフレームを改変するか、あるいはプロモーターを破壊する単純な変異が適切であり得る。発現をアップレギュレートするために、天然プロモーターは、より高レベルの転写を誘導する異種プロモーターで置換され得る。また、例えば、Holzschu (1997) Transgenic Res. 6:97-106に記載されているように、「遺伝子トラップ挿入」を用いて宿主遺伝子を破壊することができ、マウスES細胞を用いてロックアウトトランスジェニック動物を生産することができる。 40

【0566】

相同組換えによる内因性遺伝子の発現の改変はまた、問題の構造遺伝子を含む核酸配列を用いることによって達成され得る。異種組換え構築物を標的化するために上流配列を利用する。配列番号1のようなTRT構造遺伝子配列情報を利用し、当業者は、日常的な実験のみにより相同組換え構築物を作製することができる。内因性遺伝子の発現を改変するための相同組換えは、米国特許第5,272,071号、およびWO 91/09955、WO 93/09222、WO96/29411、WO95/31560、およびWO91/12650に記載されている。マイコバクテリウムにおける相同組換えは、Azad (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4787; Baulard (1996) J. Bacteriol. 178:3091; およびPelicic (1996) Mol. Microbiol. 20:919によって記載されている。動物における相同組換えは、Moynahan (1996) Hum. Mol. Genet. 5:875によって、植 50

物における相同組換えはOffinga (1990) EMBO J. 9:3077によって記載されている。

【0567】

XII. 用語解説

以下の用語を以下に定義し、本発明の実施において当業者にさらなるガイダンスを提供する：アジュバント、対立遺伝子（および対立遺伝子配列）、アミノ酸（疎水性、極性、荷電を含む）、保存的置換、制御エレメント（および調節配列）、誘導体化、検出可能な標識、上昇したレベル、エピトープ、好ましい予後または好ましくない予後、融合タンパク質、遺伝子産物、hTR、不死の、免疫原および免疫原性、単離された、モジュレーター、モチーフ、核酸（およびポリヌクレオチド）、オリゴヌクレオチド（およびオリゴマー）、作動可能に連結された、ポリペプチド、プローブ（核酸プローブおよび抗体プローブ含む）、組換え体、選択系、配列、特異的結合、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件（およびストリンジェンシー）、実質的な同一性（および実質的な類似性）、実質的に純粋な（および実質的に精製された）、テロメラーゼ陰性およびテロメラーゼ陽性細胞、テロメラーゼ触媒活性、テロメラーゼに関連した、および試験化合物。

10

【0568】

本明細書中で使用する用語「アジュバント」は、それが混合される抗原に対する免疫応答を増強する任意の物質のその通常の意味をいう。本発明において有用なアジュバントは、フロイントのアジュバント、水酸化アルミニウムのような無機物ゲル、ならびにリゾレシチン、ブルニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールのような表面活性物質を含むが、これらに限定されない。BCG (Bacillus Calmette-Guerin) および *Corynebacterium parvum* は、潜在的に有用なアジュバントである。

20

【0569】

本明細書中で使用する用語「対立遺伝子」または「対立遺伝子配列」は、核酸配列（すなわち、hTRタンパク質をコードする核酸）の別の形態をいう。対立遺伝子の変異（すなわち、核酸配列における変化）から生じ、一般に、改変されたおよび/または異なって調節されるmRNAまたはポリペプチドを生成し、その構造および/または機能は改変されてもよく、または改変されていなくてもよい。対立遺伝子を生じさせる通常の変異変化は、一般に、コードされるアミノ酸に影響し得るか、または影響し得ないヌクレオチドの天然の欠失、付加、または置換に帰せられる。これらの型の変化のそれぞれは、単独で、他と組み合わせ、または所定の遺伝子、染色体もしくは他の細胞核酸内で1回以上起こり得る。いずれの所定の遺伝子も対立遺伝子形態を全く有さないか、1つまたは多くの対立遺伝子形態を有し得る。本明細書中で使用する用語「対立遺伝子」は、遺伝子またはこの遺伝子から転写されたmRNAのいずれか、または両方をいう。

30

【0570】

本明細書中で使用する「アミノ酸」は、時々標準的な以下の一文字コードを用いて明記される：アラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、リジン（K）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）、プロリン（P）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、システイン（C）。合成および非天然アミノ酸アナログ（および/またはペプチド結合）が含まれる。

40

【0571】

本明細書中で使用する「疎水性アミノ酸」とは、A、L、I、V、P、F、WおよびMをいう。本明細書中で使用する「極性アミノ酸」とは、G、S、T、Y、C、NおよびQをいう。本明細書中で使用する「荷電アミノ酸」とは、D、E、H、KおよびRをいう。

【0572】

タンパク質を記載する場合、本明細書中で使用する「保存的置換」は、実質的にタンパク質の活性を改変しないタンパク質のアミノ酸組成の変化をいう。従って、特定のアミノ酸配列の「保存的に修飾された変形」とは、タンパク質活性に重要でないアミノ酸のアミノ

50

酸置換、または重要なアミノ酸の置換でも実質的に活性を改変しないような、類似の特性（例えば、酸性、塩基性、正にまたは負に荷電した、極性または非極性等）を有する他のアミノ酸でのアミノ酸の置換をいう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当該分野で周知である。以下の6つの群はそれぞれ、互いについて保存的置換であるアミノ酸を含む：1）アラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）；2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4）アルギニン（R）、リシン（K）；5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；および6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）（Creighton (1984) Proteins, W. H. Freeman and Companyも参照のこと）。当業者は、前記の置換が唯一可能な保存的置換ではないことを認識する。例えば、全

10

全ての荷電アミノ酸は、それらが正または負であるかにかかわらず、互いについて保存的置換であると考えられ得る。さらに、コードされた配列において単一のアミノ酸または低い割合のアミノ酸を変化させ、付加しまたは欠失させる個々の置換、欠失または付加もまた、「保存的に修飾された変形」であり得る。天然または野生型遺伝子によって使用されるコドンとは異なる1つ以上のコドンを利用することによって、組換えタンパク質中に「保存的置換」がなされ得る。この場合、保存的置換はまた、アミノ酸のコドンを同一のアミノ酸の異なるコドンで置き換えることを含む。

【0573】

本明細書中で使用する「制御エレメント」または「調節配列」は、エンハンサー、プロモーター、転写ターミネーター、複製起点、染色体組込み配列、5'および3'非翻訳領域を含

20

み、これらとタンパク質または他の生物分子が相互作用して転写および翻訳を行う。真核生物細胞について、制御配列は、プロモーターおよび好ましくはエンハンサー（例えば、免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルス、およびポリアデニル化配列由来する）を含み、そしてスプライスドナーおよびアクセプター配列を含み得る。利用されるベクター系および宿主に依存して任意の数の適切な転写および翻訳エレメント（構成的および誘導性プロモーターを含む）が使用され得る。

【0574】

本明細書中で使用する「誘導体化」ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたは核酸は、誘導体化置換基を含むオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドをいう。いくつかの実施態様において、置換基は、相補的なポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションに

30

関して実質的に干渉しない。（例えば、既に合成されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの修飾によるか、または合成の間に修飾塩基または骨格アナログを取り込むことによって）付加された化学置換基で修飾された誘導体化オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを、代謝的に活性な真核生物細胞に導入して、hTRT DNA、RNAまたはタンパク質にハイブリダイズさせ得る。ここで、それらは局所的なDNA、RNA、またはタンパク質に対する改変または化学的修飾を生じる。あるいは、誘導体化オリゴヌクレオチドまたは、ポリヌクレオチドは、hTRTポリペプチド、テロメラーゼ - 関連タンパク質、あるいはhTRT DNAもしくはhTRT遺伝子産物と相互作用するか、またはhTRT DNA、RNAもしくはタンパク質の発現もしくは機能を改変するか、もしくは調節する他の因子と相互作用させ、そしてそれを改変し得る。例示的な付着化学置換基は：ユーロピウム（III）テキサフィリン

40

（texaphyrin）、架橋剤、ブソラレン、金属キレート（例えば、鉄により触媒される切断についての鉄/EDTAキレート）、トポイソメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、リガーゼ、ホスホジエステラーゼ、光力学ポリフィリン、化学療法剤（例えば、アドリアマイシン、ドキシルビシン（doxorubicin）、インターカレート剤、塩基修飾剤、免疫グロブリン鎖、およびオリゴヌクレオチドを含む。鉄/EDTAキレートは、ポリヌクレオチド配列の局所的切断が所望される場合にしばしば使用される化学置換基である（Hertzbergら、1982, J. Am. Chem. Soc. 104:313; HertzbergおよびDervan, 1984, Biochemistry 23:3934; Taylorら、1984, Tetrahedron 40:457; Dervan, 1986, Science 232: 464）。例示的な付着化学は、例えば、付加された反応性アミノ基を介する直接的結合（Cory

50

およびSchultz (1988) Science 238:1401, これは本明細書中で参考として援用される

）および他の直接的結合化学を含むがストレプトアビジン/ビオチンおよびジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン抗体結合法もまた使用され得る。化学置換基を結合する方法は、本明細書中で参考として援用される米国特許第5,135,720号、同第5,093,245号および同第5,055,556号に提供されている。他の結合化学は、従業者の裁量にて使用され得る。

【0575】

本明細書で使用する「検出可能な標識」は、当該分野における通常の意味を有し、そして分子の存在を（例えば、物理的または化学的特性により）検出するか、分子の存在を示すか、または共有結合もしくは別の方法で会合する別の分子の結合を可能するために使用されるか、または使用され得る原子（例えば、放射性核種）、分子（例えば、フルオレセイン）、または複合体をいう。用語「標識」はまた、基質に作用して検出可能な原子、分子または複合体を生じる共有結合した分子、または別の方法で会合した分子（例えば、酵素のような生物分子）をいう。本発明で使用するのに適した検出可能な標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電子的、光学的または化学的手段によって検出可能な任意の組成を含む。本発明において有用な標識は、標識したストレプトアビジン結合体で染色するためのビオチン、磁性ビーズ（例えば、DynabeadsTM）、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、増強された緑色蛍光タンパク質、リサミン、フィコエリトリン、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Fluor X [Amersham]、SyBRグリーンI&II [Molecular Probes]等）、放射性標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴Cまたは³²P）、酵素（例えば、ヒドロラーゼ、特にアルカリ性ホスファターゼのようなホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ、またはオキシドレダクターゼ、特に西洋ワサビペルオキシダーゼのようなペルオキシダーゼ、およびELISAにおいて常用される他のもの）、基質、補因子、インヒビター、化学ルミネセンス基、発色剤、およびコロイド金またはまたは有色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等）ビーズのような比色標識を含む。このような標識の使用を教示する特許は、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号；および同第4,366,241号を含む。このような標識を検出する手段は、当業者に周知である。従って、例えば、放射性標識および化学ルミネセンス標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを用いて検出され得、蛍光マーカーは、（例えば、蛍光活性化セルソーティングにおけるような）放射された光を検出するための光検出器を用いて検出され得る。酵素標識は、典型的には、基質と共に酵素を提供し、基質に対する酵素の作用によって生じた反応産物を検出することによって検出され、比色標識は、有色標識を単に可視化することにより検出される。従って、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電子的、光学的または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。標識は、当該分野で周知の方法に従って、アッセイの所望の成分に直接的または間接的にカップリングされ得る。非放射性標識は、しばしば間接的手段によって付着される。一般に、リガンド分子（例えば、ビオチン）は、分子に共有結合している。次いで、このリガンドは、本質的に検出可能であるか、またはシグナル発生系（例えば、検出可能な酵素、蛍光化合物、もしくは化学ルミネセンス化合物）に共有結合した抗リガンド（例えば、ストレプトアビジン）分子に結合させる。多数のリガンドおよび抗リガンドが使用され得る。リガンドが天然の抗リガンド（例えば、ビオチン、チロキシンおよびコルチゾル）を有する場合、それを標識された天然の抗リガンドと共に使用することができる。あるいは、いずれのハプテン化合物または抗原化合物も抗体と組み合わせて用いることができる。また、この分子は、例えば、酵素または発蛍光団と抱合することによってシグナル発生化合物に直接結合させることもできる。標識を検出する手段は、当業者に周知である。従って、例えば、標識が放射性標識である場合、検出のための手段は、シンチレーションカウンター、オートラジオグラフィーにおけるような写真フィルム、または貯蔵（storage）蛍光体画像化を含む。標識が蛍光標識である場合、それは蛍光色素を適切な波長の光で励起し、そして得られた蛍光を検出することによって検出することができる。蛍光は目で、写真フィルムによって、電荷結合デバイス（charge coupled device）（CCD）または光電子増倍管等のような電子検出器の使

10

20

30

40

50

用によって検出することができる。同様に、酵素標識は、酵素に対する適切な基質を提供し、得られた反応産物を検出することによって検出できる。また、単純な比色標識は、標識に結合する色を観察することによって検出できる。発蛍光団の対をアッセイで使用する場合、それらは容易に識別され得るように異なる放射パターン（波長）を有することがしばしば好ましいことが認識される。

【0576】

用語「上昇したレベル」は、コントロール標準におけるレベル（例えば、診断については、個体または疾患に罹っていない個体における正常なテロメラーゼ陰性細胞におけるレベル、および予後については、例えば、種々のグレードまたはクラスの腫瘍由来の腫瘍細胞におけるレベル）よりも上昇したか、またはそれよりも高い細胞におけるhTERT遺伝子産物（または他の特定の物質または活性）の量をいう。

10

【0577】

本明細書中で使用する用語「エピトープ」は、抗体によって認識される抗原上の部位の通常の意味を有する。エピトープは、典型的には、全タンパク質の小さな部分であるアミノ酸のセグメントである。エピトープは、立体配座的（すなわち、不連続的）であり得る。すなわち、それらは、タンパク質のフォールディングによって並べられた一次配列の非隣接部分によってコードされるアミノ酸から形成されるものであり得る。

【0578】

用語「好ましい予後」および「好ましくない予後」は、当該分野で公知である。ガンに関して、「好ましい予後」は、好ましくない予後を有するものと比較して好ましい予後を有する患者について、腫瘍の後退またはより長い生存期間の見込みがあることを意味し、他方、「好ましくない予後」は、腫瘍がより攻撃的となるらしいことを、すなわち、より速く増殖しおよび/または転移し、その結果、患者について貧弱な成果または疾患進行のより迅速な経過をもたらすらしいことを意味する。

20

【0579】

本明細書中で使用する用語「融合タンパク質」は、複合タンパク質、すなわち、単一のアミノ酸配列においては通常、共に融合されない2つの（またはそれより多くの）異なる異種ポリペプチドよりなる、単一の隣接するアミノ酸配列をいう。従って、融合タンパク質は、2つの全く異なるアミノ酸配列または2つの類似したもしくは同一のポリペプチド配列を含有する単一のアミノ酸配列を含み得る。但し、これらの配列は、天然で見い出される単一のアミノ酸配列における同一の立体配座では通常、共に見い出されない。融合タンパク質は、一般に、組換え核酸法（すなわち、その融合が本発明のポリペプチドをコードするセグメントおよび異種タンパク質をコードするセグメントを含む、組換え遺伝子融合産物の転写および翻訳の結果として）、または当該分野で周知の化学合成法のいずれかを用いることによって調製することができる。融合タンパク質の非hTERT領域（単数または複数）は、hTERTポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシル末端、または両方に融合されることができ、あるいは（部位挿入によって、またはアミノ酸を置き換えることによって）非hTERT領域は、タンパク質配列の内部に挿入されることができ、あるいは前記のものを組合せて行うことができる。

30

【0580】

本明細書中で使用する用語「遺伝子産物」は、遺伝子から転写されたRNA分子、または遺伝子によってコードされるか、もしくはRNAから翻訳されたタンパク質をいう。

40

【0581】

本明細書中で使用する「hTR」（ヒトテロメラーゼRNA(human telomerase RNA)）とは、ヒトテロメラーゼおよび任意の天然に存在する対立遺伝子および変異体または組換え変異体のRNA成分をいう。hTRは、その全体が全目的のために、本明細書において参考として援用される米国特許第5,583,016号に詳細に記載されている。

【0582】

本明細書中で使用する用語「不死」は、細胞について言及している場合、テロメラーゼ技術においてはその通常の意味を有し、明らかに制限されない複製能力を有する細胞をいう

50

。不死はまたそれらの非修飾対照物に対して増大した増殖能を有する細胞を得る。不死化ヒト細胞の例は、悪性腫瘍細胞、生殖系列細胞、およびインビトロで培養された特定の形質転換ヒト細胞株（例えば、ウイルス性オンコジーンまたはその他による形質転換により不死化した細胞）である。対照的に、最も正常なヒト体細胞は有寿命性ものであり、すなわち、制限された複製能を有し、有限数の細胞分裂の後に老化する。

【0583】

本明細書中で使用する用語「免疫原」および「免疫原性」は、当該分野におけるそれらの通常の意味を有する。すなわち、免疫原は、ヒトまたは動物への注入に際して適応した免疫応答を誘導できる分子（例えば、タンパク質または他の抗原）である。

【0584】

本明細書中で使用する「単離された」は、例えば、RNP（例えば、少なくとも1つのタンパク質および少なくとも1つのRNA）のような分子または組成物を言及する場合、分子または組成物が、それがインビボまたは天然で生じる状態において会合する少なくとも1つの他の化合物（例えば、タンパク質、他のRNAまたは他の汚染物）から分離されていることを意味する。従って、RNPが天然で会合する任意の他の成分（例えば、細胞抽出物における細胞膜）から単離された場合、このRNPは単離されたと考えられる。しかしながら、単離された組成物はまた実質的に純粋であり得る。

【0585】

本明細書で使用する「モジュレーター」とは、テロメラーゼ逆転写酵素（TRT）の「完全な」またはいずれかの「部分的活性」のいずれかまたは両方を、何らかの方法で変化させる任意の合成または天然の化合物または組成物をいう。モジュレーターは、アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。モジュレーターは、任意の有機および無機化合物であり得る（例えば、小分子、ペプチド、タンパク質、糖、核酸、脂肪酸等を含むが、これらに限定されない）。

【0586】

本明細書中で使用する「モチーフ」とは、規定されるクラスまたは型の全てのタンパク質に共通の、または保存されるタンパク質における特徴または構造を規定する隣接アミノ酸の配列（または隣接アミノ酸の配列をコードする核酸配列）をいう。モチーフまたはコンセンサス配列は、保存された残基および保存されていない残基の両方を含み得る。モチーフ配列における保存された残基は、保存された残基または残基のクラス（すなわち、疎水性、極性、非極性、または他のクラス）が、典型的には、モチーフによって規定されるタンパク質のクラスの各タンパク質（または遺伝子またはmRNA）において示された位置に存在することを示す。モチーフはタンパク質のクラスに従って異なり得る。従って、例えば、逆転写酵素は、1つ以上のモチーフによって規定され得るタンパク質のクラスを形成し、そしてこのクラスはテロメラーゼ酵素を含む。しかしながら、テロメラーゼ酵素はまた、そのクラスに特徴的なモチーフを有する酵素のクラスとしても規定できる。当業者は、モチーフにおける保存された残基としての残基の同定は、モチーフによって規定されるクラスの各メンバーが示された位置において示された残基（または残基のクラス）を有し、そしてクラスの1以上のメンバーが保存された位置において異なる残基を有し得ることを認識する。

【0587】

本明細書中で使用する用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、相互変換的に使用される。用語「ポリヌクレオチド」の使用は、オリゴヌクレオチド（すなわち、短いポリヌクレオチド）を排除することを意図せず、そして合成および/または非天然核酸（すなわち、核酸アナログまたは修飾された骨格残基または結合を含む）をいう。

【0588】

本明細書中で使用する「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」とは、約7ヌクレオチドまたはそれ以上の核酸配列、および約100程度のヌクレオチドをいい、これは、プライマー、プローブまたはアンプリマー（amplimer）として使用できる。オリゴヌクレオチドは、しばしば、約10と約50ヌクレオチドとの間の長さ、よりしばしば約14と約35ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドとの間、非常にしばしば約15と約25ヌクレオチドとの間であり、そしてオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーはまた、合成および/または非天然核酸(すなわち、核酸アナログまたは修飾された骨格残基または結合を含む)もいう。

【0589】

本明細書中で使用する用語「作動可能に連結した」は、2つ以上の核酸(例えば、DNA)セグメントの間の機能的関係をいい;例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、それが適切な宿主細胞または他の発現系においてコード配列の転写を刺激する場合、コード配列に作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結している配列は隣接しており、シグナル配列の場合には、隣接相およびリーディング相の両方である。しかしながら、エンハンサーは、その転写をエンハンサーが増強するコード配列に密接して配置される必要はない。

10

【0590】

本明細書中で使用する用語「ポリペプチド」は、用語「タンパク質」と本明細書中で相互変換可能に使用され、アミド結合によって結合されたアミノ酸残基からなるポリマー(アミノ酸および結合)をいい、合成の、天然に存在するおよび天然に存在しないそのアナログを含む。ペプチドはポリペプチドの例である。

【0591】

本明細書中で使用する「プローブ」は、特異的に別の分子に結合する分子をいう。プローブの1つの例は、実質的に相補的な核酸に特異的に結合する(すなわち、アニールまたはハイブリダイズする)「核酸プローブ」である。プローブの別の例は、対応する抗原またはエピトープに特異的に結合する「抗体プローブ」である。

20

【0592】

本明細書中で使用する「組換え」とは、合成されたかまたはそうでなければインビトロで操作されたポリヌクレオチド(例えば、「組換えポリヌクレオチド」)、細胞もしくは他の生物学的系において遺伝子産物を産生するための組換えポリヌクレオチドを用いる方法、または組換えポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド(「組換えタンパク質」)をいう。

【0593】

本明細書中で使用する「選択系」とは、安定に形質転換された細胞株の状況において、目的の組換え核酸を含有する細胞を同定しおよび/または選択する方法をいう。非常に多様な選択系が形質転換細胞の同定のために知られており、そして本発明での使用に適切である。例えば、プラスミドまたは他のベクターにより形質転換された細胞は、周知のamp、gpt、neoおよびhyg遺伝子、またはそれぞれtk-細胞またはaprt-細胞において使用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら, Cell 11:223-32 [1977])遺伝子およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら, Cell 22:817 [1980])遺伝子のような他の遺伝子のような、プラスミド上に含まれる遺伝子によって付与される抗生物質に対する耐性によって選択できる。また、抗代謝産物耐性、抗生物質耐性または除草剤耐性を選択のための基準として使用することもできる;例えば、耐性をメトトレキセートに付与し、遺伝子増幅にも有用であるdhfr(Wiglerら, Proc. Natl. Acad. Sci., 77:3567 [1980]);アミノグリコシドネオマイシンおよびG418に対して耐性を付与するnpt(Colbere-Garapinら, J. Mol. Biol. 150:1 [1981])および、それぞれ、クロロスルフロン(chlorsulfuron)およびホスフィノトリシン(phosphinotricin)アセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与するalsまたはpat(Murry, McGraw Hill Yearbook of Science and Technology, McGraw Hill, New York NY, 191-196頁 [1992])。さらなる選択可能な遺伝子が記載されている。例えば、トリプトファンの代わりにインドールを細胞が利用すること可能にするハイグロマイシン耐性付与遺伝子trpB、ヒスチジンの代わりにヒスチノールを細胞が利用することを可能にするhisD(HartmanおよびMulligan, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8047 [1988])。最近、可視化マーカーが好まれ、アントシアニン、-グルクロニダーゼおよびその基質のGUS、ならびにルシフェラーゼおよびその基質のルシフェリンのようなマーカーが、形質転換体を同定するためだけでなく、特異的ベクター系に帰せられる一過性

30

40

50

または安定なタンパク質発現の量を定量するために広く利用されている。(Rhodesら, Meth, Mol. Biol., 55:121 [1995])。

【0594】

本明細書中で使用する(他で特に言及しない限り)遺伝子、核酸、タンパク質、またはペプチドの「配列」は、二本鎖DNA分子の片鎖または両鎖におけるヌクレオチドの順序、例えば、コード鎖およびその相補体の両方の配列、または一本鎖核酸分子の配列をいい、また、ペプチドまたはタンパク質におけるアミノ酸の順序をいう。

【0595】

本明細書中で使用する「特異的結合」は、多くの他の多様な分子の存在においてでさえ他方の特異的分子と接触および会合する一方の分子、典型的には抗体またはポリヌクレオチドの能力をいう。例えば、一本鎖ポリヌクレオチドは配列が相補的である一本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合でき、そして抗体はその対応する抗原に特異的に結合できる(または「それと特異的に免疫反応する」)。

【0596】

本明細書中で使用する「ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジエンシー」は、標的に対する正確なほとんど正確な相補性を有する標的配列およびプローブの融解温度(T_m)未満の約5 ~ 約20 または25 の範囲の条件をいう。本明細書中で使用するように融解温度は、二本鎖核酸分子の集団が半解離して一本鎖になる温度である。核酸の T_m を計算する方法は当該分野において周知である(例えば、BergerおよびKimmel (1987) METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 152:GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, San Diego: Academic Press, Inc. およびSambrooksら、(1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版, 第1-3巻 Cold Spring Harbor Laboratory、以後「Sambrook」)(共に本明細書中で参考として援用される)。標準的な文献によって示されるように、 T_m 値の簡単な見積もりは、核酸が1M NaClの水溶液中に存在する場合等式: $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G+C)$ によって計算することができる。(例えば、AndersonおよびYoung, Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (1985)を参照のこと)。他の文献は、 T_m の計算に構造ならびに配列特徴を考慮するより精巧な計算を含む。ハイブリッドの融解温度(従ってストリンジेंटなハイブリダイゼーションについての条件)は、プローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成物)および標的の性質(溶液中に存在するまたは固定化されるDNA、RNA、塩基組成物)、ならびに塩および他の成分の濃度(例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコールの存在および非存在)のような種々の因子によって影響される。これらの因子の影響は周知であり、当該分野における標準的な文献で考察されている。例えば、Sambrook(前掲)およびAusubelら(前掲)を参照のこと。典型的には、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件は、pH7.0~8.3の約1.0M未満のナトリウムイオン塩濃度、典型的には、約0.01~1.0Mのナトリウムイオンの塩濃度、ならびに短いプローブ(例えば、10~50ヌクレオチド)については少なくとも約30 の温度、長いプローブ(例えば、50を超えるヌクレオチド)については少なくとも約60 の温度である。前記したように、ストリンジेंटな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加で達成することもでき、この場合、より低い温度が使用され得る。

【0597】

本明細書中で使用する用語「実質的な同一性」、「実質的な配列同一性」または「実質的な類似性」は、核酸の状況においては、2つのポリヌクレオチドの間の配列類似性の尺度をいう。実質的な配列同一性はストリンジेंटな条件下でのハイブリダイゼーション、直接的比較、または他の手段によって決定される。例えば、2つのポリヌクレオチドは、それらがストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で相互に特異的にハイブリダイズし得る場合、実質的な配列同一性を有するとして同定される。配列同一性の他の程度(例えば、「実質的」未満)は、異なるストリンジエンシーの条件下でのハイブリダイゼーションによって特徴付けることができる。あるいは、実質的な配列同一性は、2つのヌクレオチド(またはポリペプチド)配列の間のパーセント同一性として記載できる。2つの

10

20

30

40

50

配列は、それらが少なくとも約60%同一である場合、好ましくは少なくとも約70%同一である場合、または少なくとも約80%同一である場合、または少なくとも約90%同一である場合、または少なくとも約95%もしくは98%~100%同一である場合、実質的に同一であると考えられる。配列(ヌクレオチドまたはアミノ酸)のパーセント同一性は、典型的には、2つの配列の間の最適アライメントを決定し、そして2つの配列を比較することによって算定される。例えば、タンパク質発現で用いる外因性転写物は、参照配列(例えば、対応する内因性配列)と比較した同一性または類似性の特定のパーセントを有するとして記載され得る。配列の最適アライメントがNeedlemanおよびWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アライメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性方法のためのサーチによって、これらのアルゴリズムのコンピューター実行によって(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または検分によって、SmithおよびWaterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同性アルゴリズムを用いて行われ得る。種々の方法によって得られた最良のアライメント(すなわち、最高パーセントの同一が得られること)を選択する。典型的には、これらのアルゴリズムは「比較ウィンドウ」(通常は少なくとも18ヌクレオチドの長さ)にわたって2つの配列を比較して、配列類似性の局所的領域を同定および比較し、従って、小さい付加または欠失(すなわち、ギャップ)を可能にする。付加および欠失は、典型的には、付加または欠失を含まない参照配列に対して配列の20パーセント以下の長さである。特定の長さまたは領域を参照して、2つの配列の間の配列同一性を記載することが時々望ましい(例えば、2つの配列は、少なくとも500塩基対の長さにわたって少なくとも95%の同一性を有するとして記載され得る)。通常、長さは少なくとも約50、100、200、300、400、または500塩基対、アミノ酸、または他の残基である。配列同一性のパーセントは、比較の領域にわたって最適にアライメントされた2つの配列を比較する工程、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、GまたはU)が両配列に生じる位置の数を決定して適合された位置の数が得られ、そして参照配列または比較領域における塩基の総数と比較して適合した位置の数(またはパーセント)を決定する工程によって計算される。配列類似性を測定するのに適したさらなるアルゴリズムはBLASTアルゴリズムであり、これはAltschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; およびShpaer (1996) Genomics 38:179-191に記載されている。BLAST解析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列における同一長さのワードとアラインされる場合に、いくつかの陽性評価された閾値スコアTに適合するかまたはそれを満足するかのいずれかである問題の配列中に長さWの短いワードを同定することによって、最初に高スコアの配列対(HSP)を同定することを含む。Tは隣接するワードスコア閾値といわれる(Altschulら、前掲)。これらの最初の隣接ワードのヒットは、それらを含むより長いHSPを見い出すためのサーチを開始するための核として作用する。ワードのヒットは、累積アライメントスコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に拡張される。各方向におけるワードヒットの拡張は：累積アライメントスコアがその最大達成値から未知数Xだけ遠ざかる場合；累積スコアが、1以上の負のスコアリング残基アライメントの累積のために0以下になる場合；またはいずれかの配列の端に到達する場合に停止される。BLASTアルゴリズムのパラメーターであるW、T、およびXはアライメントの感度およびスピードを決定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして、11のワード長(W)、BLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919を参照のこと)の50のアライメント(B)、10の予測(E)、M=5、N=4、および両鎖の比較を使用する。用語BLASTは、2つの配列の間の類似性の統計的解析を行うBLASTアルゴリズムをいう。Karlin (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877を参照のこと。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小合計確率(P(N))であり、これは2つの核酸配列またはアミノ酸配列の間の適合性が偶然に起こる確率の指標を提供する。例えば、TRT核酸に対する試験核酸の比較において最小合計確率が約0.5、0.2、0.1、0.01、または0.0

10

20

30

40

50

01未満である場合、核酸はTRT核酸に類似すると考えられ得る。あるいは、2つの核酸配列が類似するという別の指標は、第1の核酸がコードするポリペプチドが、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であるということである。

【0598】

本明細書中で使用する用語「実質的な同一性」、「実質的な配列同一性」または「実質的な類似性」は、ポリペプチドの状況においては、2つのポリペプチドの間の類似性の程度をいい、ここで、ポリペプチドは、参照配列に対して少なくとも70%の配列同一性、または参照配列に対して80%、または85%、または100%の配列同一性、または最も好ましくは10~20アミノ酸残基の比較ウィンドウにわたって、90%の同一性を有する配列を含む。アミノ酸配列類似性または配列同一性は、必要であれば、必要とされるギャップを導入することによって、残基の適合を最適化することによって決定される。Needlehamら、(1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; およびSankoffら、1983, Time Warps, String Edits, およびMacromolecules, The Theory and Practice of Sequence Comparison, 第1章, Addison-Wesley, Reading, MA; ならびにIntelliGenetics, Mountain View, CA, およびthe University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WIからのソフトウェアパッケージを参照のこと。当業者に明らかなように、用語「実質的な同一性」、「実質的な類似性」および「実質的な配列同一性」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに関して相互変換的に使用できる。

10

【0599】

本明細書中で使用する用語「実質的に純粋な」または「実質的に精製された」は、抗体（例えば、抗hTRT抗体）のような特定の試薬を含む組成物をいう場合、この特定の試薬がこの組成物（例えば、溶媒または緩衝液は含まない）の少なくとも約75%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約99%以上であることを意味する。従って、例えば、hTRTポリペプチドに特異的に結合する本発明の好ましい免疫グロブリン調製物が実質的に精製されている。

20

【0600】

本明細書中で使用する「テロメラーゼ陰性」細胞は、テロメラーゼが発現されない、すなわちテロメラーゼ触媒活性のための通常のアッセイまたはTRAPアッセイを用いてテロメラーゼ触媒活性が検出できない細胞である。本明細書中で使用する「テロメラーゼ陽性」細胞は、テロメラーゼが発現される（すなわち、テロメラーゼ活性が検出できる）細胞である。

30

【0601】

本明細書中で使用する「テロメラーゼ関連性」疾患または症状とは、個人の細胞におけるテロメラーゼ活性の異常に高いレベルと相関するか、ほとんどの正常体細胞についてのいずれのテロメラーゼ活性をも含み得るか、または正常細胞機能の減損を生じる低レベルのテロメラーゼ活性と相関する、被験体における疾患または症状である。テロメラーゼ関連性疾患の例としては、例えば、ガン（悪性細胞における高いテロメラーゼ活性）および不妊症（生殖系細胞における低いテロメラーゼ活性）が挙げられる。

【0602】

本明細書中で使用する「試験化合物」または「薬剤」は、任意の合成または天然の化合物または組成物をいう。この用語は、全ての有機化合物および無機化合物を含み；例えば、小分子、ペプチド、タンパク質、糖、核酸、脂肪酸などが挙げられる。

40

【0603】

XIII. 実施例

以下の実施例は本発明を説明するために提供され、本発明を限定するものではない。

【0604】

以下の節において、以下の略語が適用される；eq(当量)；M(モル濃度)； μ M(マイクロモル濃度)；N(規定)；mol(モル)；mmol(ミリモル)； μ mol(マイクロモル)；nmol(ナノモル)；g(グラム)；mg(ミリグラム)； μ g(マイクログラム)；ng(ナノグラム)；lまたはL(リットル)；ml(ミリリットル)； μ l(マイクロリットル)；c

50

m (センチメートル) ; mm (ミリメートル) ; μ m (マイクロメートル) ; nm (ナノメートル) ; (度摂氏) ; RPN (リボ核タンパク質) ; mreN (2'-O-メチルリボヌクレオチド) ; dNTP (デオキシリボヌクレオチド) ; dH₂O (蒸留水) ; DDT (ジチオスレートール) ; PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル) ; TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, 約pH7.2) ; K Glu (グルタミン酸カリウム) ; SSC (塩およびクエン酸ナトリウム緩衝液) ; SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) ; PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) ; Novex (Novex, San Diego, CA) ; BioRad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ; Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) ; Boehringer-Mannheim (Boehringer-Mannheim Corp., Concord, CA) ; Amersham (Amersham, Inc., Chicago, IL) ; Strategene (Strategene Cloning System, La Jolla, CA) ; NEB (New England Biolabs, Beverly, MA) ; Pierce (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) ; Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA) ; Lab Industries (Lab Industries, Inc., Berkeley, CA) ; Eppendorf (Eppendorf Scientific, Madison, WI) ; および Molecular Dynamics (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)。

10

【 0 6 0 5 】

実施例 1

テロメラーゼタンパク質およびクロンの単離

以下の実施例は、種々の生物からのテロメラーゼタンパク質およびクロンの単離 (euplotes p.123のhTRT、TRT、およびS. pombe TRTテロメラーゼcDNAクローンを含む) を詳細に記載する。

【 0 6 0 6 】

20

A. 背景

i) 序説

この節は、TRT遺伝子の精製およびクローニングの概説を提供し、本実施例の以下の節においてより詳細に記載する。テロメラーゼRNAサブユニットは、繊毛虫、酵母および哺乳動物において同定されてきたが、この酵素のタンパク質サブユニットは、本発明の前には、それ自体が同定されていなかった。繊毛虫原生動物のEuplotes aediculatus由来のテロメラーゼの精製により、p123およびp43と呼ばれる2つのタンパク質が得られた (以下を参照; Lingner (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:10712)。Euplotes aediculatusは、約 8×10^7 個のテロメアおよび約 3×10^5 個のテロメラーゼ分子を含有する大核を有する貧毛の (hypotrichous) 繊毛虫である。精製の後、活性なテロメラーゼ複合体は、66kD RNAサブユニットおよび約123kDおよび43kDの2つのタンパク質に対応する約230kDの分子量を有した (Linger (1996), 前掲)。光架橋実験により、より大きいp123タンパク質がテロメアDNA基質の特異的結合に関与することが示された (Lingner, (1996), 前掲)。

30

【 0 6 0 7 】

このp123およびp43タンパク質を配列決定し、そしてこれらのタンパク質をコードするcDNAクローンを単離された。これらのEuplotes配列は、Tetrahymenaのテロメラーゼ会合性タンパク質であるp80およびp95に関連しないことが見出された。Euplotes p123の配列解析により逆転写酵素 (RT) モチーフが示された。さらに、他の配列との比較によるEuplotes p123の配列解析により、Est2タンパク質と呼ばれる酵母ホモログが示された (Lingner (1997) Science 276:561)。酵母Est2はインピボにおけるテロメラーゼ維持に必須であることは以前に示されているが (Lendvay (1996) Genetics 144:1399)、テロメラーゼ触媒タンパク質としては同定されていなかった。部位特異的変異誘発により、酵母Est2のRTモチーフがインピボおよびインピトロでのテロメアDNA合成のために必須であることが示された (Lingner (1997), 前掲)。

40

【 0 6 0 8 】

ii) S. pombeのテロメラーゼの同定および特徴付け

S. pombeのDNAのPCR増幅を、以下に記載するEuplotes p123RTモチーフから設計された縮重配列プライマーを用いて行った。生成された4つの顕著なPCR産物のうち、120塩基対バンドが、p123およびEst2に相同なペプチド配列をコードしていた。このPCR産物をコロニーハイブリダイゼーションにおいてプローブとして用い、S. pombeのゲノムライブラリー

50

から重複する2つのクローンを、および*S. pombe* cDNAライブラリーから3つのクローンを同定した。配列分析により、3つの*S. pombe* cDNAクローンのうちのいずれもが全長ではないことが示され、従って、RT-PCRを用いてタンパク質のN末端をコードする配列を得た。

【0609】

これらのクローンの完全な配列決定により、推定の*S. pombe*テロメラーゼRT遺伝子、*trt1*が示された。*trt1*の完全なヌクレオチド配列は、GenBankに、アクセス番号AF015783で寄託された(図15を参照のこと)。

【0610】

(触媒サブユニットとしての)*S. pombe trt1*を試験するために、2つの欠失構築物を作製した。配列の解析により、*trt1*が116kDの予測される分子量を有する塩基性タンパク質をコードすることが示された。p123およびEst2との相同性は、7つの逆転写酵素モチーフ(下線を施し、およびモチーフ1、2、A、B、C、DおよびEと命名する(図63参照))において特に高いことが見出された。別のテロメラーゼ-特異的モチーフ(T-モチーフと命名)がまた見出された。36~71塩基対の大きさの範囲の15個のイントロンが、コード配列を中断していた。

10

【0611】

触媒サブユニットとしての*S. pombe trt1*を試験するために、2つの欠失構築物を作製した。1つはRTドメインにおいてモチーフB~Dのみを除去した。2つ目は、オープンリーディングフレームの99%を除去した。

20

【0612】

*S. pombe*の両方の変異体の孢子から増殖させたハプロイド細胞は、テロメア反復に対するハイブリダイゼーションがほとんど検出できなくなる点までの進行的テロメア短鎖化を示した。*trt1*⁺/*trt1*⁻ディプロイドは孢子を形成し、得られたテトラドを切り開き、アミノ酸を補足した酵母エキス培地で発芽させた(YESプレート、Alfa (1993) Experiments with Fission Yeast, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。各孢子に由来するコロニーを3日間32 で増殖させ、3日毎に新鮮なYESプレートに順次、ストリークした。各ラウンドからのコロニーを、32 で、6 mlのYES液体培養に入れ、そして静止期まで増殖させた。ゲノムDNAを調製した。ApaIでの消化した後、DNAを2.3%アガロースゲル上での電気泳動に供し、エチジウムブロミドで染色して、各レーンにおけるほぼ等しいローディングを確認し、次いで、ナイロンメンブレンに移し、テロメアDNAプローブにハイブリダイズさせた。

30

【0613】

(典型的には、発芽後の第4ストリークにおいて)寒天上で増殖の開始が遅延するかまたは増殖できないことによって、およびぎざぎざの縁が増大するコロニーによって(図22Cに示したコロニー形態)によって、および細長い細胞の高画分率が増大することによって(図22Dに示す)、老化が示された。細胞を、写真をとる前に、塩化アンモニウムをグルタミン酸で置き換えた最小培地(Alfa (1993), 前掲)上で、32 で2日間、平板培養した。

【0614】

個々の拡大された細胞を、解剖顕微鏡で分離した場合、大部分がさらなる分裂を受けないことが見出された。同じテロメラーゼ陰性(*trt1*⁻)細胞集団は、分裂を続けるが、頻繁に非分裂子孫を産生する正常な大きさの細胞を常に含ま。テロメラーゼ陰性生存種は、種々のテロメア-複製遺伝子が欠失された発芽酵母株について記載されているテロメア維持の組換え態様を使用し得る(Lendvay (1996), 前掲, Lundblad (1993) Cell 73:347)。

40

【0615】

iii) ヒトテロメラーゼの同定および特徴付け

Euplotesの123kDaペプチドおよび核酸配列、ならびにSchizosaccharomycesタンパク質および対応するcDNA(*tez1*)配列を用いる、dbEST(発現された配列タグ) GenbankデータベースのBLASTサーチによって、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTRT) cDNAに由来するEST(

50

発現された配列タグ)を同定した。Genbank AA28196と命名されたESTは、389ヌクレオチド長であり、これはクローン712562の1679~2076位(図18)に対応し、I.M.A.G.E. Consortium (Human Genome Center, DOE, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA)から得られた。このクローンは、扁桃腺細胞のフローソーティングによって得られた胚芽B細胞のcDNAライブラリーから得られた。このhTRTcDNAクローンの完全な配列決定は、8つのテロメラーゼRT (TRT) モチーフの全てを示した。しかし、このhTRTクローンは、RTモチーフB'、C、D、およびEが、よりN末端側のRTモチーフではなく異なるオープンリーディングフレームに含まれていたため、TRTの隣接部分をコードしなかった。さらに、RTモチーフAとBとの間の距離は、3つの以前に知られている(非ヒト)TRTのものよりも実質的に短かった。

10

【0616】

全長cDNAクローンを単離するために、高レベルのテロメラーゼ活性を発現するヒト293細胞株(前記)に由来するcDNAライブラリーをスクリーニングした。293細胞株由来のcDNAライブラリーを、各約200,000ブランクを含有する25プールに分配した。プライマー対、5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3'および5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'でのPCRによって各プールをスクリーニングした。1つの陽性一次プールの6つのサブプールを、この同じプライマー対を使用するPCRによってさらにスクリーニングした。一次および二次サブプールスクリーニングの両方について、hTRTを94、45秒; 60、45秒; および72、90秒での合計31サイクルで増幅した。コントロールとして、ハウスキーピング酵素GAPDHのRNAを、プライマー対5'-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3'および5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3'を用い、94、45秒; 55、45秒; および72、90秒での合計16サイクルで増幅した。

20

【0617】

次いで、二次スクリーニングからの1つのhTRT陽性サブプールを、クローン#712562の5'領域由来のプロンプを用いたブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。1つのファージは陽性として同定された(ファージ25-1.1と命名、ATCC209024、1997年5月12日に寄託)。これは、約4 kbのインサートを含有した。このインサートを切り出し、そしてEcoRIフラグメントとしてpBluescript II SK+ベクター(Stratagene, San Diego, CA)のEcoRI部位にサブクローニングした。このcDNAクローンを含有するプラスミドを、pGRN121と命名した。cDNAインサートは、合計で約4 kb対である。ヒトhTRT cDNA(pGRN121)の完全なヌクレオチド配列を、Genbankに寄託し(アクセス番号AF015950)、そしてプラスミドをATCCに寄託した(1997年5月6日寄託; ATCC209016)。

30

【0618】

B. *Euplotes aediculatus*の増殖

この実施例では、*E. aediculatus*の培養物は、David Prescott博士(MCDB, University of Colorado)から入手した。Prescott博士は最初にこの培養を池の水から単離したが、この培養物はATCC(ATCC#30859)からも入手できる。栄養源としてChlorogoniumを含有する15リットルのガラス製容器中、非滅菌条件下で、Swantonら(Swantonら, Chromosoma 77: 203 [1980])によって記載されているように培養物を増殖させた。密度が約 10^4 細胞/mlに到達した時に、生物を培養物から収集した。

【0619】

C. 核抽出物の調製

本実施例では、後記するように、*E. aediculatus*の核抽出物をLingnerら(Lingnerら, Genes Develop., 8:1984 [1994])の方法をわずかに改変して用いて調製した。簡潔には、パートBに記載したように増殖した細胞を15 μ m Nytexフィルターで濃縮し、そして氷上で冷却した。細胞ペレットを110mlの最終容量のTMS/PMSF/スぺルミジンリン酸緩衝液に再懸濁した。ストックのTMS/PMSF/スぺルミジンリン酸緩衝液は、0.075gのスぺルミジンリン酸(USB)および0.75mlのPMSF(エタノール中で調製した100mMストック由来の)を150mlのTMSに添加することによって調製した。TMSは10mM Tris酢酸、10mM MgCl₂、85.5752gのスクロース/リットル、および0.33297gのCaCl₂/リットル、pH7.5を含む。

【0620】

40

50

TMS/PMSF/スペルミジンリン酸緩衝液での再懸濁の後、8.8mlの10% NP-40および94.1gのスクロースを添加し、そして混合物を、オーバーヘッドモーターに連結させたステンレス鋼攪拌ロッド付きのシリコンガラスビーカーに入れた。混合物を、細胞が完全に溶解するまで攪拌した（約20分）。次いで、Beckman JS-13 スイングアウトローターを用いて、4で、7500rpm(8950×g)で10分間、混合物を遠心分離した。上清を除去し、そして核ペレットをTMS/PMSF/スペルミジンリン酸緩衝液で再懸濁し、そしてBeckman JS-13 スイングアウトローターを用いて、4で、7500rpm(8950×g)で5分間、再度遠心分離した。

【0621】

上清を除去し、そして核ペレットを、10gの採集細胞あたり0.5ml緩衝液の容量で、50mM Tris酢酸、10mM MgCl₂、10%グリセロール、0.1%NP-40、0.4M KGluc、0.5mM PMSF、pH7.5を含む緩衝液で再懸濁した。次いで、再懸濁した核を約50ストロークでガラスホモジナイザーに入れ、次いで、Eppendorf遠心分離機で、4で、14,000rpmにて25分間遠心分離した。核抽出物を含有する上清を収集し、液体窒素中で凍結し、そして使用するまで-80で保存した。

【0622】

D. テロメラーゼの精製

本実施例では、パートCに記載したように調製した核抽出物を用いて、*E. aediculatus* テロメラーゼを精製した。この精製プロトコルにおいて、Affi-Gel-ヘパリンカラムのクロマトグラフィーによってまずテロメラーゼを富化し、そして次いで、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いるアフィニティー精製によつて大量に精製した。テロメラーゼRNAのテンプレート領域は、テロメラーゼRNP粒子におけるハイブリダイゼーションに利用できるもので、テロメラーゼについての親和性罠(bait)としてのこのテンプレート領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド（すなわち、「アフィニティーオリゴヌクレオチド」）を合成した。ピオチン残基を、それをアビジンカラムに固定化するために、オリゴヌクレオチドの5'末端に含めた。

【0623】

テロメラーゼのオリゴヌクレオチドへの結合、および徹底的な洗浄に続き、置換オリゴヌクレオチドの使用によってテロメラーゼを溶出させた。アフィニティーオリゴヌクレオチドは、テロメラーゼ - 特異的配列の5'側のテロメラーゼRNAに相補的ではないDNA塩基を含んだ。置換オリゴヌクレオチドは、その全長につきアフィニティーオリゴヌクレオチドに相補的であったので、アフィニティーオリゴヌクレオチドに結合したテロメラーゼよりもよりさらに熱力学的に安定な二本鎖を形成し得た。従って、置換オリゴヌクレオチドの添加により、カラムからテロメラーゼが溶出された。

【0624】

45リットル培養から調製した核抽出物を、合計34mlの核抽出物が収集されるまで凍結した。これは630リットルの培養物（すなわち、約4×10⁹細胞）に対応した。核抽出物を緩衝液で410mlに希釈して、最終濃度20mMのTris酢酸、1mM MgCl₂、0.1mM EDTA、33mM KGluc、10%（容量/容量）グリセロール、1mMジチオスレイトール（DTT）、および0.5mMフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）（pH7.5）を得た。

【0625】

希釈した核抽出物を、同じ緩衝液で平衡化した、230mlベッド容量および5cm直径の、Affi-Gel-ヘパリンゲルカラム（Bio-Rad）に適用し、そして33~450mM KGlucグラジエント2リットルで溶出し、カラムを、1カラム容量/時間の流速で、4で流した。各50mlの画分を収集し、そしてパートEに記載したようにテロメラーゼ活性につき検定した。テロメラーゼを約170mM KGlucでカラムから溶出した。テロメラーゼを含有する画分（約440ml）をプールし、そして20mM Tris酢酸、10mM MgCl₂、1mM EDTA、300mM KGluc、10%グリセロール、1mM DTTおよび1%Nonidet P-40に調整した。この緩衝液を「WB」と命名した。

【0626】

この調製物に、このプール1mlあたり、各1.5nmolの2種類の競合体DNAオリゴヌクレオチド（5'-TAGACCTGTTAGTGTACATTTGAATTGAAGC-3'および5'-TAGACCTGTTAGTTGGATTTGTGGCATCA-

10

20

30

40

50

3'), 50 μ g酵母RNA (Sigma)、および0.3nmolのピオチン標識化テロメラーゼ特異的オリゴヌクレオチド(5'-ピオチン-TAGACCTGTTA-(mreG)₂-(rmeU)₄-(rmeG)₄-(rmeU)₄-remG-3')を添加した。テロメラーゼ特異的オリゴヌクレオチドの2'-O-メチルリボヌクレオチドは、テロメラーゼRNA; テンプレート領域に相補的であり; このデオキシリボヌクレオチドは相補的ではなかった。競合体の非特異的DNAオリゴヌクレオチドの含有は、アフィニティーオリゴヌクレオチドに結合するかまたは混合物からテロメラーゼを除去するであろう混合物中の核酸結合性タンパク質および他の成分の効果が最小化されるので、精製の効率は増加した。

【0627】

次いで、この物質を、プール1mlあたり60 μ lの懸濁液の容量で、Ultralink固定化ニュートラアビジン(neutravidin)添加(Pierce)カラム物質に添加した。0.01% Nonidet P-40、0.5mg BSA、0.5mg/mlリゾチーム、0.05mg/mlグリコーゲン、および0.1mg/ml酵母RNAを含有するWBの調製物で、カラム物質を各ブロッキングについて15分間、2回プレブロックした。ブロッキングは、4℃で回転ホイール(rotating wheel)を用いて行い、カラム物質を徹底的にブロックした。最初のブロッキング工程の後、そして第2のブロッキング工程前に、カラム物質を200 \times gで2分間遠心分離してマトリックスをペレット化した。

【0628】

プール-カラム混合物を、回転ホイール(約10rpm; Labindustries)で、30℃で8分間、次いでさらに4℃で2時間インキュベートして結合させた。次いで、プール-カラム混合物を200 \times gで2分間遠心分離し、未結合物質を含む上清を除去した。次いで、プール-カラム混合物を洗浄した。この洗浄プロセスは、プール-カラム混合物を4℃でWBでリンスする工程、混合物を15分間4℃でWBで洗浄する工程、WBでリンスする工程、0.6M KCluを含有しNonidet P-40を含有しないWBで30℃で5分間洗浄する工程、WBで25℃で5分間洗浄する工程、そして最後にWBで再度リンスする工程を包含した。最終洗浄後に残る容量を少量に保って、約1:1の緩衝液に対するカラム物質の比率を生じた。

【0629】

テロメラーゼを、カラム物質1mlあたり1nmolの置換デオキシオリゴヌクレオチド(5'-CA₄C₄A₄C₂TA₂CAG₂TCTA-3')を添加し、そして25℃で30分間インキュベートすることによって、カラム物質から溶出させた。この物質を、微量遠心分離機(Eppendorf)で、14,000rpmで2分間遠心分離し、そして溶出物を回収した。毎回新しい置換オリゴヌクレオチドを用い、溶出手順をさらに2回反復した。前記したように、置換オリゴヌクレオチドはアフィニティーオリゴヌクレオチドに相補的であったので、P-40よりアフィニティーオリゴヌクレオチドとより熱力学的に安定な複合体を形成した。従って、置換オリゴヌクレオチドのアフィニティー-結合テロメラーゼへの添加により、天然条件下でテロメラーゼの十分な溶出が得られた。テロメラーゼは、タンパク質ゲルでの分析によって判断した場合、この段階で約50%の純度であるようであった。テロメラーゼのアフィニティー精製および置換オリゴヌクレオチドでの溶出を、図26(それぞれ、パネルAおよびB)に示す。この図において、アフィニティーオリゴヌクレオチドの2'-O-メチル糖は太線によって示される。この図中の黒色および陰影を施した楕円は、本発明のタンパク質サブユニットを写実的に表示することが意図される。

【0630】

Affi-Gel-ヘパリンカラムクロマトグラフィー後得られた抽出物および物質のタンパク質濃度は、標準としてBSAを用い、Bradford (Bradford, Anal. Biochem., 72:248 [1976])の方法を用いて測定した。テロメラーゼ調製物の画分のみをグリセロールグラジエントでさらに精製した。

【0631】

テロメラーゼの沈降係数をパートIに記載したようにグリセロールグラジエント遠心分離によって決定した。

【0632】

以下の表19は本実施例の方法に従って精製したテロメラーゼの精製の表である。このテ

10

20

30

40

50

ロメラゼは、回収率80%で全細胞抽出物と比較して核抽出物が12倍富化されている；テロメラゼの85%は抽出に際して核から可溶化された。

【0633】

【表19】

テロメラゼの精製

画分	タンパク質 (mg)	テロメラゼ (RNP の pmol)	テロメラゼ/タンパク質/ pmol の RNP/mg	回収率(%)	精製因子
核抽出物	2020	1720	0.9	100	1
ヘパリン	125	1040	8.3	60	10
アフィニティー	0.3**	680	2270	40	2670
グリセロール グラジエント	NA*	NA*	NA*	25	NA*

10

【0634】

* NA = 利用できず

20

** この値は（タンパク質ゲルに基づき）50%の純度を仮定することにより、テロメラゼの測定量（680pmol）から計算した。

【0635】

E．テロメラゼ活性

テロメラゼの精製の各工程において、本実施例に記載されるように、3つの別のアッセイ（このうちの1つは活性であった）によって分析した。一般に、テロメラゼアッセイは、0.003~0.3μlの核抽出物、50mM Tris-Cl（pH7.5）、50mM KCl、10mM MgCl₂、1mM DTT、125μM dTTP、125μM dGTP、および約0.2pmolの5'-³²P-標識オリゴヌクレオチド基質（すなわち、約400,000cpm）を含有する40μlで行った。オリゴヌクレオチドプライマーを、反応混合物へのそれらの添加に先立って熱変性した。反応物を氷上に集め、25で30分間インキュベートした。200μlの10mM Tris-Cl（pH7.5）、15mM EDTA、0.6% SDS、および0.05mg/mlプロテイナーゼKの添加によって反応を停止させ、そして45で少なくとも30分間インキュベートした。エタノール沈殿の後、当該分野で公知のように（例えば、Sambrookら、1989参照）、生成物を変性8%PAGEゲルで分析した。

30

【0636】

F．テロメラゼ活性の定量

本実施例では、精製手順を通じてのテロメラゼ活性の定量を記載する。dGTPおよび[⁻³²P]dTTPの存在下でオリゴヌクレオチドプライマーの伸長をアッセイすることによって定量を達成した。簡潔には、記載されるように、（Lingnerら、Genes Develop., 8:1984 [1994]）、2μlの[⁻³²P]dTTP（10mCi/ml、400Ci/mmol：1Ci=37GBq）の存在下で、1μMの5'-(G₄T₄)₂-3'オリゴヌクレオチドを20μlの反応混合物中で伸長させ、記載されるように8%PAGE配列決定ゲルにロードした。

40

【0637】

この実験の結果を図28に示す。レーン1では、テロメラゼは存在せず（すなわち、陰性コントロール）；レーン2、5、8および11は0.14fmolのテロメラゼを含有し；レーン3、6、9および12は、0.42fmolのテロメラゼを含有し；そしてレーン4、7、10および13は、1.3fmolのテロメラゼを含有した。製造業者の指示を用いて、PhosphorImager（Molecular Dynamics）を用いて活性を定量した。これらの条件下では、30分以内に、1fmolのアフィニティー-精製テロメラゼが21fmolのdTTPを取り込んだことが決定された。

50

【0638】

図28に示されるように、テロメラーゼの特異的活性は精製手順を通じて有意に変化しなかった。アフィニティー-精製テロメラーゼは十分に活性であった。しかしながら、高濃度では、阻害活性が検出され、そして粗抽出物の活性は直線的でないと決定された。従って、図28に示したアッセイにおいて、粗抽出物を700-7000倍希釈した。精製に際し、この阻害活性は除去され、そして阻害効果は、高酵素濃度においてさえ精製テロメラーゼ調製物では検出されなかった。

【0639】

G. ゲル電気泳動およびノーザンブロット

パートEに述べたように、テロメラーゼの精製における各工程では、調製物を3つの別々のアッセイによって分析した。本実施例は、画分に存在するテロメラーゼRNAを定量し、そしてテロメラーゼリボ核タンパク質粒子の全部を分析するために使用したゲル電気泳動およびブロッティング手順を記載する。

【0640】

i) 変性ゲルおよびノーザンブロット

本実施例では、既知の濃度の合成T7-転写テロメラーゼRNAを標準として供した。この調査を通じて、RNA成分をテロメラーゼの尺度として用いた。

【0641】

E. aediculatusテロメラーゼRNAのファージT7 RNAポリメラーゼ転写のための構築物を (PCR) を用いて生成した。テロメラーゼRNA遺伝子を、遺伝子のいずれかの末端にアニールするプライマーを用いて増幅した。5'末端にアニールするプライマーはまた、転写されたRNAの切断に際しての天然の5'末端、T7-プロモーター配列、およびサブクロニングのためのEcoRI部位を生成するためのハンマーヘッド (hammerhead) リボザイム配列もコードした。この5'プライマーの配列は、5'-GCGGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGAAGAACTCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACTCCACGAAAGTGGAGTAAGTTTCTCGATAATTGATCTGTAG-3'であった。3'プライマーは、天然の3'末端に転写終結のためのEarI部位、およびクロニングのためのBamHI部位を含んだ。この3'プライマーの配列は5'-CGGGGATCCTCTTCAAAAGATGAGAGGACAGCAAC-3'であった。PCR増幅産物をEcoRIおよびBamHIで切断し、そしてpUC19 (NEB) の各部位にサブクローンして「pEaT7」を得た。このインサートの正確さをDNA配列決定によって確認した。T7転写は、Zaugら, Biochemistry 33:14935[1994]によって記載されているように、EarI線状化プラスミドで行った。RNAをゲル精製し、そして濃度を測定した ($1 = 40 \mu\text{g/ml}$ の A_{260})。このRNAを標準として使用して、テロメラーゼの種々の調製物に存在するテロメラーゼRNAを決定した。

【0642】

ハイブリダイゼーションのシグナルはテロメラーゼRNAの量に比例し、そして由来するRNA濃度は天然のゲル電気泳動によって得られたものと合致したが、それよりもわずかに高かった。既知のT7のRNA転写物濃度の連続希釈物に対する全細胞RNAにおける全テロメラーゼRNAの量の比較は、各E. aediculatus細胞が約300,000テロメラーゼ分子を含有することを示した。

【0643】

テロメラーゼの可視化を、記載されている方法を用い (Libgnerら, Genes Develop., 8:1984 [1994])、そのRNA成分に対するノーザンブロットハイブリダイゼーションによって達成した。簡潔には、当該分野で公知のように (例えば、Sambrookら, 1989参照)、RNA ($0.5 \mu\text{g}$ /レーン未満または等価) を、8% PAGEで分解し、そしてHybond-N膜 (Amersham) に電気ブロットした。このブロットを、10mlの4×SSC、10×デンハルト溶液、0.1% SDS、および $50 \mu\text{g/ml}$ 変性ニシン精子DNA中で一晩ハイブリダイズし、3時間のプレハイブリダイズの後、 2×10^6 cpmプローブ/mlハイブリダイゼーション溶液を添加した。ランダムに標識したプローブ、全テロメラーゼRNA遺伝子をカバーするPCR産物であった。ブロットを2×SSC、0.1% SDS中で30分間、そして次いで、45 で0.1×SSCおよび0.1% SDS中で1時間、緩衝液を数回交換しながら洗浄した。

10

20

30

40

50

【0644】

ii) 天然ゲルおよびノーザンブロット

本実験では、当該分野で公知であり、そして記載されているように (LamondおよびSproat [1994], 前出)、精製したテロメラーゼ調製物を、3.5% ポリアクリルアミドおよび0.33% アガロースの天然 (すなわち、非変性) ゲルで泳動した。テロメラーゼはキシレンシアノール色素とほとんど一緒に移動した。

【0645】

天然ゲルにより、テロメラーゼが精製プロトコルを通じてRNPとして維持されることを示した。図27は、非変性ゲル上の異なる画分におけるテロメラーゼならびにインビトロ転写されたテロメラーゼの移動度を示すノーザンブロットの写真である。この図において、レーン1は1.5fmolのテロメラーゼRNAを含有し、レーン2は4.6fmolのテロメラーゼRNAを含有し、レーン3は14fmolのテロメラーゼRNAを含有し、レーン4は41fmolのテロメラーゼRNAを含有し、レーン5は核抽出物 (42fmolテロメラーゼ) を含有し、レーン6はAffi-Gel-ヘパリン-精製テロメラーゼ (47fmolテロメラーゼ) を含有し、レーン7はアティニティー-精製テロメラーゼ (68fmol) を含有し、そしてレーン8はグリセロールグラジエント-精製テロメラーゼ (35fmol) を含有した。

【0646】

図27に示すように、核抽出物においては、テロメラーゼはRNP粒子にアSEMBルし、これはアSEMBルしていないテロメラーゼRNAよりもゆっくりと移動した。1%未満の遊離RNAがこの方法によって検出された。しかし、よりゆっくりと移動するテロメラーゼRNP複合体もまた抽出物中で時々検出された。Affi-Gel-ヘパリンカラムでの精製に際して、テロメラーゼRNP粒子は移動度が変化しなかった (図27、レーン6)。しかし、アティニティー精製に際して、RNA粒子の移動度はわずかに増加し (図27、レーン7)、これはおそらく、タンパク質サブユニットまたはフラグメントが喪失したことを示す。グリセロールグラジエントでは、アティニティー精製テロメラーゼはサイズが変化しなかったが、約2%の遊離テロメラーゼRNAが検出され (図27、レーン8)、これは少量のRNP粒子のジアSEMBルが起こったことを示す。

【0647】

H. テロメラーゼタンパク質組成

本実施例では、精製されたテロメラーゼタンパク質組成の分析を記載する。

【0648】

パートDに記載したように得られたグリセロールグラジエント画分を、4~20%のポリアクリルアミドゲル (Novex) で分離した。電気泳動に続き、ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した。図29はゲルの写真を示す。図29に示すゲルの左側に示すように、レーン1および2は分子量マーカー (Pharmacia) を含んだ。レーン3~5はゲルの頂部に示すようにグリセロールグラジエント画分プールを含んだ (すなわち、レーン3は画分9~14を含み、レーン4は画分15~22を含み、レーン5は画分23~32を含んだ)。レーン4は、1pmolのテロメラーゼRNAを含むプールを含有した。レーン6~9では、図29のゲルの頂部に示される濃度でBSA標準を泳動させた (すなわち、レーン6は0.5pmolのBSAを含み、レーン7は1.5pmolのBSAを含み、レーン8は4.5BSAを含み、そしてレーン9は15pmolのBSAを含んだ)。

【0649】

図29に示すように、120および43kDaの分子量を有するポリペプチドをテロメラーゼと共に精製した。43kDaポリペプチドはダブレットとして観察された。レーン3における約43kDaのポリペプチドが、レーン4のダブレットとは異なって移動したことに注意した; それは無関係なタンパク質であろう。120kDaおよび43kDaダブレットはそれぞれ、BSA標準と比較した場合、約1pmolのレベルで、クーマシーブリリアントブルーで染色された。この画分は1pmolのテロメラーゼRNA (その全てはRNP粒子にアSEMBルした (図27、レーン8参照)) を含有したので、テロメラーゼRNAに対して化学量論的な2種のポリペプチドサブユニットがあるようであった。しかし、43kDa近辺の2つのタンパク質が別々の酵素サブユ

10

20

30

40

50

ニットである可能性もある。

【0650】

グリセロールグラジエントでの分画に付さなかったアフィニティー-精製テロメラーゼは、それぞれ、35kDaおよび37kDaの見かけの分子量を有するさらなるポリペプチドを含有した。この後者の画分は、少なくとも50%の純度であると見積もられた。しかし、アフィニティー-精製物質中に存在する35kDaおよび37kDaポリペプチドは、グリセロールグラジエント遠心分離によって再現性よくは分離されなかった。これらのポリペプチドは混成物であり得る。というのは、それらは全ての活性含有調製物中で見られなかったからである。

【0651】

I. 沈降係数

テロメラーゼについての沈降係数は、グリセロールグラジエント遠心分離によって決定した。本実施例では、核抽出物およびアフィニティー-精製テロメラーゼを、1 mM $MgCl_2$ 、0.1 mM EDTA、300 mM KGluc、および1 mM DTT、pH7.5を有する20 mM Tris酢酸を含有する15~40%グリセロールグラジエントで分画した。グリセロールグラジエントを、5 ml (13×51 mm) チューブに注ぎ、そしてSW55Tiローター (Beckman)を用いて、55,000rpmで4 で14時間遠心分離した。

【0652】

マーカータンパク質を平行グラジエントで泳動し、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) については7.6 S の沈降係数、カタラーゼについては113 S、アポフェリチンについては17.3 S、およびチログロブリンについては19.3 S の沈降係数を有した。テロメラーゼピークを、グラジエント画分の天然ゲル電気泳動、その後のRNA成分へのプロットハイブリダイゼーションによって同定した。

【0653】

図30は、テロメラーゼについての沈降係数を示すグラフである。図に示されるように、アフィニティー-精製テロメラーゼは11.5 S でカタラーゼと共に移動し、一方、核抽出物中のテロメラーゼはわずかに速く沈降し、12.5 S 辺りにピークがあった。従って、天然ゲルにおける酵素の移動度と一致して、精製されたテロメラーゼは、タンパク質分解フラグメントまたはゆるく会合したサブユニットを喪失したように見える。

【0654】

計算したテロメラーゼについての分子量は、それが1つの120kDaタンパク質サブユニット、1つの43kDaサブユニット、および66kDaの1つのRNAサブユニットより成ると仮定すると、229kDaの合計値となる。これは、カタラーゼの232kDaの分子量とかなり一致する。しかし、沈降係数は分子量、ならびに分子の部分特異的な容量および摩擦係数 (共に、EuplotesテロメラーゼRNPについては知られていない) の関数である。

【0655】

J. 基質の利用性

本実施例では、Euplotesテロメラーゼの基質要件を調べた。DNA末端複製に対する1つの簡単なモデルは、半保存的DNA複製の後、テロメラーゼは二本鎖を延長し、DNA分子を平滑末端とすることを予測する。このモデルの変形において、一本鎖3'末端がヘリカーゼまたはヌクレアーゼによって複製後に作製される。次いで、結合および伸長のために、この3'末端をテロメラーゼによって使用する。

【0656】

テロメラーゼが平滑末端分子を伸長できるか否かを決定するために、モデルヘアピンを、それらの3'末端に位置するテロメリック反復で合成した。これらのプライマー基質をゲル精製し、ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端を標識し、0.4 μ Mで80 で5分間加熱し、次いで、加熱ブロック中でゆっくりと室温まで冷却して、ヘアピンの再生およびヘリックス形成を行った。非変性ゲル上での基質移動度は、二量体と比較して非常に有効なヘアピン形成が存在することを示した。

【0657】

pH7.5の10 mM $MgCl_2$ 、50 mM KGluc、および1 mM DTTを有する20 mM トリス酢酸を含有する10 μ l

10

20

30

40

50

の反応混合物中、未標識125 μ M dGTP、125 μ M dTTP、および0.02 μ M 5'末端標識プライマー（5' 32 P 標識オリゴヌクレオチド基質）を用いてアッセイを行った。これらの混合物を25 で30分間インキュベートした。ホルムアミド負荷緩衝液（すなわち、TBS、ホルムアミド、プロモチモールブルー、およびシアノール、Sambrook, 1989, 前出）を添加することによって反応を停止させた。

【0658】

プライマーをテロメラーゼ無しで（「-」）、5.9fmolのアフィニティー精製テロメラーゼ有り（「+」）、または17.6fmolのアフィニティー精製テロメラーゼ有り（「++」）インキュベートした。このアッセイで使用したアフィニティー精製テロメラーゼを、100kDaの分子量カットオフを有する膜で透析して置換オリゴヌクレオチドを除去した。反応作製物を、36%ホルムアミドを含有する8%のPAGE/尿素ゲルで分離してヘアピンを変性した。この研究で使用したプライマーの配列、ならびにそれらのレーン帰属を表20に示す。

【0659】

【表20】

レーン	プライマー配列 (5' to 3')
1-3	$C_4(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3G_4$
4-6	$C_2(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3G_4$
7-9	$(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3G_4$
10-12	$A_2C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3G_4$
13-15	$C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
16-18	$(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3$
19-21	$A_2C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
22-24	$C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
25-27	$C_2(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
28-30	$(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$

【0660】

ゲルの結果を図31に示す。レーン1～15は4つのG残基で終わるテロメリック反復を有する基質を含有した。レーン16～30は、4つのT残基で終わるテロメリック反復を有する基質を含有した。テロメラーゼRNAテンプレート上の推定の配置を図32に示す。プライマー対は図32（すなわち、それぞれ、パネルAおよびパネルB）に示されるテンプレート中の2つの非常に異なる位置でアニールすると推定された。これは、それらの結合および/または伸長速度に影響を与えるかも知れない。

【0661】

図33は、図31におけるレーン25～30のより弱い露光を示す。図33のより弱い露光を行って、付加されたヌクレオチドおよび伸長産物における中断位置を可視化した。各対における第3のレーンの伸長させた基質のパーセントは、図31の底部で示したようにPhosphorImagerで定量した。

【0662】

これらのヘアピンについての基質効率を、異なる長さの突出を有する二本鎖テロメア様基質と比較した。4つのG残基で終わったモデル基質（図31のレーン1～15参照）は、それ

を平滑末端とした場合には伸長しなかった（レーン 1 ~ 3 参照）。しかし、わずかな伸長が 2 塩基の突出長で観察され；伸長は、突出が少なくとも 4 塩基長である場合には十分となった。テロメラーゼは、4 つの T 残基で終わる二本鎖基質と同様に作用し、6 塩基突出はかなり十分な伸長を要した。図 31 においては、テロメラーゼとは無関係のレーン 10 ~ 15 におけるプライマー下方のかすかなバンドは、プライマー調製におけるより短いオリゴヌクレオチドを表す。

【 0 6 6 3 】

図 33 におけるレーン 25 ~ 30 のより弱い露光は伸長産物のラダーを示し、（Lingner ら, *Genes Develop.*, 8:1984 [1994] によって記載されているように）最も暗いバンドはテンプレートの推定 5' 境界に対応する。テンプレートにおける他の位置に対応する産物の豊富さは、中断および/または解離が、精製テロメラーゼでの転位の部位以外の部位で起こることを示唆した。

10

【 0 6 6 4 】

図 31 に示すように、二本鎖の平滑末端オリゴヌクレオチドは、テロメラーゼに対する基質ではなかった。これらの分子がテロメラーゼに結合するか否かを診断するために、競合実験を行った。本実験では、2nM の配列 (G₄T₄)₂ を有する 5' 末端標識基質、または 6 塩基突出を有するヘアピン基質を 0.125nM テロメラーゼで伸長させた（図 31、レーン 25 ~ 27）。同一の末標識オリゴヌクレオチド基質は、伸長につき標識基質と十分に競合したが、二本鎖平滑末端ヘアピンオリゴヌクレオチドを競合体として使用した場合は、100 倍過剰のヘアピンの存在下においてさえ、活性の低下は観察されなかった。

20

【 0 6 6 5 】

これらの結果は、二本鎖の平滑末端オリゴヌクレオチドは、本実施例で試験した濃度および条件においてテロメラーゼに結合できないことを示した。むしろ、一本鎖 3' 末端が結合には必要である。この 3' 末端はテロメラーゼ RNA テンプレートとの塩基対に対して必要なようである。

【 0 6 6 6 】

K. 123kDa ポリペプチドのクローニング & 配列決定

本実施例では、*Euplotes* テロメラーゼの 123kDa ポリペプチド（すなわち、123kDa タンパク質サブユニット）のクローニングを記載する。本実験では、前記パート D で得られた精製ポリペプチドから得られたペプチド配列にマッチするように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、テロメラーゼ遺伝子の内部フラグメントを PCR により増幅した。当該分野で公知の、そして Calvio ら, *RNA* 1:724-733 [1995] によって記載の nanoES タンデム質量分析方法を用いてポリペプチド配列を決定した。本実施例で使用したオリゴヌクレオチドプライマーは以下の配列を有し、縮重位置は括弧に入れて示す。

30

【 0 6 6 7 】

5' -TCT(G/A)AA(G/A)TA(G/A)TG(T/G/A)GT(G/A/T/C)A(T/G/A)(G/A)TT(G/A)TTCAT-3' および 5' -GCGGATCCATGAA(T/C)CC(A/T)GA(G/A)AA(T/C)CC(A/T)AA(T/C)GT-3'。

【 0 6 6 8 】

50 μl の反応物は 0.2mM dNTP、0.15 μg *E. aediculatus* 染色体 DNA、0.5 μl Taq (Boehringer-Mannheim)、0.8 μg の各プライマー、および 1× 反応緩衝液 (Boehringer-Mannheim) を含有した。反応物でサーモサイクラー (Perkin-Elmer) 中で以下を使用してインキュベートした：95 における 5 分間、続いての 94 での 1 分間、52 での 1 分間、および 72 での 2 分間の 30 サイクル。反応は 72 での 10 分間のインキュベーションによって完了した。

40

【 0 6 6 9 】

ゲノム DNA ライブラリーは、平滑末端 DNA を pCR-Script プラスミドベクターの SmaI 部位にクローニングすることによって染色体 *E. aediculatus* DNA から調製した（図 14）（Stratagene）。このライブラリーは、放射性標識したゲル精製 PCR 産物でのコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。陽性クローンのプラスミド DNA を調製し、そして自動シーケンサー (ABI) の使用により、ジデオキシ方法 (Sanger ら, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5463 [1977]) または手動によって配列決定した。このポリヌクレオチドをコ

50

ードする遺伝子のDNA配列を図13に示す。DNA配列から帰結されるこの配列における停止コドンはヌクレオチド位置101に位置付けられ、そしてオープンリーディングフレーム末端は3193位に位置付けられる。Euplotesの遺伝コードは、「UGA」コドンがシステイン残基をコードする点で、他の生物とは異なる。DNA配列から帰結されるポリヌクレオチドのアミノ酸配列を図14に示し、異常アミノ酸は翻訳の間に挿入され、翻訳後修飾は起こらないと推定される。

【0670】

L. 43kDaポリペプチドのクローニング&配列決定

本実施例では、テロメラーゼの43kDaポリペプチド（すなわち、43kDaタンパク質サブユニット）のクローニングを記載する。本実験では、対応するテロメラーゼ遺伝子の内部フラグメントを、前記パートDで得られた精製ポリペプチドから得られたペプチド配列に適合するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCRによって増幅した。ポリペプチド配列は、当該分野で公知で、Calviora, 前出によって記載されたnanoESタンデム質量分析方法を用いて決定した。本実施例で使用したオリゴヌクレオチドプライマーは、以下の配列を有した。

【0671】

5'-NNNGTNAC(C/T/A)GG(C/T/A)AT(C/T/A)AA(C/T)AA-3'、および5'-(T/G/A)G(T/G/A)GT(C/T)TC(T/C)TG(G/A)TC(G/A)TT(G/A)TA-3'。この配列において「N」は4種のヌクレオチド（すなわち、A、T、GまたはC）のいずれかの存在を示す。

【0672】

PCRはパートKに記載したように行った。

【0673】

ゲノムDNAライブラリーを調製し、パートKに記載したようにスクリーニングした。このポリペプチドをコードする遺伝子のDNA配列を図34に示す。図35に示すように、3つの可能なリーディングフレームをこの配列につき示す。明瞭性のため、アミノ酸配列を、すべての3つのリーディングフレームにおけるヌクレオチド配列の下方に示す。これらのリーディングフレームを「a」、「b」および「c」と命名する。可能な開始コドンは、リーディングフレーム「c」中のヌクレオチド84位でコードされる。コード領域は、リーディングフレーム「b」中の1501位で終わり得る。この図中のアステリクスによって示される初期停止コドンは、ヌクレオチド位置337～350の間の全ての3つのリーディングフレームにおいて起こる。

【0674】

「La - ドメイン」は太字で示す。さらに下流では、3つのフレームは停止コドンによっていずれも中断されないで、タンパク質配列は、異なるリーディングフレームによってコードされるようである。さらに、精製タンパク質からのペプチド配列は全ての3つのフレームにおいてコードされる。従って、この遺伝子は介入配列を含有するようであり、あるいは、RNAが編集される。他の可能性は、リボソームフレームシフティングまたは配列エラーを含む。しかし、La - タンパク質配列に対する相同性は非常に興味深いままである。また、Euplotesにおいては、「UGA」コドンはシステイン残基をコードする。

【0675】

M. アミノ酸および核酸比較

本実施例では、種々の報告された配列および123kDaおよび43kDaテロメラーゼサブユニットポリペプチドの配列の間の比較を行った。

【0676】

i) 123kDaのE. aediculatusテロメラーゼサブユニットとの比較

123kDaのEuplotes. aediculatusポリペプチドのアミノ酸配列を、Tetrahymena thermophila (GenBank受託番号#U25641)の80kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの配列と比較して、それらの類似性を調べた。このタンパク質をコードするGenBankから得られたヌクレオチド配列を図42に示す。GenBankから得られたこのタンパク質のアミノ酸配列を図43に示す。123kDaのE. aediculatusおよび89kDaのT. thermophilaの間の配列比較を図36に

10

20

30

40

50

示す。この図では、*E. aediculatus*配列は上の配列であり、他方、*T. thermophila*配列は下の配列である。観察された同一性は約19%であると決定され、他方、パーセント類似性は約45%であった（この値はいずれのランダムタンパク質配列でも観察されるであろうものと同様である）。図36-39において、同一性は垂直棒線によって示され、他方、配列間の単一のドットは幾分類似のアミノ酸を示し、配列間の二重ドットはより類似のアミノ酸を示す。

【0677】

123kDa *Euplotes aediculatus*ポリペプチドのアミノ酸配列をまた、*Tetrahymena thermophila* (GenBank受託番号#U25642)の95kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの配列と比較して、それらの類似性を調べた。このタンパク質をコードするGenBankから得られたヌクレオチド配列を図44に示す。GenBankから得られたこのタンパク質のアミノ酸配列を図45に示す。この配列比較を図37に示す。この図では、*E. aediculatus*配列は上の配列であり、他方、*T. thermophila*配列は下の配列である。観察された同一性は約20%であると決定され、他方、パーセント類似性は約43%（いずれのランダムタンパク質配列でも観察されるであろうものと同様の値）であった。

10

【0678】

特徴的には、123kDaの*E. aediculatus*ポリペプチドのアミノ酸配列は、逆転写酵素の5モチーフ特徴を含む。この123kDaポリペプチドをまた、種々の逆転写酵素のポリメラーゼドメインと比較した。図40は推定酵母ホモログ（L8543.12またはESTp）と123kDaポリペプチドとのアライメントを示す。GenBankから得られたL8543.12のアミノ酸配列を図46に示す。

20

【0679】

この比較において4つのモチーフ（A、B、CおよびD）が含まれていた。この図40において、高度に保存された残基は、黒色バックグラウンド上の白色文字によって示される。他の配列において保存されている*E. aediculatus*配列の残基を太文字で示し；「h」は疎水性アミノ酸の存在を示す。モチーフのアミノ酸残基の間に位置する数字は配列におけるギャップの長さを示す。例えば、モチーフAおよびBの間に示す「100」はモチーフ間の配列における100アミノ酸ギャップを反映する。

【0680】

前記したように、GenBankサーチは、*E. aediculatus*の123kDaのテロメラーゼサブユニットに対していくらかの相同性を示すアミノ酸配列を含有するかまたはコードする酵母タンパク質（GenBank受託番号#U20618）、および遺伝子L8543.12（Est2）を同定した。両タンパク質は、それらのC-末端領域に逆転写酵素モチーフを含有する；両タンパク質は、逆転写酵素モチーフの外部の領域における類似性を有する；このタンパク質は、同様に塩基性である（*E. aediculatus*では $pI=10.1$ 、および酵母については $pI=10.0$ ）；および両タンパク質は大きい（*E. aediculatus*では123kDaおよび酵母では103kDa）という観察に基づくと、これらの配列はそれらの各テロメラーゼの触媒コアを含む。*E. aediculatus*および酵母としての2つの系統発生的に区別される生物における相同性のこの観察に基づいて、ヒトテロメラーゼは同一の特徴（すなわち、逆転写酵素モチーフ、塩基性である、および大きい[>100kDa]）タンパク質を含有するであろうと考えられた。

30

40

【0681】

ii) 43kDaの*E. aediculatus*テロメラーゼサブユニットとの比較

43kDaの*Euplotes aediculatus*ポリペプチドの「La - ドメイン」のアミノ酸配列を*Tetrahymena thermophila*（前記）の95kDaのテロメラーゼタンパク質サブユニットの配列と比較してそれらの類似性を調べた。この配列比較を図38に示し、他方、*T. thermophila*配列は下の配列である。観察された同一性は約23%であると判断され、他方、パーセント類似性は約46%（任意のランダムタンパク質配列でも観察されるであろうものに類似の値）であった。

【0682】

43kDaの*Euplotes aediculatus*ポリペプチドの「La - ドメイン」のアミノ酸配列を*Tetrahymena*

50

mena thermophila (前記) の80kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの配列と比較してそれらの類似性を調べた。この配列比較を図39に示す。この図においては、E. aediculatus配列は上の配列であり、他方、T. thermophila配列は下の配列である。観察された同一性は約26%であると判断され、他方、パーセント類似性は約49% (いずれのランダムタンパク質配列で観察されるであろうものと類似の値) であった。

【0683】

また、43kDaのE. aediculatusポリペプチドのドメインのアミノ酸配列を、種々の他の生物からのLaタンパク質と比較した。これらの比較を図41に示す。この図においては、高度に保存された残基は黒色バックグラウンド上の白色文字によって示される。他の配列において保存されているE. aediculatus配列の残基は太字で示す。

10

【0684】

N. 別のもう1つの生物におけるテロメラーゼタンパク質サブユニットの同定 本実施例では、前記これまでの実施例で同定された配列を用いて、Oxytricha tallax (E. aediculatusとは非常に区別される関係の繊毛虫) のテロメラーゼタンパク質サブユニットを同定した。プライマーは、逆転写酵素ドメインモチーフを含むE. aediculatusの123kDaのポリペプチドの保存された領域に基づいて選択した。適切なプライマーを合成し、そしてOxytrichaからの全DNAを用いるPCR反応で使用した。OxytrichaのDNAは、当該分野で公知の方法に従って調製した。次いで、PCR産物をクローン化し、そして当該分野で公知の方法を用いて配列決定した。

【0685】

20

プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列は以下の通りであった：

5'-(T/C)A(A/G)AC(T/A/C)AA(G/A)GG(T/A/C)AT(T/C)CC(C/T/A)(C/T)A(G/A)GG-3'および5'-(G/A/T)GT(G/A/T)ATNA(G/A)NA(G/A)(G/A)TA(G/A)TC(G/A)TC-3'。

縮重している位置は括弧に入れて示し、オルタナティブ塩基は括弧内に示す。「N」は4つのヌクレオチドのいずれかを表す。

【0686】

PCR反応において、50 μl 反応物は0.2mM dTNP、0.3 μg Oxytricha trifallax染色体DNA、1 μl Taqポリメラーゼ (Boehringer-Mannheim)、2 マイクロモルの各プライマー、1× 反応緩衝液 (Boehringer-Mannheim) を含有した。以下の条件：95 における5分、次の94 における1分、53 における1分、および72 における1分からなる30サイクル、続いての72 における10分間のインキュベーションで、反応物をサーモサイクラー (Perkin-Elmer) 中でインキュベートした。PCR産物をゲル精製し、ジデオキシ法 (例えば、Sangerら, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467(1977)) によって配列決定した。

30

【0687】

PCR産物の推定されるアミノ酸配列を決定し、そしてE. aediculatusの配列と比較した。図47は、これらの配列のアライメントアラインメントを示し、O. trifallax配列は頂部上列に、E. aediculatus配列は下部列に示す。この図から分かるように、本実施例で同定されたO. trifallaxポリペプチド配列とE. aediculatusポリペプチド配列との間には非常に大きな同性がある。従って、本発明で同定された配列は、他の真核生物における相同性テロメラーゼタンパク質サブユニットの同定で有用である。事実、本発明の開発は、本明細書中に記載のように多数の多様な種において相同性テロメラーゼ配列を同定した。

40

【0688】

O. テトラヒメナ・テロメラーゼ配列の同定

本実施例では、Euplotes配列、およびEST2pとの相同性を共有するThtrahymenaクローンを生成させた。

【0689】

この実験は、保存されたモチーフに向けられた縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCRを利用して、Thtrahymena、Euplotes、およびEST2p配列の間の相同性の領域を同定した。本実施例で用いたPCR方法は、複合体混合物からの稀なDNA配列を特異的に増幅するように設計された新規の方法である。この方法は、PCRクローニング方法で通常に遭遇す

50

る両端部における同一のPCRプライマーを用いるDNA産物（すなわち、単一プライマー産物）の増幅の問題を回避する。これらの単一プライマー産物は望まないバックグラウンドを生じ、そしてしばしば、所望の2つのプライマー産物の増幅および検出を曖昧にし得る。本実施例で使用した方法は2つのプライマー産物につき優先的に選択する。特に、1つのプライマーをビオチン化し、他方はそうしない。数ラウンドのPCR増幅の後、ストレプトアビジン磁性ビーズを用いて産物を精製し、そして熱変性を用いて2つのプライマー産物を特異的に溶出する。この方法は、本実施例に記載の実験以外のセッティングにも使用される。事実、この方法は、5'および3'；RACEのようなクローニング方法、およびPCRにおいて縮重プライマーを使用する任意の方法における予備的工程を含有する、稀なDNA配列を特異的に増幅することが望まれる適用において使用される。

10

【0690】

第1のPCR実行は、当該分野で公知の方法、およびFFYXTE領域に対応する「K231」と命名された配列5'-ビオチン-GCCTATTT(TC)TT(TC)TA(TC)(GATC)(GATC)(GATC)AC(GATC)GA-3'を有する24量体正方向プライマー、およびDDFL(FIL)I領域に対応する「K220」と命名した配列5'-CCAGATAT(GATC)A(TGA)(GATC)A(AG)(AG)AA(AG)TC(AG)TC-3'を有する23量体逆方向プライマーを用いて単離したTetrahymenaテンプレート巨大分子DNAを用いて行った。このPCR反応は、2.5μl DNA(50ng)、4μlの各プライマー(20μM)、3μl 10xPCR緩衝液、3μl 10xdTNP、2μl Mg、0.3μl Taqおよび11.2μl dH₂Oを含有した。混合物を45秒間の94、45秒間の37、および1分間の72の8サイクルで行った。

【0691】

20

このPCR反応物を200μlストレプトアビジン磁性ビーズに結合させ、200μl TEで洗浄し、20μl dH₂Oに再懸濁し、次いで、100で2分間沸騰させることによって熱変性させた。ビーズを引き寄せ、溶出物を取り出した。次いで、⁻³²P dATPの0.3μlを含め、PCRを33サイクル行った以外は、前記条件を用いて2.5μlのこの溶出物を引き続いて再増幅した。この反応を5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動させ、適切な領域をゲルから切り出した。次いで、これらの産物を、42アニーリング温度を用いた以外は前記した条件下でさらに34サイクル再増幅した。

【0692】

第2のPCR実行は、当該分野で公知の方法、ならびに領域R(LI)(LI)PKKに対応する「K228」と命名した配列5'-ACAATG(CA)G(GATC)(TCA)T(GATC)(TCA)T(GATC)CC(GATC)AA(AG)AA-3'を有する23量体正方向プライマー、およびC Y D S I P R領域に対応する「K224」と命名した配列5'-ACGAAT'C(GT)(GATC)GG(TAG)AT(GATC)(GC)(TA)(AG)TC(AG)TA(AG)CA-3'を有する逆方向プライマーを用いて単離したTetrahymena巨大分子DNAテンプレートを用いて行った。このPCR反応は2.5μl DNA(50ng)、4μlの各プライマー(20μM)、3μl 10xPCR緩衝液、3μl 10xdNTP、2μl Mg、0.3μl ⁻³²P dATP、0.3μl Taq、および10.9μl dH₂Oを含有した。この反応を5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動させ、適当な領域をゲルから切り出した。これらの産物を、42アニーリング温度を用いた以外は前記した条件下でさらに34サイクル再増幅した。

30

【0693】

泳動1からの10μlの反応作製物を200μl TE中のストレプトアビジン被覆磁性ビーズに結合させた。ビーズを200μl TEで洗浄し、次いで、20μl dH₂Oに再懸濁し、熱変性し、溶出物を取り出した。次いで、泳動2からの反応作製物をビーズに添加し、30μl 0.5xSSCで希釈した。混合物を94〜50で加熱した。溶出物を取り出し、ビーズを55で0.5xSSC中で3回洗浄した。次いで、ビーズを20μl dH₂Oに再懸濁し、加熱変性し、溶出物を取り出し、「ラウンド1溶出物」と命名し、保存した。

40

【0694】

Tetrahymenaのバンドを単離するために、ラウンド1溶出物を、正方向プライマーK228およびDIKSCYD領域に対応する配列5'-CAATTCTC(AG)TA(AG)CA(GATC)(CG)(TA)(CT)TT(AGT)AT(GA)TC-3'を有する逆方向プライマーK227で再増幅した。PCR反応を前記したように行った。反応作製物を5%ポリアクリルアミドゲルで泳動させ；約295ヌクレオチドに対応する

50

バンドをゲルから取り出し、配列決定した。

【 0 6 9 5 】

168-3と命名したクローンを配列決定した。(プライマー配列を含めた) DNA配列は以下のように見い出された:

【 0 6 9 6 】

【 化 3 】

GATTACTCCCGAAGAAAGGATCTTTCCGTCCTCAATCATGACTTTCTTAAGAAA
GGACAAGCAAAAAAATATTAAGTTAAATCTAAATTAAATTCTAATGGATAG
CCAACCTTGTGTTTAGGAATTTAAAAGACATGCTGGGATAAAAGATAGGATA
CTCAGTCTTTGATAATAAACAAATTTTCAGAAAAATTTGCCTAATTCATAGAG
AAATGGAAAAATAAAGGAAGACCTCAGCTATATTATGTCACTCTAGACATA
AAGACTTGCTAC.

10

【 0 6 9 7 】

この遺伝子のさらなる配列は、配列5'-GAGTGACATAATATACGTGA-3'を有する168-3(「K297」)からの配列; およびK231(FFYXTE)プライマーに適合するように設計した1つの独特なプライマーを用いるPCRによって得られた。168-3と共に、この反応で得られたフラグメントの配列は以下の通りである(プライマー配列無し):

20

【 0 6 9 8 】

【 化 4 】

AAACACAAGGAAGGAAGTCAAATATTCTATTACCGTAAACCAATATGGAA
ATTAGTGAGTAAATTAAGTATTGTCAAAGTAAGAATTTAGTTTTCTGAAAAG
AATAAATAAATGAAAAATAATTTTTATCAAAAAATTTAGCTTGAAGAGGAG
AATTTGGAAAAAGTTGAAGAAAAATTGATACCAGAAGATTCATTTTAGAAA
TACCCTCAAGGAAGCTAAGGATTATACCTAAAAAAGGATCTTTCCGTCCTCA
ATCATGACTTTCTTAAGAAAGGACAAGCAAAAAAATATTAAGTTAAATCTA
AATTAAATTCTAATGGATAGCCAACTTGTGTTTAGGAATTTAAAAGACATG
CTGGGATAAAAGATAGGATACTCAGTCTTTGATAATAAACAAATTTTCAGAA
AAATTTGCCTAATTCATAGAGAAATGGAAAAATAAAGGAAGACCTCAGCTA
TATTATGTCACTCTA.

30

【 0 6 9 9 】

このDNAフラグメントに対応するアミノ酸配列は以下のように見い出された:

40

【 0 7 0 0 】

【 化 5 】

KHKEGSQIFYRKPIWKLVSKLTIVKVRIQFSEKNKQMKNNFYQKIQLEENLE
KVEEKLIPEDSFQKYPQGKLRIPKKGSRPIMTFLRKDKQKNIKLNLNQILMDS
QLVFRNLKDMLGQKIGYSVFDNKQISEKFAQFIEKWKNKGRPQLYYVTL.

【 0 7 0 1 】

次いで、アミノ酸配列を他のテロメラーゼ遺伝子(EST2p、およびEuplotes)とアライン

50

メントさせた。このアラインメントを図53に示す。コンセンサス配列もこの図に示す。

【0702】

P. Schizosaccharomyces pombe テロメラーゼ配列の同定

本実施例において、S. pombe の tez1 配列は、E. aediculatus p123、および S. cerevisiae Est2p のホモログとして同定された。

【0703】

図55はこれらの実験の総じての要約を提供する。この図において、頂部（パネルA）は2つの重複するゲノムクローンの関係および配列決定した5825bpの部分を示す。「tez1⁺」と命名した領域は、同様に示すフランキング配列をとまなう、タンパク質コード領域であり、5825bp領域の下の方角は、下記のように tez1 破壊構築物を作製するのに使用した約2kbのHindIIIフラグメントである。

【0704】

図55の底部半分（パネルB）はDNAのこの同一領域の「クローズアップ」模式図である。「オリジナルPCR」と命名した配列は、記載するように、Euplotes 配列モチーフ4（B'）およびモチーフ5（C）に基づいて設計した縮重オリゴヌクレオチドプライマー対で生じさせたオリジナルの縮重PCRフラグメントである。

【0705】

i) 縮重プライマーでのPCR

縮重プライマーを用いるPCRを用いて、S. pombe における E. aediculatus p123 のホモログを見出した。図56は、この反応で使った縮重プライマー（「ポリ4」および「ポリ1」と命名した）の配列を示す。PCR反応(run)は、94℃における5分間のランブ時間、続いての30秒間の94℃、45秒間の50℃、および30秒間の72℃の30サイクル、ならびに72℃の7分間で、先の実施例（例えば、前記パートKを参照のこと）に記載したのと同じの緩衝液を用いて行い、続いて4℃で貯蔵した。PCR反応を、変化する条件（すなわち、種々のS. pombe DNAの濃度およびMgCl₂濃度）を用いて行った。PCR産物をアガロースゲルで泳動し、そして前記したようにエチジウムブロミドで染色した。いくつかのPCR反応の結果、3つのバンドの生成を生じた（「T」、「M」および「B」と命名した）。前記したのと同じの条件を用い、これらのバンドを再増幅し、そしてゲルで泳動した。図57に示すように、4つのバンドがこの再増幅の後に観察された（「T」、「M1」、「M2」および「B」）。次いで、これらの4つのバンドを、前記したのと同じ条件を用いて再増幅した。図57におけるレーンの頂部から第3のバンドは、テロメラーゼタンパク質についての正しい配列を含有するものとして同定された。M2と命名したPCR産物は、図58に示すように、他のテロメラーゼタンパク質との合理的なマッチを示すことが見いだされた。示したアラインメントに加えて、この図も tez1 の実際の配列を示す。この図において、アスタリスクはすべての4つの配列で共有された残基を示す（Oxytricha 「Ot」；E. aediculatus 「Ea_p123」；S. cerevisiae 「Sc_p103」；およびM2）、他方、丸（すなわち、ドット）は類似のアミノ酸残基を示す。

【0706】

ii) 3' RT PCR

さらなる配列情報を得るために、3'および5' RT PCRを、図58に同定されるテロメラーゼ候補に対して行った。図59は使用した3' RT PCR戦略の模式図を提供する。まず、オリゴヌクレオチドプライマー「Q_T」（5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TT-3'）を用いて mRNA から cDNA を調製し、次いでこの cDNA を「Q₀」（5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG-3'）、およびオリジナルの縮重PCR反応に基づいて設計されたプライマー（すなわち、配列5'-G TGT CAT TTC TAT ATG GAA GAT TTG ATT GAT G-3'を有する「M2-T」）にてのPCR用のテンプレートとして用いた。「Q₁」（5'-GAG GAC TCG AGC TCA AGC-3'）、およびオリジナル縮重PCR反応に由来する配列を用いて設計した別のPCRプライマーまたは「M2-T2」（5'-AC CTA TCG TTT ACG AAA AAG AAA GGA TCA GTG-3'）にての第2のPCR反応（すなわち、ネステッド(nested)PCR）。このPCRで使った緩衝液は前記したのと同じであり、5分間の94℃のランブアップで開始し、続いての30秒間の94℃、30秒間の55℃、

10

20

30

40

50

および3分間の72 の30サイクル、続いての72 の7分間にて増幅を行った。反応産物は使用するまで4 で保存した。

【0707】

iii) ゲノムライブラリーおよびcDNAライブラリーのスクリーニング

このさらなる配列情報を得た後、いくつかのゲノムライブラリーおよびcDNAライブラリーをスクリーニングして、このテロメラーゼ候補遺伝子を含有するすべてのライブラリーを同定した。使用したアプローチ、ならびにライブラリーおよび結果を、図60に示す。この図において、パネルAはこの実験で試験したライブラリーを列挙し；パネルBは使用した領域を示し；パネルCおよびDはこれらのライブラリーで得られたドットプロットハイブリダイゼーションの結果を示す。次いで、コロニーハイブリダイゼーションによって陽性ライブラリーをスクリーニングして、tez1遺伝子のゲノムおよびcDNAバージョンを得た。本実験において、HindIIIゲノムライブラリーからの約 3×10^4 コロニーをスクリーニングし、そして6つの陽性クローンを同定した（約0.01%）。次いで、DNAを2つの独立したクローン（A5およびB2）から調製した。図61は、HindIII消化したA5およびB2陽性ゲノムクローンで得られた結果を示す。

【0708】

さらに、cDNA REPライブラリーを使用した。約 3×10^5 コロニーをスクリーニングし、そして5つの陽性クローンを同定した（0.002%）。3つの独立したクローン（2-3、4-1、および5-20）からDNAを調製した。後の実験において、クローン2-3および5-20は同一のインサートを含むと判断された。

【0709】

iv) 5'RT PCR

この時点までに生成された遺伝子のcDNAバージョンは完全ではなかったので、5'RT-PCRを行って全長クローンを得た。戦略を模式的に図62で示す。この実験において、以前に同定したtez1の既知領域から設計したDNAオリゴヌクレオチドプライマー「M2-B」（5'-CAC TGA TCC TTT CTT TTT CGT AAA CGA TAG GT-3'）および「M2-B2」（5'-C ATC AAT CAA ATC TTC CAT ATA GAA ATG ACA-3'）を用いてcDNAを調製した。次いで、リン酸化5'末端（「P」）を有するオリゴヌクレオチドリンカーPCR Adapt SfiI（P-GGG CCG TGT TGG CCT AGT TCT C TG CTC-3'）を、このcDNAの3'末端にて連結し、そしてこの構築物をネステッドPCR用のテンプレートとして使用した。PCRの最初のラウンドにおいて、PCR Adapt SfiIおよびM2-Bをプライマーとして使用し；他方、PCR Adapt SfiII（5'-GAG GAG GAG AAG AGC AGA GAA CTA GGC CAA CAC GCC CC-3'）、およびM2-B2を第2ラウンドにおけるプライマーとして使用した。ネステッドPCRを使用して反応の特異性を増大させた。

【0710】

v) 配列アラインメント

一旦tez1の配列を同定したら、それを以前に記載された配列と比較した。図63はS. pombe（「S.p. Tez1p」）、S. cerevisiae（「S.c. Est2p」）およびE. aediculatus p123（「E.a. p123」）のテロメラーゼ触媒サブユニットからのRTドメインのアラインメントを示す。この図において、「h」は疎水性残基を示し、他方、「p」は小極性残基を示し、そして「c」は荷電残基を示す。アラインメントの上に示したアミノ酸残基は、Y. XiongおよびT.H. Eickbushの既知コンセンサスRTモチーフを示す（Y. XiongおよびT. H. Eickbush, EMBO J., 9: 3353-3362 [1990]）。アステリスクは全ての3つのタンパク質で保存された残基を示す。「モチーフ0」が、本明細書および図63において、このテロメラーゼサブユニットに対して特異的であり、そして一般に逆転写酵素では見出されないモチーフとして同定される。従って、それは、テロメラーゼ触媒サブユニットとしての他のアミノ酸配列を同定するにおいて価値がある。

【0711】

図64は、Euplotes（「Ea_p123」、S. cerevisiae（「Sc_Est2p」）、およびS. pombe（「Sp_Tez1p」）からの全体の配列のアラインメントを示す。パネルAにおいて、陰影を施した領域は2つの配列の間で共有される残基を示す。パネルBにおいて、陰影を施した領域

10

20

30

40

50

は全ての3つの配列の間で共有された残基を示す。

【0712】

vi) *tez1*の遺伝子破壊

本実施例では、*tez1*の破壊の効果を調べた。テロメラーゼはテロメア維持に関与するので、もし*tez1*が実際にテロメラーゼ成分であれば、*tez1*の破壊は徐々にテロメアの短縮化を引き起こすであろうと仮定した。

【0713】

これらの実験において、相同組換えを用いて、*S. pombe*における*tez1*遺伝子の特異的に破壊した。このアプローチを図65に模式的に示す。図65に示すように、野生型*tez1*を、*ura4*またはLEU2マーカ含有するフラグメントで置き換えた。

10

【0714】

*tez1*遺伝子の破壊をPCRによって確認し(図66)、そしてサザンブロットを行って、テロメア長につきチェックした。図67はこの実験についてのサザンブロットの結果を示す。Apal制限酵素部位が*S. pombe*におけるテロメア配列に直ぐに隣接して存在するので、*S. pombe*ゲノムDNA調製物のApal消化はテロメア長の分析を可能とする。従って、*S. pombe*からのDNAをApalで消化し、そして消化産物をアガロースゲルで泳動し、そしてテロメア配列特異的プローブでプローブして、破壊した*S. pombe*細胞のテロメアが短縮化されたか否かを判断した。結果を図67に示す。これらの結果から、*tez1*遺伝子の破壊がテロメアの短縮化を引き起こしたことが明らかである。

【0715】

20

Q. ヒトテロメラーゼタンパク質およびcDNAのクローニングおよび特徴付け 本実施例では、ヒトテロメラーゼについての核酸およびアミノ酸配列情報を決定した。Euplotes 123 kDaペプチドおよび核酸配列、ならびにSchizosaccharomycesタンパク質および対応するcDNA(*tez1*)配列を用いて行ったBLASTサーチにおいて、部分相同配列をまず同定した。ヒト配列(「hTCP1.1」ともいう)を部分cDNAクローン(クローン712562)から同定した。このクローンからの配列を先の実施例に記載したように決定した配列とアラインメントした。

【0716】

図1は、Euplotes(「p123」)、Schizosaccharomyces(「*tez1*」)、Est2p(すなわち、Est2核酸配列によってコードされ、本明細書において「L8543.12」ともいう*S. cerevisiae*タンパク質)、およびこの比較サーチで同定されたヒトホモログの配列アラインメントを示す。図51は*tez1*のアミノ酸配列を示し、他方、図52は*tez1*のDNA配列を示す。図52において、イントロンおよび他の非コード領域を小文字で示し、他方、エキソン(すなわち、コード領域)を大文字で示す。

30

【0717】

図に示すように、これらのタンパク質の間で高度に保存された領域がある。例えば、図1に示すように、「モチーフ0」、「モチーフ1」、「モチーフ2」および「モチーフ3」における同一性の領域がある。同一のアミノ酸はアステリスク(*)で示し、他方、類似のアミノ酸残基は丸()で示す。このことは、酵母から繊毛虫からヒトまでの範囲にわたり、広範な真核生物の間で保存された領域がテロメラーゼモチーフ内にあることを示す。さらなる生物は同様に配列のこのような保存された領域を含むと考えられる。図49はヒトテロメラーゼモチーフの部分的アミノ酸配列を示し、他方、図50は対応するDNA配列を示す。

40

【0718】

当該分野で公知の、Sangerのジデオキシ配列決定およびその他の方法を用いて、クローン712562の完全な配列情報を得た。配列決定で使ったプライマーのいくつかを表7に示す。これらのプライマーを、プラスミド骨格配列またはクローン中のヒトcDNAインサートの配列のいずれかに相補的な配列に基づいて、クローンにハイブリダイズするように設計した。

【0719】

【表21】

50

プライマー

プライマー	配列
TCP1.1	GTGAAGGCACTGTTTCAGCG
TCP1.2	GTGGATGATTTCTTGTGG
TCP1.3	ATGCTCCTGCGTTTGGTGG
TCP1.4	CTGGACACTCAGCCCTTGG
TCP1.5	GGCAGGTGTGCTGGACACT
TCP1.6	TTTGATGATGCTGGCGATG
TCP1.7	GGGGCTCGTCTTCTACAGG
TCP1.8	CAGCAGGAGGATCTTGTAG
TCP1.9	TGACCCCAGGAGTGGCACG
TCP1.10	TCAAGCTGACTCGACACCG
TCP1.11	CGGCGTGACAGGGCTGC
TCP1.12	GCTGAAGGCTGAGTGTCC
TCP1.13	TAGTCCATGTTTACAATCG

10

20

【0720】

これらの実験より、クローン712562のEcoRI-NotIインサートは、ヒトテロメラーゼタンパク質についての部分的オープンリーディングフレームのみを含有するが、そのタンパク質の活性フラグメントをコードし得ると判断された。このクローンにおけるオープンリーディングフレームは約63kDのタンパク質をコードする。同定された最長オープンリーディングフレームの配列を図68に示す。ORFは図に示した「met」にてのATGコドンで始まる。配列の3'末端におけるポリAテールも示す。図69はヒト配列（ヒトテロメラーゼコアタンパク質1、「Hs TCP1」）、*E. aediculatus* p123（「Ep p123」）、*S. pombe* tezl（「Sp Tezl」）、*S. cerevisiae* EST2（Sc Est2）、およびコンセンサス配列からのテロメラーゼ逆転写酵素タンパク質の仮の予備的アラインメントを示す。この図では、種々のモチーフが示される。

30

【0721】

全長クローンを得るために、cDNAライブラリーのプロービングおよび5'-RACEを用いて、以前にクローン化されなかった領域の部分のコードするクローンを得た。これらの実験において、RACE（cDNA末端の迅速増幅；例えば、M. A. Frohman, 「RACE: cDNA末端の迅速増幅」, Innisら（編）, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [1990], 28-38頁；およびFrohmanら, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8998-9002 [1988]）を用いて、配列分析用の材料を生成させた。4つのこのようなクローンを生成させ、そしてこれを用いてさらなる5'配列情報を提供した（pFWRP5、6、19および20）。

40

【0722】

さらに、ヒトcDNAライブラリー（へ挿入された）をクローンのEcoRI-NotIフラグメントでプローブした。「25-1.1」と命名した1つのクローン（ATCC受託番号#209024）は相補的配列を有するものとして同定された。図75は、このクローンの制限地図を示す。このクローンからのヒトcDNAインサートを、市販のファージミドpBluescript IISK+（Stratagene）のEcoRI部位へEcoRI制限フラグメントとしてサブクローン化して、プラスミド「pGR

50

N121」を作製し、これをATCCに寄託した(ATCC受託番号#209016)。予備的結果は、プラスミドpGRN121はヒトテロメラーゼタンパク質をコードする全体のオープンリーディングフレーム(ORF)を含有することを示した。

【0723】

当該分野で公知の技術を用い、プラスミドpGRN121のcDNAインサートを配列決定した。図70は、この予備的作業に基づいて同定されたプラスミドpGRN121の制限部位および機能地図を提供する。この予備的配列分析の結果を図71に示す。この分析から、および図70に示すように、コード領域についての推定開始部位は、EcoRI部位(707位に位置する)から約50ヌクレオチドにて同定され、そしてヌクレオチド#3571における推定終止部位に加えて、テロメラーゼ - 特異的モチーフ「FFYVTE」、「PKP」、「AYD」、「QG」および「DD」の位置が同定された(図72を参照のこと、これは、DNAおよび配列中のオープンリーディングフレーム(「a」、「b」および「c」)に対応するアミノ酸配列を示す)。しかし、初期の配列決定作業の予備的性質のため、種々のモチーフについてのリーディングフレームはアラインメントにおいては見出されなかった。

【0724】

pGRN121に対して行ったさらなる分析は、このプラスミドが、クローン712562に存在しないコード配列の5'末端からの有意な部分を含有したことを示した。さらに、pGRN121は、約182ヌクレオチドのインサートを含む変異体コード配列を含有することが判明した。このインサートはこのクローンには存在しないことが判明した。E. aediculatus配列に関しては、このような変異体は、テロメラーゼアッセイのような機能的アッセイにおいて試験して、試料中の機能的テロメラーゼの存在を検出し得る。

【0725】

さらなる配列分析は、pGRN121のcDNA配列を解明して、図74に示すように約127,000ダルトンの分子量、および1132アミノ酸の部分にコードする連続したオープンリーディングフレームを提供した。この分析に基づくpGRN121の洗練された地図を図73に提供する。hTERT cDNAのさらなる配列分析の結果を図16に示す(配列番号1)。

【0726】

実施例2

hTERTの豊富さと細胞不死性との相関

hTERT mRNAの相対的豊富さを、6つのテロメラーゼ陰性の有寿命細胞株および6つのテロメラーゼ陽性不死細胞株において評価した(図5)。hTERT mRNAの定常状態レベルは、以前に活性テロメラーゼを有することが示されている不死細胞株において有意に増加した。より低レベルのhTERT mRNAが、いくつかのテロメラーゼ陰性細胞株において検出された。

【0727】

hTERT、hTR、TP1(Tetrahymena p80に関連するテロメラーゼ会合タンパク質[Harringtonら, 1997, Science 275:973; Nakayamaら, 1997, Cell 88:875])および(RNAテンプレートの同等量について標準化するための)GAPDHについてのRT-PCRを以下の細胞に由来するRNAに対して行った:(1)ヒト胎児肺線維芽細胞GFL、(2)ヒト胎児皮膚線維芽細胞GFS、(3)成人前立腺線維芽細胞31Y0、(4)ヒト胎児膝滑膜線維芽細胞HFS、(5)新生児包皮線維芽細胞BJ、(6)ヒト胎児肺線維芽細胞IMR90、および不死化細胞株;(7)メラノーマLOX IMVI、(8)白血病U251、(9)NCI H23肺ガン、(10)結腸腺ガンSW620、(11)乳腫瘍MCF7、(12)293アデノウイルスE1形質転換ヒト胚腎臓細胞株。

【0728】

合計31サイクルの間(94 45秒間、60 45秒間、72 90秒間)、オリゴヌクレオチドプライマーLT5およびLT6(表2~6)を用い、hTERT核酸をcDNAから増幅した。合計16サイクル(94 45秒間、55 45秒間、72 90秒間)の間、プライマーKI36(5'-CTCAGACACCATGGGGAGGTGA)およびK137(5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA)を用い、GAPDHを増幅した。合計22サイクルの間(94 45秒間、55 45秒間、72 90秒間)、プライマーF3b(5'-TCTAACCTAACTGAAGGGCGTAG)およびR3c(5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGAAG)を用い、hTRを増幅した。28サイクル(hTERTと同じサイクル)の間、プライマーTP1.1およびTP1.2を用い、TP1 mRNAを増

幅した。反応産物を8%ポリアクリルアミドゲルで分離し、SYBR Green (Molecular Probes)で染色し、そしてStrom860 (Molecular Dynamics)でスキャニングすることによって可視化した。図5に示す結果は、hTERT mRNAレベルは試験した細胞におけるテロメラーゼ活性と直接的に相関することを示す。

【0729】

実施例3

hTERTイントロン配列の特徴付け

まず、本実施例に記載したように、ヒトゲノムDNAのPCR増幅によって推定イントロンを同定し、引き続いて、ゲノムクローン G 5を配列決定することによって確認した(実施例4を参照のこと)。逆方向プライマーTCP1.46、TCP1.48、TCP1.50、TCP1.52、TCP1.54、TCP1.56、およびTCP1.58(表2~6を参照のこと)と個々に対とした正方向プライマーTCP1.57を用い、PCR増幅を行った。TCP1.57/TCP1.46、TCP1.48、TCP1.50、TCP1.52、TCP1.54またはTCP1.56増幅のゲノムDNAからの産物は、pGRN121増幅の産物よりも約100塩基対大きかった。TCP1.57/TCP1.58増幅は、ゲノムDNAまたはpGRN121 DNAのいずれについても同一であった。このことは、ゲノムDNAがTCP1.58およびTCP1.50についての部位の間に挿入を含有したことを示した。TCP1.57/TCP1.50およびTCP1.57/TCP1.52のPCR産物を、プライマーTCP1.39、TCP1.57、およびTCP1.49を用い、サブクローニングすることなく、直接配列決定した。

【0730】

以下で示すように、104塩基のイントロン配列(配列番号7)が、図16の塩基274および275に対応する部位において、hTERT mRNAに挿入される(太字で示す)。

【0731】

【化6】

```
CCCCCGCCGCCCTCCTTCCGCCAG/GTGGGCCTCCCCGGGGTCGGCG
TCCGGCTGGGGTTGAGGGCGGCCGGGGGAACCAGCGACATGCGGAGAGC
AGCGCAGGCGACTCAGGGCGCTTCCCCCGCAG/GTGTCCTGCCTGAAGGA
GCTGGTGGCCCGAGTGCTGCAG
```

【0732】

「/」は、スプライス部位を示す;配列はヒトイントロンに典型的なコンセンサス5'および3'スプライス部位配列に対して良好なマッチを示す。

【0733】

このイントロンは、トポイソメラーゼII切断部位およびNF B結合部位に特徴的なモチーフを含有する(図21を参照のこと)。部分的には、トポイソメラーゼIIの発現はほとんどの腫瘍においてアップレギュレートされるので、これらのモチーフは興味深い。それは、DNAを切断し、巻き戻し、従って、特定の遺伝子の発現を増大させることによって、DNAを弛緩させるように機能する。トポイソメラーゼIIのインヒビターは抗腫瘍剤として作用することが示されている。NF Bの場合には、この転写因子は、発生の間のテロメラーゼの初期抑制におけるような、末端分化の間にテロメラーゼの調節において役割を果たし得、従って、細胞においてテロメラーゼ活性を調節する処置的介入のための別の標的である。

【0734】

実施例4

ファージ G 5のクローニングおよびhTERTゲノム配列の特徴付け

A . G 5

PCRおよびハイブリダイゼーションによってヒトゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして、hTERT RNAコード配列を含有するゲノムクローンを同定した。ライブラリーはWI38肺

10

20

30

40

50

線維芽細胞からのDNAを用いて作製したヒト線維芽細胞ゲノムライブラリーであった (Stratagene, カタログ番号946204)。このライブラリーにおいて、部分的Sau3AIフラグメントをLambda FIX(登録商標)RIIベクター (Stratagene) のXhoI部位に、9~22kbのインサートサイズを有して連結した。

【0735】

ゲノムライブラリーを各150,000ファージのプールに分割し、そして各プールをネステッドPCR (外側プライマー対TCP1.52およびTCP1.57; 内側対TCP1.49およびTCP1.50、表1を参照のこと) によってスクリーニングした。これらのプライマー対は、hTERTのゲノムDNAにおける推定イントロン (実施例3、上記を参照のこと) にわたり、そしてPCR産物がhTERT cDNAクローンによる混入からではなくゲノム供給源由来であることを確認した。陽性プールをさらに、2000ファージのプールが得られるまで細分化した。このプールを低密度でプレティングし、そして図16の塩基対1552~2108 (それぞれ、制限部位SphIおよびEcoRV) を含むDNAフラグメントとのハイブリダイゼーションを介してスクリーニングした。

【0736】

2つの陽性クローンを単離し、前記したようにネステッドPCRを介して再度スクリーニングし; 両クローンはPCRにより陽性であった。クローンの1つ (G 5) をNotIで消化し、約20kbのインサートサイズが明らかとなった。引き続いてのマッピング (下記を参照のこと) は、インサートサイズが15kbであること、およびファージG 5がcDNA配列の開始部位の上流約13kbのDNAを含有することを示した。

【0737】

ファージG 5を、制限酵素消化およびDNA配列決定によってマップした。得られたマップを図7に示す。ファージDNAをNcoIで消化し、そしてフラグメントをpBBS167にクローン化した。得られたサブクローンをPCRによってスクリーニングして、hTERT cDNAの5'領域に対応する配列を含有するものを同定した。(hTERT遺伝子配列および4~5kbのベクター配列を有する) 9kb NcoIフラグメントを含むサブクローン (pGRN140) を部分的に配列決定して、インサートの方向を決定した。SalIを用いてpGRN140を消化して、ベクター配列を除去して、pGRN144を得た。次いで、pGRN144を配列決定した。配列決定の結果を図21に提供する。hTERT mRNAの5'末端は図21の塩基2441に対応する。図7に示すように、2つのAlu配列エレメントがhTERT cDNAの5'末端の1700塩基対上流に位置し、そしてhTERTのプロモーター領域に対してそれらしい上流限界を提供する。この配列はまた、実施例3 (上記) に記載したイントロンの3'側に、図21における塩基4173に位置するイントロンを明らかとした。

【0738】

B. さらなるゲノムクローン

前記したゲノムクローンに加えて、2つのP1バクテリオファージクローンおよび1つのヒトBACクローンが本発明の例示的实施態様として提供される。P1インサートは、通常、75~100kbであって、BACインサートは、通常、100 Kbを超える。

【0739】

P1クローン (DMPC-HFF#1-477(F6)-GS#15371およびDMPC-HEF#1-1103(H6)-GS#15372) を、hTERTの3'末端を増幅するプライマーTCP1.12およびUTR2を用い、ヒト包皮線維芽細胞 (Shepherdら, 1994, PNAS USA 91:2629) に由来するヒトP1ライブラリーのPCRスクリーニングによって得た。これらのクローンの両方は、hTERTの5'末端を増幅するプライマーで、陰性 (増幅されない) であった。

【0740】

ヒトBACクローン (326E20) は、RTモチーフ領域を含むpGRN121 (図16; 塩基1552~2695) の1143 bp SphI/XmnIフラグメントを用い、BACヒトゲノムライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングで得た。このクローンは遺伝子の5'末端を含むと考えられている。本実施例におけるhTERTゲノムクローンは全体のhTERT遺伝子を含むと考えられる。

【0741】

実施例 5

hTERT遺伝子の染色体位置

10

20

30

40

50

hTERT遺伝子は、全ヒトゲノム (Stanford Human Genome Centerで作製された)の83RHクローンの中解像度 (medium resolution)Stanford G3パネルを用い、照射 (radiation)ハイブリッドマッピング (Boehnkeら, 1991, Am J Hum Genet 49:1174; Walterら, 1994, Nature Genet 7:22)によって、染色体5pに位置付けられた。ヒトリンパ芽球様細胞株 (ドナー: rM) を10,000ラドのX線に暴露し、次いで、非照射ハムスターレシピエント細胞 (A3) と融合させた。83の独立した体細胞ハイブリッドクローンを単離し、そしてそれぞれは照射ドナー細胞とレシピエントハムスター細胞との間の融合事象を表す。G3 DNAのパネルを、目的の領域においてマーカーを順序付けるため、ならびにこれらのマーカー間の距離を確立するために使用した。

【0742】

10

RHマッピングで使用したプラスマーは、Boehringer Mannheim Taq緩衝液およびPerkin-Elmer Taqを用いる94 45秒間、55 45秒間、72 45秒間の45サイクルの増幅条件でのTCP1.12およびUTR2であった。83プールの独立して増幅し、そして14(17%)が (346bpバンドの出現によって) hTERTについて陽性であると評価した。増幅結果をStanford RHサーバーに提出し、次いで、これはマップ位置5pおよび最も密接なマーカーSTS D5S678を提供した。

【0743】

Genethonゲノムマッピングウェブサイトを問うことによって、マップ位置は、STSマーカーD5S678:CEPH YAC 780_C_3サイズ: 390,660kbを含有するYACを同定した。このYACはまた、染色体17マーカー含有した。この結果は、hTERT遺伝子は染色体5上のテロメア末端近くにあることを示した。多数の腫瘍において5pのコピー数が増大した。猫鳴き症候群もまた、この領域における欠失に対してマップされている。

20

【0744】

実施例 6

hTERTタンパク質およびポリヌクレオチドの発現用ベクターの設計および構築

細菌におけるhTERTの発現

本実施例の以下の部分は、大量の全長の生物学的活性hTERTを生成させるためのhTERT発現細菌および真核生物細胞の発現ベクターの設計を詳細に記載する。この方法での生物学的に活性なhTERTタンパク質の生成は、いくつかの例として、テロメラーゼ再構築アッセイ、テロメラーゼ活性モジュレーターのアッセイ、hTERTの新しく単離された種の活性の分析、hTERTと特異的に会合する化合物の同定および単離、部位特異的に変異したhTERT変異型タンパク質の活性の分析に、および免疫原として有用である。

30

【0745】

pThioHis A/h TERT細菌発現ベクター

大量の全長hTERTを生成させるために、細菌発現ベクターpThioHis A (Invitrogen, San Diego, CA)を発現系として選択した。hTERT - コーディングインサートは、プラスミドpGRN121におけるhTERTインサートのヌクレオチド707~4776を含む。このヌクレオチド配列は、hTERTタンパク質の完全なコード配列を含む。

【0746】

本発明のこの発現ベクターは、細菌における誘導性発現のために設計される。このベクターを誘導して、E. coliにおいて、切断可能なHISタグしたチオレドキシシン部分および全長hTERTタンパク質よりなる高レベルの融合タンパク質を発現させ得る。この発現系の使用は、製造業者の説明書に実質的に従った。本発明の得られたベクターによってコードされる融合タンパク質のアミノ酸配列を以下に示す; (-*-)はエンテロキナーゼ切断部位を示す。

40

【0747】

【化7】

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAHWCGPCKMIAPILDEIADXYQGKLTVAK
 LRIDHNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDD
 DDK--*VPMHELEIFEFAAASTQRCVLLRTWEALAPATPAMPAPRCRAVRSLLRSHY
 REVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDFAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSC
 LKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPFAFTTSVRSYLPNTVTVDALRGS
 GAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASG
 PRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTP
 VGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPP
 STSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFYSSGDKQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFL
 GSRPWPMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAG
 VCAREKPGQSVAAPPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRH
 NERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRSPGVGCVPAAEHRLREEI
 LAKFLHFLMSVTVVELLRSSFFVYTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQL
 RELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTS
 RVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVT
 GAYDTIPQDRLTEVIASIIKQPNTYCVRRYAVVQXAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPY
 MRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQG
 IPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTL
 RGVPEYGCVVNLRKTVVNFVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDY
 SSYARTSIRASLTFRNGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKI
 LLLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAA
 GPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAAN
 PALPSDFKTILD

10

20

30

【 0 7 4 8 】

pGRN121のhTRTヌクレオチド3272～4177を有するpGEX-2TK

本発明のこの構築物を用いて、例えば、hTRTタンパク質に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生させる目的で、融合タンパク質を生成させる。hTRTのフラグメントはまた、例えば、ドミナントネガティブ変異体としてテロメラーゼ活性を調節するか、あるいはテロメラーゼ成分と他のタンパク質または核酸との会合を防げるような、他の目的のために使用され得る。

40

【 0 7 4 9 】

大量のhTRTタンパク質フラグメントを生成させるために、E. coli発現ベクターpGEX-2TK (Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.)を選択し、そして製造業者の説明書に本質的に従って用いて、本発明の発現ベクターを作製した。得られた構築物はプラスミドpGRN121におけるhTRTインサートのヌクレオチド3272から4177に由来するインサートを含有する。このベクターは、下記に示すように、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ配列（下方に下線）、トロンピン切断配列（二重下線）、心筋タンパク質キナーゼの認識配列（イタリック体）、括弧中のクローニングによって導入された残基（[GSVTK]）およびhTRTタンパク質フラグメント（太字）よりなる高レベルの融合タンパク質のE. coliにおける発現を指向する。

50

【 0 7 5 0 】

【 化 8 】

MSPIILGYWKIKGLVQPTRILLEYLLEKVEEHLVERDEGDKWENKKFELGLEEPNLPVY
IDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKER&EISW&EGAVLDIRVGVSRIDVSKDFF
TLKVDLSEKLEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMLYQALDVVLVMDPMCLDAPP
KLVCEKKRIEALPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATEGGGDHPPKSDLVPRGSRASV[
GSVTK] IPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKT
FLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRL
EVQSDYSSYARTSIRASVTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQVNSLQTV
TNIYKILLLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSL
GARGAAGPLPSEAVQWLCEQAFLLKLTREHRTYVPLLGSLRRTAQTLQSRKLPGTTLTA
LEAANPALPSDFKTILD

10

【 0 7 5 1 】

この融合タンパク質を発現させると、それは不溶性凝集物を形成した。それを、封入体からのタンパク質の精製と題した節において前記したように一般的に処理した。具体的には、誘導された細胞をPBS (20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、150mM NaCl) に懸濁し、そして超音波処理によって破壊した。NP - 40を0.1%まで添加し、そして混合物を穏やかに混合しつつ4 で30分間インキュベートした。4 で30分間25,000 g で遠心分離することによって、不溶性物質を収集した。不溶性物質をPBS中の4M尿素中で1回洗浄し、遠心分離によって収集し、次いでPBS中で再度洗浄した。収集したペレットは、75%を超える融合タンパク質を含有すると評価された。この物質をスピードバキューム(speed vacuum)中で乾燥し、次いで、抗体の生成のためのマウスおよびウサギへの注射用のアジュバントに懸濁した。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ部分からの組換えタンパク質の分離は、製造業者のに従ってトロンピンを用いる部位特異的タンパク分解によって達成される。

20

【 0 7 5 2 】

HIS-8タグを含むpGRN121のhTTRヌクレオチド2426～3274を有するpGEX-2TK
 大量のhTTRのフラグメントを生成させるために、別のE. coli発現ベクターpGEX - 2TK構築物を調製した。この構築物はプラスミドpGRN121におけるhTTRインサートのヌクレオチド2 30
 426～3274に由来するインサートおよび8つの連続的ヒスチジン残基 (HIS-8タグ) をコードする配列を含有する。HIS-8 TAGを挿入するために、pGRN121のhTTRヌクレオチド2426～3274を有するpGEX-2TKベクターをBamHIで線状化した。これはGST - トロンピン - 心筋タンパク質キナーゼとhTTRコード配列との間の接合においてプラスミドを開環させた。BamHI適合末端を有する二本鎖オリゴヌクレオチドを線状化プラスミドに連結させて、hTTR配列の上流の8個のヒスチジン残基のインフレーム導入がなされた。

【 0 7 5 3 】

このベクターは、E. coliにおけるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ配列 (下線) ; トロンピン切断配列 (二重下線) ; 心筋タンパク質キナーゼの認識配列 (イタリック体) ; 括弧内にあるクローニングによって導入された3残基の組および5残基の組 ([GSV] および [GSVTK]) ; 8つの連続ヒスチジン (また二重下線) ; およびhTTRタンパク質フラグメント (太字) : よりなる融合タンパク質の高レベルの発現を指向する。

40

【 0 7 5 4 】

【 化 9 】

MSPILGYWKIKGLVOPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFP
NLPYYIDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGV
RIAYSKDFETLKVDLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMLYDAL
DVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATEGG
GDHPPKSDLVPRGSRRAASV[GSV]HHHHHHHHH[GSVTK]MSVYVVELLRSFFYV
TETTFQKNRLFFYRPSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARP
ALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVL
NYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTG
AYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTL
TDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHA
VRIRGKSYVQCQGI

10

【0755】

本発明のpGEX-2TKベクターのそれぞれを用いて、hTERTタンパク質に対してポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を生成させる目的のために融合タンパク質を生成させ得る。加えて、この融合タンパク質を用いて、融合タンパク質内に含まれるhTERTペプチドに対して生成される抗体をアフィニティー精製し得る。グルタチオンS-トランスフェラーゼ部分に由来する組換えタンパク質の分離は、製造業者の指示に従ってトロンピンを用いる部位特異的タンパク分解によって達成することができる。

【0756】

20

pGRN121のhTERTヌクレオチド2426～3274を有し、HIS-8タグを含まないpGEX-2TK大量のhTERTのフラグメントを生成させるために、別のE. coli発現ベクターpGEX-2TK構築物を調製した。

【0757】

この構築物は、プラスミドpGRN121におけるhTERTインサートのヌクレオチド2426～3274に由来するインサートを含むが、前記構築物のHIS-8タグを含まない。このベクターは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（下線）、トロンピン切断配列（二重下線）、心筋タンパク質キナーゼの認識配列（イタリック体）、括弧内のクローニングによって導入された残基（[GSVTK]）、およびhTERTタンパク質フラグメント（太字）よりなる融合タンパク質の高レベルのE. coliにおける発現を指向する。

30

【0758】

【化10】

MSPILGYWKIKGLVOPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYY
IDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSR
IAYSKDFE
TLKVDLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMLYDALDVVLYMDPMCLDAER
KLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATEGGGDHPPKSDLVPRGSRRAASV[
GSVTK]MSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRPSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRE
LSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRK
ALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPEYFVKVDVTGAYD
TIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGVKAFKSEVSTLTDLQPYMRQFV
AHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHA
VRIRGKSYVQCQGI

40

【0759】

pGRN121のhTERTヌクレオチド1625～2458を有するpGEX-2TK大量のhTERTタンパク質のフラグメントを生成させるために、別のE. coli発現ベクターpGEX-2TK構築物を調製した。

【0760】

この構築物はプラスミドpGRN121におけるhTERTインサートのヌクレオチド1625～2458に由来するインサートを含む。このベクターは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（

50

下線)、トロンピン切断配列(二重下線)、心筋タンパク質キナーゼの認識配列(イタリック体)、括弧内のクローニングによって導入された残基([GSVTK])、およびhTRTタンパク質フラグメント(太字)よりなる融合タンパク質の高レベルのE. coliにおける発現を指示する。

【0761】

【化11】

MSPILGYWKIKGLVOPTRLILLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFP
NLPYYIDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAYLDIRYGV
SRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMELYDA
 LDVVLYMDPMCLDAEPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATEG
 GGDHPPKSDLVPRGSRRA^{SV}[GSVTK]ATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGP
 PSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARR
 LVETIFLGSRPWMPGT^{PRRL}PLRPQRYWQMRPLFELLGNHAQCPYGVLL
 KTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQGSVAAP^{EEED}TDPRRLVQLLRQHSSPW
 QVYGFVRA^{CLRRL}VPPGLWGSRH^{NERR}FLRNTKKFISLGKHAKLSLQELT
 WKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVV^{ELLR}
 S

10

【0762】

pGRN121のhTRTヌクレオチド782~1636を有するpGEX-2TK

大量のhTRTタンパク質のフラグメントを生成させるために、別のE. coli発現ベクターpGEX-2TK構築物を調製した。

【0763】

この構築物はプラスミドpGRN121におけるhTRTインサートのヌクレオチド782~1636に由来するインサートを含有する。このベクターは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(下線)、トロンピン切断配列(二重下線)、心筋タンパク質キナーゼについての認識配列(イタリック体)、括弧内のクローニングによって導入された残基([GSVTK])、およびhTRTタンパク質フラグメント(太字)よりなる融合タンパク質の高レベルのE. coliにおける発現を指向する。

【0764】

【化12】

MSPILGYWKIKGLVOPTRLILLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYY
IDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAYLDIRYGVSR
IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMELYDA
LDVVLYMDPMCLDAEPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATEG
GGDHPPKSDLVPRGSRRA^{SV}[GSVTK]MPRAPRCRAVRSLLSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQ
CLVCVPWDARPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGA^{KNV}LAFGFALLDGARGGPF
EATTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHELLARCALFVLVAPCAYQVCG
PPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNESVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASR
SLPLPKRPRRGAAPEPERTFVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSL

40

【0765】

5'-非コード配列を欠くhTRT cDNAを有するpT7FLhTRT

前記のように、1つの実施態様において、本発明は、いずれの5'非翻訳hTRT配列も有さない細菌、哺乳動物、酵母および昆虫の発現ベクターへのクローニングを容易にするための部位特異的な様式で改変されたhTRTを提供する。いくつかの状況において、非タンパク質をコードする配列の量を最小にすることは、改善されたタンパク質産生(収率)および増大したmRNA安定性を可能とする。本発明のこの実施態様において、hTRT遺伝子の5'非コード領域を、細菌発現ベクターへのクローニングに先立って除去した。

【0766】

50

これは、hTRTコード配列の開始コドン（ATG）に対してすぐ上流（5'側）にさらなる制限エンドヌクレアーゼ部位を操作することによって行った（図16）。タンパク質のコード領域に対してすぐ5'側の制限部位の生成は、免疫検出および精製のための、標識およびペプチドタグを含む融合タンパク質のような融合タンパク質をコードする広範囲のベクターの効率的な産生を可能とする。

【0767】

詳細には、オリゴヌクレオチド5' - CCGGCCACCCCCCATATGCCGCGCGCTCCC - 3'を前述したように用いて、hTRTcDNAのhTRTcDNAヌクレオチドの779～781をGCGからCATへと改変した（図16）。これらの3つのヌクレオチドは、タンパク質配列を改変しないような、ATG開始コドン前の最後のヌクレオチドである。配列の変化により、hTRT cDNAにおいて唯一のNdeI制限部位が作製された。一本鎖hTRT DNAを部位特異的変異誘発のためのDNA供給源として使用した。得られたプラスミドを配列決定して、変異誘発の成功を確認した。

10

【0768】

この改変は、pT7FLhTRTと命名した本発明の以下のプラスミドの構築を可能にする。部位特異的に改変したhTRT配列（NdeI制限部位の付加）をNdeIおよびNcoIで消化して、hTRTをコードする核酸フラグメントを生成した。次いで、このフラグメントを、NdeIおよびSmaI（また、平滑末端カッター）で予め制限消化したpSL3418プラスミドにクローン化した。pSL3418は、FLAG配列（Immunex Corp., Seattle, WA）およびエンテロキナーゼ配列が上記のNdeI部位からすぐ上流に挿入された、改変されたpAED4プラスミドである。pT7FLhTRTと命名されたこのプラスミドは、T7 RNAポリメラーゼを発現するE. coli株における（その5'末端にFlag - タグを有する）全長hTRTの発現を可能とする。

20

【0769】

3'非コード配列を欠くhTRT cDNAを有するプラスミド

前述したように、本発明は、いくつかのまたは全ての非コード配列が欠失されたTRTをコードする核酸を含有する発現ベクターを提供する。いくつかの状況において、非タンパク質をコードする配列の量を最小化することは、改善されたタンパク質産生（収率）を可能にし、そしてmRNA安定性を増大させる。本発明のこの実態様において、hTRTの3'非翻訳領域を、細菌発現プラスミドへのクローニング前に欠失させる。

【0770】

前述したように、最初に全長hTRT cDNAを含有するプラスミドpGRN121を、全てのApaI部位を欠失させる。これに続いて、3' UTRを含有するMscI-HincII hTRT制限消化酵素フラグメントを欠失する。次いで、hTRTの停止コドンを含むNcoI-XbaI制限消化フラグメントを、pGRN121のNcoI-XbaI部位に挿入して、3' UTRを欠く以外はpGRN121と同等のpGRN124と命名したプラスミドを作製した。

30

【0771】

抗生物質選択マーカーを用いる細菌発現ベクター

本発明はまた、形質転換細胞に選択可能表現型を付与する選択マーカー、ならびに宿主ゲノムへの組み込みが必要とされないようなエピソードの維持および複製のためのコード配列を含有し得る細菌発現ベクターを提供する。例えば、このマーカーは抗生物質耐性、特にクロラムフェニコール（Harrod (1977) *Nucleic Acids res.* 25:1720-1726を参照のこと）、カナマイシン、G418、ブレオマイシン、およびハイグロマイシンに対する耐性をコードし得、所望のDNA配列で形質転換したこれらの細胞の選択を可能にする。例えば、Blondelet-Rouault (1977) *Gene* 190:315-317;およびMahan (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:669-673を参照のこと。

40

【0772】

本発明の1つの実施態様において、pBBS235と命名した、クロラムフェニコール抗生物質耐性遺伝子が挿入された改変されたBlueScriptプラスミドベクター（Stratagene, San Diego, CA）に全長hTRTをクローン化した。TRT ORFがベクターのLacプロモーターの反対方向となるように、hTRT ORFを含有するpGRN124（前記）からのNotIフラグメントを、pBBS235のNotI部位に挿入した。これは、本発明のTRT核酸のようなプラスミドインサートの変異誘

50

発に適したプラスミドを作製する。pGRN125と命名したこのプラスミド構築物は、テロメラゼ酵素およびTRTタンパク質コード配列のの変異誘発を含み、T7プロモーターを用いるhTRTのインビトロ転写（およびT3プロモーターを用いるアンチセンスhTRTのインビトロ転写）のための本発明の方法で使用し得る。

【0773】

本発明の別の実施態様において、hTRT ORFを含有するpGRN124からのNcoI制限消化フラグメントを、TRT ORFがベクターのLacプロモーターと同一方向であるようにpBBS235（前記）のNcoI部位にサブクローン化した。これは、E. coliにおける全長hTRTの発現で使用し得るpGRN126と命名したプラスミドを作製する。発現された産物は、ベクターpBBS235によってコードされる29個のアミノ酸、続くhTRTの5' UTRによってコードされる18個のアミノ酸、続く全長hTRTタンパク質を含有する。

10

【0774】

本発明のさらなる実施態様において、pGRN125のインビトロ変異誘発を行い、hTRT開始ATGコドンにkozakコンセンサスに変換し、発現ベクターへのクローン化を容易にするためのEcoRIおよびBglII制限消化部位を作製させる。オリゴヌクレオチド5' - TGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCagatctgAattCcaCcATGCCGCGCGCTCCCCGCTG - 3'（以下の場合における改変されたヌクレオチド）を変異誘発手順で使用した。得られた発現ベクターをpGRN127と命名した。

【0775】

本発明の別の実施態様において、TRT「DDモチーフ」の第2のAspをアラニンに変換して、非機能的テロメラゼ酵素に作製し、従って、優性/陰性変異体として使用するための変異体TRTタンパク質を作製する。hTRTコード配列をオリゴヌクレオチド5' - CGGGACGGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGAcGcgTTCTTGTGGTGACACCTCACCTCACC - 3'を用いてインビトロ変異誘発して、残基869のアスパラギンコドン（Asp869）をアラニン（Ala）コドンに変換した。これはまた、MluI制限酵素部位を作製した。得られた発現プラスミドをpGRN130と命名し、これはまた、pGRN127について記載したkozakコンセンサス配列含有する。

20

【0776】

本発明はまた、hTRTのアンチセンスフラグメントを発現させるように設計したベクターを提供する。pGRN126プラスミドを、MscIおよびSmaI制限酵素で完全に切断し、そして再度連結してhTRT ORFの95%以上を欠失させた。このプロセスの間に、1つのSmaI-MscIフラグメントを再度挿入してCAT活性を再生した。この未精製プラスミドを、次いで、SalIおよびEcoRIで再度消化し、そしてhTRT ORFの開始コドンを含むフラグメントをpBBS212のSalI-EcoRI部位に挿入して、5' UTRおよび（哺乳動物細胞における）hTRT ORFの73塩基対残基にわたるアンチセンス配列を発現するアンチセンス発現プラスミドを作製した。このプラスミドをpGRN135と命名した。

30

【0777】

酵母におけるhTRTテロメラゼの発現

本発明はまた、大量の全長の生物学的に活性なhTRTを産生するための、hTRT発現酵母発現ベクターを提供する。

【0778】

Pichia pastoris発現ベクターpPICZ Bおよび全長hTRT

40

大量の全長の生物学的活性hTRTを産生させるために、Picha pastoris発現ベクターpPICZ B（Invitrogen, San Diego, CA）を選択した。hTRTコード配列インサートはプラスミドpGRN121におけるhTRTインサートのヌクレオチド659～4801に由来するものであった。このヌクレオチド配列はhTRTをコードする全長配列を含む。この発現ベクターは、高レベルの全長の未修飾hTRTタンパク質のP.pastorisにおける誘導性発現のために設計される。発現は酵母プロモーターによって駆動されるが、発現された配列はhTRT開始および終結コドンを利用する。外因性コドンをクローニングによって導入した。得られたpPICZ B/hTRTベクターを用いて酵母を形質転換した。

【0779】

Pichia pastoris発現ベクターhTRT-His6/pPICZ B

50

pPICZ Bに由来する本発明の第2のPicha pastoris発現ベクターはまた、プラスミドpGRN12 1におけるhTRTインサートのヌクレオチド659～4801に由来するhTRTをコードする全長配列を含む。このhTRT-His6/pPICZ B発現ベクターは、そのC-末端でMycエピトープおよびHis6レポータータグ配列を融合した全長hTRTタンパク質をコードする。hTRT停止コドンは除去され、そしてMycエピトープおよびHis6レポータータグならびに停止コドンをコードするベクター配列によって置換されている。このベクターは、hTRT配列（下線）、括弧中のベクター配列（[L]および[NSAVD]）、Mycエピトープ（二重下線）、およびHis6 タグ（イタリック体）よりなる、以下の融合タンパク質の酵母における高レベルの誘導性発現を指示するように設計される：

【 0 7 8 0 】

【 化 1 3 】

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRILGPOGWRLVORGDPAAFERALVA
OCLVCVPWDARPPPAAPSFROVSCLELVARVLRRLCERGAKNVLAFGFALL
DGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARC
ALFVLVAPSCAYOVCGPPLYOLGAATOARPPPHASGPRRLGCERAWNHSVR
EAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPERTPTVGOGSWAHPGR
TRQPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGROHHAAPPSTSRPPR
PWDTPCPPVYAETKHELYSSGDKEQLRPSLELSSLRPSLTGARRLVETTELGSRP
WMPGTPRRLLPRLPORYWOMRPLFLELLGNHAOCOPYGVLLKTHCPLRAAVTPA
AGVCAREKPOGSVAAPPEEDTDPRRLVOLLROHSSPWQVYGFVRACLRLVP
PGLWGSRIHNERRLRNTKKFISLGKHAKLSLOELTWKMSVRDCAWLRRSPGV
GCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSEFYVTETTFOKNRLFEYRKS
VWSKLOSIGIROHLKRVOLRELSAEVROHREARPAALLTSRLRFIPKPDGLRPV
NMDYVVGARTERREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIH
RAWRTFVLVRAODPPPELYFVKVDVTGAYDTIPODRLTEVIASIIKPONTYCV
RRYAVVOKAAHGHVRKAFAKSHVSTLTDLOPYMROFVAHLOETSPLRDVYIE
QSSSLNEASSGLEDFELREMCHHAVRIRGKSYVOCQIGIPOGSILSTLLCSLCYGD
MENKLEAGIRRDGLLLRLVDELLVTPHLTHAKTEFLRTLVRGVPEYGCVVNLR
KTVVNFPEDEALGGTAEVOMPAGHGLFPWCGLLDTRTLEVOSDYSSYARTSI
RASLTENRGFKAGRNMRRKLEGLRLKCHSLFLDLOVNSLOTVCCTNIYKILLIQ
AYRFHACVLOLPFHQOVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGA
AGPLPSEAVOWLCHOAELLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAOTOLSRKLPGTTLTA
LEAAANPALPSDEKTIILDL[EOKLISEEDL[NSAVD]HHHHHH

【 0 7 8 1 】

昆虫細胞におけるhTRTの発現

本発明はまた、大量の全長の生物学的に活性なhTRTを産生するhTRTテロメラーゼ発現昆虫細胞発現ベクターを提供する。

【 0 7 8 2 】

バキュロウイルス発現ベクターpVL1393および全長hTRT

目的のテロメラーゼコード配列をバキュロウイルス発現ベクターpVL1393 (Invitrogen, San Diego, CA)にクローン化した。この構築物を、Autograph californica核多角体ウイルス (Baculogold-AcMNPV)からの線状化したDNAとともに、Spodoptera frugiperda (sf-9)細胞に引き続いて同時トランスフェクトした。得られた組換えバキュロウイルスを引き続いてブランク精製し、そして標準的なプロトコルに従って増殖させた。

【 0 7 8 3 】

この発現ベクターは、高レベルの全長hTRTタンパク質の昆虫細胞における発現を提供する。発現はバキュロウイルスポリヘドリン遺伝子プロモーターによって駆動される。外因性コドンはクローニングによって導入されなかった。

【 0 7 8 4 】

バキュロウイルス発現ベクターpBlueBacHis2 Bおよび全長hTRT

大量の全長の生物学的活性なhTRTを産生するために、バキュロウイルス発現ベクターpBlueBacHis2 B (Invitrogen, San Diego, CA)を制御エレメントの供給源として選択した。hTRT-コードインサートはプラスミドpGRN121におけるhTRTインサートのヌクレオチド707～4776からなるものであった。

【0785】

His6および抗Xpressタグ (Invitrogen) を有する全長hTRTをまた構築した。このベクターはまた、プラスミドpGRN121由来のhTRTインサートのヌクレオチド707～4776からなるインサートを含む。このベクターは、高レベルの、切断可能6-ヒスチジンおよび抗Xpressタグに融合した全長hTRTタンパク質の昆虫細胞における高レベルの発現を指示し、そして融合タンパク質のアミノ酸配列を以下に示す；(- * -)はエンテロキナーゼ切断部位を示す：

【0786】

【化14】

```
MPRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDL-*DPSSRSAAGTME
FAAASTQRCVLLRTWEALAPATPAMPRAAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVR
RLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFQVSCLELV
ARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGS
GAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARP
PPHASGPRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPR
RGAAPERTPTVGQCSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGT
RHSHPVGRQHAGPPSTSRPPRPWDTPCPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFL
LSSLRPSLTGARLLETIFLGSRPWMPGTTPRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNH
AQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRRLVQLLR
QHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQ
ELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLR
SFFYVTETTFQKNRLFFYRKSWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREA
RPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLN
YERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYD
TIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLPY
MRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSY
VQCQGIQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLRLVDDFLLVTPHLTH
AKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWC
GLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFRNGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHS
LFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISD
TASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYV
PLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD
```

【0787】

バキュロウイルス発現ベクターpBlueBac4.5および全長hTRTタンパク質

大量の全長の生物学的に活性なhTRTを産生するために、第2のバキュロウイルス発現ベクター、pBlueBac4.5 (Invitrogen, San Diego, CA)を構築した。hTRTをコードするインサートはまた、プラスミドpGRN121由来のhTRTのヌクレオチド707～4776よりなるものであった。

【0788】

バキュロウイルス発現ベクターpMelBacBおよび全長hTRTタンパク質

大量の全長の生物学的に活性なhTRTを産生するために、第3のバキュロウイルス発現ベクター、pMelBacB (Invitrogen, San Diego, CA)を構築した。hTRTをコードするインサートはまた、プラスミドpGRN121由来のhTRTインサートのヌクレオチド707～4776よりなる。

【0789】

pMelBacBは、メリチンシグナル配列を用いて、分泌経路を介する細胞外培地への昆虫細胞

10

20

30

40

50

における全長hTRTの発現を指示する。高レベルの全長hTRTがこのようにして分泌される。メリチンシグナル配列は排出される場合は切断されるが、細胞内に維持されるタンパク質プールの一部である。この理由から、以下の配列において括弧内に示される。このベクターによってコードされる融合タンパク質の配列を下記に示す：

【 0 7 9 0 】

【 化 1 5 】

```
(MKFLVNVALVFMVVYISYIYA)-*-DPSSRSAAGTMEFAAASTQRCVLL
RTWEALAPATPAMPRAAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQ
RGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFQVSCLELVARVLQRLCERG
AKNVLAFGFALLDARGGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRV
GDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRL
GCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTP
VGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQH
HAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGAR
RLVETIFLGSRPWMPGTTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKT
HCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYG
FVRACLRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRD
CAWLRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFYVTETTFQ
KNRLFFYRKS VWSK LQSIGIRQH LKRYQLRELSEAEVRQHREARPA LLTSRLRF
IPKPDGLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLL
GASVLGLDDIHR AWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVI
ASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQ
ETSPLRD AVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSI
LSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGULLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRG
VPEYGC VVNLRKT VVNFVVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEV
QSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQ
TVCTNIYKILL LQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKA
KNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSRLRTAQ
TQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTILD
```

【 0 7 9 1 】

哺乳動物細胞におけるhTRTの発現

本発明はまた、上で議論したように、本発明の多くの実施態様において有用である種々の哺乳動物細胞株において全長の生物学的に活性なタンパク質として大量にhTRTを産生するためのベクターを提供する。

【 0 7 9 2 】

MPSV-hTRT発現プラスミド

本発明はまた、コード配列を現実には修飾する（例えば、コドン使用法を最適化する）ことなく、テロメラーゼのような組換えタンパク質の最大の可能な発現を与える哺乳動物細胞での使用のための発現系を提供する。1つの実施態様において、本発明は、本発明のTRTを発現し得るMPSV哺乳動物発現プラスミド（Lin J-H (1994) Gene 47:287-292においてpMPSV-TMとして記載されたプラスミドpBBS212由来）を提供する。MPSVプラスミドは、安定なクローンまたは一過性のクローンのいずれかとして発現され得る。

【 0 7 9 3 】

この発現系において、hTRTコード配列自体は変化しないが、外因性転写制御エレメントがベクターに組み込まれる。サイトメガロウイルス（CMV）エンハンサーによって増強される骨髓増殖性肉腫ウイルス（MPSV）LTR（MPSV-LTR）プロモーターを転写開始のために組み込む。このプロモーターは一貫して細胞株におけるより高い発現レベルを示す（Lin J-H (1994), 前出を参照のこと）。Kozakコンセンサス配列を翻訳開始のために組み込み得る（Kozak (1996) Mamm. Genome 7:563-574を参照のこと）。全ての外因性5'および3'非翻訳hTRT

10

20

30

40

50

配列を除去して、これらの配列が上記のように発現を妨げないことを確認し得る。全ての外因性配列を有する、完全なhTRTコード配列を含有するMPSVプラスミドをpGRN133と命名する。コントロールであるhTRT「アンチセンス」プラスミドをまた構築した。このベクターは、TRTインサートがhTRTのアンチセンス配列である以外はpGRN133と同一である（このコントロールがベクターとして使用され得るアンチセンスをpGRN134と命名する）。全ての他の外因性配列が除去され、そしてKozakコンセンサス配列を有する完全なhTRTコード配列を含有するMPSVプラスミドをpGRN145と命名する。

【0794】

2つの選択マーカー、PAC（プロマイシン-N-アセチル-トランスフェラーゼ＝プロマイシン耐性）およびHygB（ハイグロマイシンB＝ハイグロマイシン耐性）はトランスフェクション後のプラスミドの選択のために存在する（上記の選択マーカーに言及する議論を参照のこと）。ベクターポリリンカーの両側のマーカーを使用する二重選択はhTRTコード配列の安定性を増大させるはずである。DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）コード配列を含ませて、安定なクローンが作製された後に発現力セットの増幅を可能とする。また、遺伝子増幅の他の手段を使用して、組換えタンパク質収率を増大させ得る。

【0795】

本発明はまた、hTRT融合タンパク質を含有するMPSV哺乳動物発現プラスミドを提供する。1つの実施態様において、hTRT配列を、その5'非翻訳領域を保持したまま、IBI FLAG (International Biotechnologies Inc. (IBI), Kodak, New Haven, CT)のようなエピトープフラッグに連結させ、そしてMPSV発現プラスミドに挿入する（pGRN147と命名する）。この特定の構築物は、Kozak翻訳開始部位を含む。発現された融合タンパク質は、M-1抗FLAGオクタペプチドモノクローナル抗体（IBI, Kodak, 前出）を用いて精製され得る。

【0796】

別の実施態様において、hTRTは部位特異的に改変される。1つのアミノ酸残基コドンを変異誘発し、869位のアスパラギン酸をアラニンに変化させる。その5'非翻訳領域を保持し、そしてKozak配列を組み込むこのAsp869 Ala hTRT変異体をMPSV発現プラスミドに挿入し、そしてpGRN146と命名した。Asp869 Ala hTRT変異体を、さらに、上記のようにFLAG配列を含有するように操作し、そしてこのインサートをMPSV発現プラスミドにクローン化した。この発現プラスミドをpGRN154と命名する。特に、pGRN154については、hTRTの「先端」（5'セグメント）を含有するKozak配列を含むpGRN146由来のEam1105I制限消化フラグメントをpGRN147（上記を参照のこと）のEam1105I部位にクローン化して、Kozak配列、上記のD869->A変異、およびIBIフラッグを有するhTRTを発現し得るMPSV発現プラスミドを作製する。

【0797】

本発明の別の実施態様はpGRN146由来の発現プラスミドである。pGRN152と命名された哺乳動物発現プラスミドを、（hTRT ORFを含有する）プラスミドpGRN146からEcoRIフラグメントを切り出すことによって生成し、そしてpBBS212のEcoRI部位にクローン化して、hTRTの5'UTRを除去した。このhTRTは、その発現がMPSVプロモーターによって制御されるような方向である。これにより、Kozakコンセンサス配列およびD869->A変異を有するhTRTを発現する哺乳動物発現プラスミドを作成し、そしてMPSVプロモーターを使用する。

【0798】

本発明は、hTRTを、hTRTコード配列がMPSVプロモーターによって駆動されるような方向とした哺乳動物発現ベクターを提供する。例えば、hTRTオープンリーディングフレーム（ORF）を含有するpGRN137由来のEcoRI制限消化フラグメントをpBBS212（下記参照のこと）のEcoRI部位にクローン化し、このようにして、hTRTの5'非翻訳領域（5'-UTR）を除去した。pGRN137を、pGRN136のSal I-Sse 8387I部位へのhTRTのKozak変異を有する後記のpGRN130からSal I-Sse8387Iフラグメントを切り出し、MPSVプロモーターから離れてKozakコンセンサス配列を含有するhTRTを発現する哺乳動物発現プラスミドを作製することによって構築した。プラスミドpGRN136を、hTRT ORFを含有するpGRN126からHindIII Sal Iフラグメントを切り出し、そしてそれをプラスミドpBBS242のHindIII Sal I部位にクローニングし、M

10

20

30

40

50

PSVプロモーターから離れてhTRTを発現する哺乳動物発現プラスミドを作製することによって構築した。これにより、MPSVプロモーターを用いて、Kozakコンセンサス配列を有するhTRTを発現するpGRN145と命名された哺乳動物発現プラスミドが作製される。下記のpGRN152 MPSVプロモーター駆動性哺乳動物発現ベクターも参照のこと。

【0799】

エピソームベクターpEBVHisを用いる293細胞で発現されるhTRT

エピソームベクターpEBVHis (Invitrogen, San Diego, CA)を、N末端発現エピトープタグ、Xpressエピトープ (Invitrogen, San Diego, CA)に融合したhTRTを含むhTRT融合タンパク質を発現するように操作した (pGRN122と命名した)。hTRT ORFを含有するpGRN121由来のNotI hTRTフラグメントを、hTRT ORFがベクターのラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターと同一方向になるように、pEBVHisAのNotI部位にクローン化した。この方向において、His6フラッグはhTRTのN末端に比較的近かった。

10

【0800】

ベクターをまた、hTRTのアンチセンス配列およびエピトープタグをインサートとして含むように構築した (コントロールとして使用できるプラスミドpGRN123と命名した)。このベクターを293細胞にトランスフェクトし、そしてXpressエピトープに対して特異的な抗体を用いて、翻訳されたhTRTを同定し、そして単離した。pEBVHisは、N末端ペプチドに融合した目的のタンパク質を発現するハイグロマイシン耐性EBVエピソームベクターである。このベクターを有する細胞を選択し、そして増殖させ、次いで、核および細胞質抽出物を調製した。これらおよびコントロール抽出物を抗Xpress抗体で免疫沈降させ、免疫沈降したピーズを通常のアッセイによってテロメラーゼ活性について試験する。

20

【0801】

有寿命性正常ディプロイドヒト細胞における組換えhTRTの発現

本発明の1つの実施態様において、組換えhTRTおよび必要なテロメラーゼ酵素複合体成分を、正常なディプロイド有寿命性細胞で発現させて、それらの増殖能力を増大、あるいはそれらを不死化させ、またはそれらの不死化を促進し得る。これにより、さもなければ正常な表現型および核型 (karotype) を有するディプロイドの不死化細胞を得ることができ。上記の、テロメラーゼのこの用途は膨大な商業的利用性を有する。

【0802】

センスhTRT (図16) およびアンチセンスhTRTをCMVベクターにクローン化した。これらのベクターを精製し、そして2つの正常な有寿命性のディプロイドヒト細胞クローンに一過性にトランスフェクトした。ヒトクローンは若い継代のディプロイドヒトBJおよびIMR90細胞株であった。

30

【0803】

TRAPezeTMキット (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) を利用するTRAPアッセイを用いるテロメラーゼ活性の分析は、アンチセンスhTRTではなくセンスhTRTのトランスフェクションがBJおよびIMR90の両方の細胞株でテロメラーゼ活性を生じたことを示した。

【0804】

不死化IMR90ヒト細胞における組換えhTRTの発現

上記のディプロイドヒトBJおよびIMR90細胞株研究で使したCMVベクターにクローン化した同一hTRTセンス構築物を用いて、不死化SW13ALT経路細胞株 (SV40抗原で不死化したIMR90細胞) を一過性にトランスフェクトした。TRAPアッセイ (TRAPeze, Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) は、テロメラーゼ活性がセンス構築物でトランスフェクトした細胞で生じたことを示した。

40

【0805】

哺乳動物細胞におけるhTRTの調節された発現のためのベクター：hTRTの誘導性および抑制性発現

本発明は、hTRTのような本発明のTRTの発現を誘導または抑制するように操作され得るベクターを提供する。例えば、hTRTコード配列を、Invitrogen (San Diego, CA) によるエクジソン (Ecdysone) 誘導性発現系およびClontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) に

50

よるTet-OnおよびTet-offテトラサイクリン調節系にクローン化し得る。このような誘導性発現系は、トランスフェクトしたTRTの転写のレベルまたは速度を制御することが重要である本発明の方法で使用するために提供される。例えば、本発明は、hTRTの発現を介して不死化された細胞株を提供し；このような細胞は、Tet-Off系によって提供されるもののような、転写制御を介する、ベクターによるhTRT発現の阻害によって「有寿命性」にし得る。本発明はまた、hTRTの構成的発現を回避するためにTRTを一時的にのみ発現する方法を提供し、これは上記のように、トランスフェクトした細胞の所望されない「不死化」を導き得る。

【0806】

エクジソン誘導性哺乳動物発現系は、哺乳動物細胞における目的の遺伝子の調節された発現を可能にするように設計される。この系は、哺乳動物細胞においてほとんど検出されない基底発現および200倍よりも大きい誘導性を可能とするその厳密に調節されたメカニズムによって区別される。この発現系はDrosophilaのヘテロダイマーエクジソンレセプターに基づく。エクジソン誘導性発現系は、ヘテロダイマー核レセプターを介してhTRTの発現を活性化するためにステロイドホルモンエクジソンアナログ、ムリステロンAを使用する。発現レベルは、基底レベルよりも200倍を超え、哺乳動物細胞生理学に対する効果を有しないと報告されている（「Ecdysone-Inducible Gene Expression in Mammalian Cells and Transgenic Mice」 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351)。一旦、レセプターがエクジソンまたはムリステロン（エクジソンのアナログ）に結合すると、レセプターはエクジソン応答性プロモーターを活性化して、目的の遺伝子の制御された発現をももたらす。エクジソン誘導性哺乳動物発現系において、ヘテロダイマーレセプターの両方のモノマーは同じベクターであるpVgRXRから構成的に発現される。最終的に、目的の遺伝子の発現を駆動するエクジソン応答性プロモーターは、目的の遺伝子の転写を駆動する第2のベクターpIND上に位置する。

【0807】

hTRTコード配列を、最小の熱ショックプロモーターおよび複数クローニング部位の上流の5つの修飾されたエクジソン応答エレメント（E/GRE）を含有するpINDベクター（Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA）にクローン化する。次いで、この構築物を、エクジソンレセプターを安定に発現するように予め操作された細胞株にトランスフェクトする。トランスフェクション後、細胞をムリステロンAで処理して、pIND由来の細胞内発現を誘導する。

【0808】

Tet-onおよびTet-off発現系（Clontech, Palo Alto, CA）は、Tet-Off転写抑制系についてはGossen (1992) 「Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551；およびTet-On誘導性転写系についてはGossen (1995) 「Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells」 Science 268:1766-1769によって記載された、調節された高レベル遺伝子発現系を利用する。「Tet-Off」形質転換細胞株においては、テトラサイクリン（Tc）またはドキシサイクリン（「Dox」はTc誘導体）が培養培地から除去された場合に遺伝子発現はスイッチが入る。対照的に、TcまたはDoxの培地への添加によってTet-On細胞株では発現にスイッチが入る。両方の系は、種々の濃度のTcまたはDoxに応答して厳密に調節されるべきクローン化遺伝子の発現を可能にする。

【0809】

この系は目的の遺伝子の発現のために使用され得る応答プラスミドとして「pTRE」を使用する。プラスミドpTREはTet応答性PhCMV⁺-1プロモーターのすぐ下流にマルチクローニング部位（MCS）を含有する。MCSの部位の1つに挿入された目的の遺伝子またはcDNAは、それぞれ、Tet-OffおよびTet-On系においてtTAおよびrtTA調節タンパク質に応答性である。PhCMV⁺-1は、7コピーの42bpのtetオペレーター配列（tetO）よりなるTet応答性エレメント（TRE）を含有する。TREエレメントは、pTetプラスミドにおける完全なCMVプロモーターの一部であるエンハンサーを欠く最小CMVプロモーター（PminCMV）のすぐ上流にある。

結果として、PhCMV⁺-1は、調節タンパク質のtetO配列への結合の非存在下でサイレントである。このクローン化インサートは開始コドンを含さなければならない。いくつかの場合には、Kozakコンセンサスリボソーム結合部位の付加は発現レベルを改善し得る；しかし、多くのcDNAがKozak配列の付加なくしてTet系において効果的に発現されてきた。pTRE-Gene XプラスミドをpTK-Hygで同時にトランスフェクトして、安定なトランスフェクタントの選択を可能にする。

【0810】

Tet-OffまたはTet-On発現系の設定は、一般に、TREの制御下で適切な調節タンパク質およびTRTをコードする遺伝子の全コピーを含有する「二重-安定」細胞株を生成させるための2つの連続的な安定なトランスフェクションを必要とする。最初のトランスフェクションにおいて、適切な調節タンパク質を、適切な調節タンパク質を発現する、pTet-OffまたはpTet-Onベクターのような「調節プラスミド」のトランスフェクションによって、選択した細胞株に導入する。次いで、pTRE「応答プラスミド」にクローン化されたhTRTを第2のトランスフェクションにおいて導入して、二重-安定Tet-OffまたはTet-On細胞株を作製する。両方の系は遺伝子発現の非常に厳密なon/off制御、調節された用量-依存性誘導、および高い絶対レベルの遺伝子発現を与える。

【0811】

DHFRおよびアデノウイルス配列を有する組換えhTRTの発現

pGRN155プラスミド構築物を、哺乳動物細胞におけるhTRT cDNAの一過性発現のために設計した。KozakコンセンサスをhTRT配列の5'末端に挿入する。hTRTインサートは3'または5' UTRを有さない。hTRT cDNAをp91023(B) (Wong (1985) Science 228:810-815)のEcoRI部位に挿入する。hTRTインサートはDHFR ORFと同一方向である。これにより、一過性発現のため特に有用な発現ベクターを作製する。

【0812】

プラスミドpGRN155は、アデノウイルスプロモーターのすぐ上流のSV40起点およびエンハンサー、テトラサイクリン耐性遺伝子、E. coli起点、ならびにアデノウイルスVAIおよびVAII遺伝子領域を有する。この発現カセットは、以下の順序で以下のものを含む：アデノウイルス主要後期プロモーター；アデノウイルス三部分リーダー；この三部分リーダーの第1のエクソン由来の5'スプライス部位およびマウス免疫グロブリン遺伝子由来の3'スプライス部位からなるハイブリッドイントロン；hTRT cDNA；マウスDHFRコード配列；およびSV40ポリアデニル化シグナル。

【0813】

アデノウイルス三部分リーダーおよびVA RNAは、ポリシストロン性mRNAが翻訳される効率を増大させることが報告されている。DHFR配列は、ハイブリッドmRNAの安定性を増大することが報告されている。また、DHFR配列は、ベクター配列の選択および増幅のためのマーカーを提供し得る。Logan (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655；Kaufman (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:689；およびKaufman (1988) Focus (Life Technologies, Inc.), 第10巻, 3号)を参照のこと。

【0814】

本発明の他の発現プラスミドを、例示の目的で記載する。

【0815】

pGRN121

hTRTタンパク質をコードする全cDNAを含有するラムダクローン25-1.1.6由来のEcoRIフラグメントを、cDNAの5'末端がベクター中のT7プロモーター近くになるように、pBluescript IISK+のEcoRI部位に挿入した。このベクターで使用される選択マーカーはアンピシリンである。

【0816】

pGRN122

hTRT ORFを含有するpGRN121由来のNotIフラグメントを、コード配列がRSVプロモーターに作動可能に連結されるようにpEBVHisAのNotI部位に挿入した。このプラスミドは、hTRTタ

10

20

30

40

50

ンパク質のN末端に融合したHis6フラッグからなる融合タンパク質を発現する。このベクターで使用される選択マーカーはアンピシリンまたはハイグロマイシンである。

【0817】

pGRN123

hTRT ORFを含有するpGRN121由来のNotIフラグメントを、コード配列がRSVプロモーターと反対方向になるようにpEBVHisAのNotI部位に挿入した。従ってアンチセンスhTRTを発現する。

【0818】

pGRN124

プラスミドpGRN121を、全てのApaI部位を欠失させ、続いて3' UTRを含有するMscI-HincIIフラグメントを欠失させた。次いで、hTRTコード配列の停止コドンを含むNco-XbaIフラグメントをpGRN121のNco-XbaI部位に挿入して、3' UTRを欠く以外はpGRN121と同等のプラスミドを作製した。これはいくつかの細胞において増大した発現レベルのために好適であり得る。

【0819】

pGRN125

hTRTコード配列を含有するpGRN124からのNotIフラグメントを、オープンリーディングフレームがLacプロモーターの反対方向となるようにpBBS235のNotI部位に挿入した。このベクターで使用する選択マーカーはクロラムフェニコールである。

【0820】

pGRN126

hTRTコード配列を含有するpGRN124からのNotIフラグメントを、挿入されたhTRTコード配列がLacプロモーターと同一方向となるようにpBBS235のNotI部位に挿入した。

【0821】

pGRN127

オリゴヌクレオチド5' - T G C G C A C G T G G G A A G C C C T G G C a g a t c t g A a t t C C a C c A T G C C G C G C G C T C C C C G C T G - 3'をpGRN125のインビトロ変異誘発で使用して、hTRTコード配列の開始ATGコドンをkozakコンセンサス配列に変換し、クローニングのためのEcoRIおよびBglII部位を作製した。また、オリゴヌクレオチドCOD2866を用いて、AmpSをAmpR（アンピシリン耐性）に変換し、オリゴヌクレオチドCOD1941を用いてCatR（クロラムフェニコール耐性）をCatS（クロラムフェニコール感受性）に変換した。

【0822】

pGRN128

オリゴヌクレオチド5' - T G C G C A C G T G G G A A G C C C T G G C a g a t c t g A a t t C C a C c A T G C C G C G C G C T C C C C G C T G - 3'をインビトロ変異誘発で用いて、hTRTの開始ATGコドンをkozakコンセンサスに変換し、クローニングのためのEcoRIおよびBglII部位を作製した。また、オリゴ5' - C T G C C C T C A G A C T T C A A G A C C A T C C T G G A C T A C A A G G A C G A C G A T G A C A A A T G A A T T C A G A T C T G C G G C C G C C A C C G C G G T G G A G C T C C A G C - 3'を用いて、C末端にIBI Flag（International Biotechnologies Inc. (IBI), Kodak, New Haven, CT）を挿入し、クローニングのためのEcoRIおよびBglII部位を作製した。また、COD2866を用いて、AmpSをAmpRに変換し、COD1941を用いてCatRをCatSに変換した。

【0823】

pGRN129

オリゴヌクレオチド5' - C G G G A C G G G C T G C T C C T G C G T T T G G T G G A c G c g T T C T T G T T G G T G A C A C C T C A C C T C A C C - 3'をインビトロ変異誘発によって用いて、Asp869をAlaコドンに変換した（すなわち、DDモチーフの第2Aspをアラニンに変換して、優性/陰性hTRT変異体を作製した）。これはまた、MluI部位も生じた。また、オリゴヌクレオチド5' - C T G C C C T C A G A C T T C A A G A C C A T

10

20

30

40

50

CCTGGACTACAAGGACGACGATGACAAATGAATTTCAGATCTGCGGCCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGC-3')を用いて、C末端にIBI Flagを挿入し、クローニングのためのEcoRIおよびBglII部位を作製した。また、COD2866を用いて、AmpSをAmpRに変換し、COD1941を用いてCatRをCatSに変換した。

【0824】

pGRN130

オリゴヌクレオチド5'-CGGGACGGGCTGCTCCCTGCGTTTG GTGGAcGcgTTCTTTGTTGGTGAACACCTTCACCTCACCC-3'をインビトロ変異誘発で用いてAsp869コドンを変換した(すなわち、DDモチーフの第2Aspをアラニンに変換して優性/陰性変異型タンパク質を作製した)。これはまた、MluI部位を生じた。また、オリゴヌクレオチド5'-TGCGCACGTGGGAAGCCCTGGGa g a t c t g A a t t C C a C c A T G C C G C G C G C T C C C C G C T G - 3'をインビトロ変異誘発で用いて、hTTRコード配列の開始ATGコドン进行をkozakコンセンサス配列に変換し、クローニングのためのEcoRIおよびBglII部位を作製した。また、COD2866を用いてAmpSをAmpRに変換し、COD1941を用いてCatRを変換した。

10

【0825】

pGRN131

kozak配列およびIBI Flag変異と共にhTTR ORFを含有するpGRN128からのEcoRIフラグメントを、hTTR ORFがMPSVプロモーターから離れて発現されるように、pBBS212のEcoRI部位に挿入する。プラスミドpBBS212はMPSVプロモーター、CMVエンハンサー、およびSV40ポリアダニル化部位を含有する。

20

【0826】

pGRN132

kozak配列およびIBI Flag変異と共にhTTR ORFを含有するpGRN128からのEcoRIフラグメントを、hTTR ORFのアンチセンスがMPSVプロモーターから離れて発現されるようにpBBS212のEcoRI部位に挿入する。

【0827】

pGRN133

hTTRコード配列を含有するpGRN121からのEcoRIフラグメントを、hTTRタンパク質がMPSVプロモーターの制御下で発現されるように、pBBS212のEcoRI部位に挿入した。

30

【0828】

pGRN134

hTTRコード配列を含有するpGRN121からのEcoRIフラグメントを、hTTRコード配列のアンチセンスがMPSVプロモーターの制御下で発現されるように、pBBS212のEcoRI部位に挿入した。このベクターで使用した選択マーカーはChlor/HygB/PACである。

【0829】

pGRN135

プラスミドpGRN126をMscIおよびSmaIで完全に消化し、再度連結して、挿入されたhTTRコード配列の95%以上を欠失させた。1つのSmaI-MscIフラグメントをこのプロセスの間に再度挿入して、選択用のCat活性を再度生じさせた。次いで、この未精製プラスミドをSalIおよびEcoRIで再度消化し、hTTRコード配列の開始コドン进行を含有するフラグメントをpBBS212のSalI-EcoRI部位に挿入した。これにより、5' UTRのアンチセンスおよびコード配列の73塩基を発現するアンチセンス発現プラスミドが作成される。このベクターで使用した選択マーカーはChlor/HygB/PACである。

40

【0830】

pGRN136

hTTRコード配列を含有するpGRN126からのHindIII-SalIフラグメントをpBBS242のHindIII-SalI部位に挿入した。

【0831】

pGRN137

50

kozak配列を含有するpGRN130からのSalI-Sse8387IフラグメントをpGRN136のSalI-Sse8387I部位に挿入した。

【0832】

pGRN138

hTERTマイナス3' UTRを含有するpGRN124からのEcoRIフラグメントを、hTERTの方向がEGFPドメインと同一になるように、pEGFP-C2のEcoRI部位に挿入した。

【0833】

pGRN139

オリゴヌクレオチド5'-CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACCTACAAGGACGACGATGACAAATGAATTTCAGATCTGCGGCCGCCACCCGCGGTGGAGCTCCAGC-3'をインビトロ変異誘発で使用して、pGRN125におけるhTERTのC末端にIBI Flagを挿入し、クローニングのためのEcoRIおよびBglIIを作製した。また、COD2866を用いてAmpSをAmpRに変換し、COD1941を用いてCatRをCatSに変換した。

【0834】

pGRN140

ゲノムhTERTの上流配列およびラムダG55からのhTERTの第1イントロンを含有するNcoIフラグメントをpBBS167のNcoI部位に挿入した。このフラグメントはhTERTがLacプロモーターと同一方向になるような方向とする。

【0835】

pGRN141

ゲノムhTERTの上流配列およびラムダG55からのhTERTの第1イントロンを含有するNcoIフラグメントをpBBS167のNcoI部位に挿入した。このフラグメントを、hTERTがLacプロモーターと反対方向となるような方向とする。

【0836】

pGRN142

hTERT遺伝子プロモーター領域を含む完全~15kbpゲノムインサートを含有するラムダGphi5からのNotIフラグメントを、プラスミドpBBS185のNotI部位に挿入した。このフラグメントは、hTERT ORFがLacプロモーターと反対方向となるような方向とする。

【0837】

pGRN143

hTERT遺伝子プロモーター領域を含む完全~15kbpゲノムインサートを含有するラムダGphi5からのNotIフラグメントを、プラスミドpBBS185のNotI部位に挿入した。このフラグメントは、hTERT ORFがLacプロモーターと同一方向となるような方向とする。

【0838】

pGRN144

ラムダ配列を除去するためのpGRN140のSAL1を欠失。

【0839】

pGRN145

このベクターを、哺乳動物細胞におけるhTERT配列の発現用に構築した。hTERTコード配列を含有するpGRN137からのEcoRIフラグメントを、pBBS212のEcoRI部位に挿入して、hTERT mRNAの5' UTRに対応する配列の一部を除去した。hTERTコード配列は、それがMPSVプロモーターの制御下で発現されるような方向とする。このベクターで使用した選択マーカーはChlor/HygB/PACである。

【0840】

pGRN146

このベクターを、哺乳動物細胞におけるhTERT配列の発現のために構築した。hTERTのD869A変異を含有するpGRN130からのSse8387I-NcoIフラグメントをpGRN137のSse8387I-NcoI部位に挿入した。このベクターで使用した選択マーカーはアンピシリン/HygB/PACである。

10

20

30

40

50

【 0 8 4 1 】

pGRN147

IBI Flagを含有するpGRN139からのSse8387I - NotIフラグメントをpGRN137のSse8387I - NotI部位に挿入した。

【 0 8 4 2 】

pGRN148

hTERTのプロモーター領域を含有するpGRN144からのBglII-Eco47IIIフラグメントをpSEAP2のBglII-NruI部位に挿入してhTERTプロモーター/レポーター構築物を作製した。

【 0 8 4 3 】

pGRN149

このベクターは、hTERT融合タンパク質発現ベクターを構築するための中間ベクターである。

10

【 0 8 4 4 】

変異誘発オリゴ5' - c t t c a a g a c c a t c c t g g a c t t t c g a a a c g c g g c c g c c a c c g c g g t g g a g c t c c - 3'を用いて、pGRN125のインビトロ変異誘発によってhTERTのC末端にCSP45I部位を付加した。hTERTの「停止」コドンに欠失させ、Csp45I部位で置き換えた。このベクターで使用する選択マーカーはアンピシリンである。

【 0 8 4 5 】

pGRN150

hTERTのプロモーター領域を含有するpGRN144からのBglII-FspIフラグメントをpSEAP2のBglII-NruI部位に挿入して、hTERTプロモーター/レポーター構築物を作製した。

20

【 0 8 4 6 】

pGRN151

このベクターを、哺乳動物細胞におけるhTERT配列の発現のために構築した。hTERTコード配列を含有するpGRN147からのEcoRIフラグメントをpBBS212のEcoRI部位に挿入して、hTERT mRNAの5' UTRに対応する配列の一部を除去した。hTERTコード配列は、それがMPSVプロモーターの制御下で発現されるような方向とする。このベクターで使用する選択マーカーはChlor/HygB/PACである。

【 0 8 4 7 】

pGRN152

hTERTコード配列を含有するpGRN146からのEcoRIフラグメントをpBBS212のEcoRI部位に挿入して、hTERTの5' UTRに対応する配列の一部を除去した。hTERTコード配列は、それがMPSVプロモーターの制御下で発現されるような方向とする。

30

【 0 8 4 8 】

pGRN153

hTERTのD 869 ->A変異を含有するpGRN130からのStyIフラグメント(hTERT変異型コード配列)をpGRN158のStyI部位に挿入して、その5'末端にkozakコンセンサス配列、その3'末端にIBI FLAG配列(C - 末端コード領域)、およびD 869 A変異を有するhTERTコード配列を含有するプラスミドを得た。

40

【 0 8 4 9 】

pGRN154

hTERT遺伝子を含有するpGRN153のEcoRIフラグメントを、hTERT ORFがMPSVプロモーターと同一方向に配向されるような方向で、プラスミドpBS212のEcoRI部位に挿入した。これにより、そのアミノ末端でkozakコンセンサス配列、そのカルボキシ末端でIBI FLAG、およびD 869 A変異を有するhTERTタンパク質を発現するMPSV - 指向性発現プラスミドが作製される。

【 0 8 5 0 】

pGRN155

このベクターを、哺乳動物細胞におけるhTERT配列の発現のために構築した。このインサー

50

トは、5'および3' UTRを有さないhTRTの全長cDNA、およびkozak配列を含んだ。kozakコンセンサスを有しかつ3' UTRも5' UTRも有さないhTRT cDNAを含有するpGRN145からのEcoRIフラグメントを、hTRTがDHFR ORFと同一方向になるように、p 91023 (B) のEcoRI部位に挿入した。これにより、hTRTのための一過性発現ベクターが作製される。このベクターで使用した選択マーカーはテトラサイクリンである。

【 0 8 5 1 】

pGRN156

このベクターを、哺乳動物細胞におけるhTRT配列の発現のために構築した。kozakコンセンサス配列を有しかつ3' UTRも5' UTRも有さないhTRT cDNAの D 869 A 変異を含有するpGRN 146からのEcoRIフラグメントを、hTRTがDHFR ORFと同一方向となるように p 91023 (B) のEcoRI部位に挿入した。これにより、hTRTについての一過性発現ベクターが作製される。このインサートは、5' および3' UTRを有さないhTRTの全長cDNA、D 869 A、およびkozak配列を含んだ。このベクターで使用した選択マーカーはテトラサイクリンである。

10

【 0 8 5 2 】

pGRN157

このベクターを、哺乳動物細胞における h TRT配列の発現用に構築した。C - 末端のIBI FLAG ; kozakコンセンサスを有しかつ3' UTRも5' UTRも有さないhTRT cDNAを含有するpGRN 147からのEcoRIフラグメントを、hTRTがDHFR ORFと同一方向となるように、p 91023 (B) のEcoRI部位に挿入した。これにより、hTRT用の一過性発現ベクターが作製される。このインサートは、5' および3' UTRを有さないhTRTの全長cDNA、FLAG配列、およびkozak配列を含んだ。このベクターで使用した選択マーカーはテトラサイクリンである。

20

【 0 8 5 3 】

pGRN158

このベクターを、E. coliにおけるTRT配列の発現および変異誘発のために構築した。hTRT ORFを含有するpGRN151からのEcoRIフラグメントを、hTRT ORFがLacプロモーターと反対方向の方向となるように、pBBS183のEcoRI部位に挿入した。このインサートは5'および3' UTRを有さないhTRTの全長cDNA、FLAG配列、およびkozak配列を含んだ。hTRTコード配列はT7プロモーターによって駆動される。このベクターで使用した選択マーカーはアンピシリンである。

【 0 8 5 4 】

30

pGRN159

このベクターを、E. coliにおけるTRT配列の発現および変異誘発のために構築した。EGFPからhTRT融合を含有するpGRN138由来のHcl-KpnIフラグメントをpBluescript I IKS+のXbaI-KpnI部位に挿入した。これにより、融合タンパク質のためのT7発現ベクターが作製される(コード配列はT7プロモーターによって駆動される)。インサートは、EGFPを含む融合タンパク質として3' UTRを有さないhTRTの全長cDNAを含んだ。このベクターで使用した選択マーカーはアンピシリンである。

【 0 8 5 5 】

pGRN160

このベクターを、哺乳動物細胞におけるアンチセンスhTR配列の発現のために構築した。コード配列は、MPSVプロモーターに作動可能に連結されている。全長hTR ORFを含有するpGRN90からのXhoI-NsiIフラグメントをpBBS295のSalI-Sse8387I部位に挿入した。これにより、hTRアンチセンスRNAを発現する一過性 / 安定ベクターが作製される。GPTマーカーをベクターに組み込んだ。このベクターで使用する選択マーカーはChlor/gpt/PACである。

40

【 0 8 5 6 】

pGRN161

このベクターを、哺乳動物細胞においてセンスhTR配列の発現のために構築した。全長hTR ORFを含有するpGRN89からのXhoI-NniIフラグメントをpBBS295のSalI-Sse8387I部位に挿入した。これにより、センス方向でhTRを発現する一過性 / 安定ベクターが作製される。コード配列はMPSVプロモーターによって駆動される。GPTマーカーをベクターに組み込ん

50

だ。このベクターで使用する選択マーカーはChlor/gpt/PACである。

【0857】

pGRN162

全長hTR ORFを含有するpGRN87からのXhoI-NsiIフラグメントを、pBBS295のSalI-Sse8387I部位に挿入した。これにより、センス方向に短縮されたhTR (+108位 ~ +435位)を発現する一過性/安定ベクターが作製される。

【0858】

pGRN163

このベクターを、E. coliにおけるTRT配列の発現および変異誘発のために構築した。コード配列はT7プロモーターによって駆動される。オリゴヌクレオチドRA45 (5' - G C C A C C C C C G C G C T G C C T C G A G C T C C C C G C T G C - 3')をインビトロ変異誘発で使用して、hTRTにおける開始metをLeuに変化させ、そしてLeu後の次の2つのコドンにおいてXhoI部位を導入する。また、COD1941を用いて、CatRをCatSに変化させ、BSPH1部位を導入し、そしてCOD2866を用いて、AmpSをAmpRに変化させて、FSP1部位を導入する。このベクターで使用する選択マーカーはアンピシリンである。

【0859】

pGRN164

このベクターを、E. coliにおけるhTR配列の発現のために構築した。プライマーhTR+1 5' - G G G G A A G C T T T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G T T G C G G A G G G T G G G C C T G - 3'およびhTR+445 5' - C C C C G G A T C C T G C G C A T G T G T G A G C C G A G T C C T G G G - 3'を用いて、(hTR+1におけるように)PCRにより5'末端にT7プロモーターを有する全長hTRを含有するpGRN33からのフラグメントを増幅した。PCR産物のBamHI-HindIII消化物をpUC119のBamHI-HindIII部位に挿入した。コード配列はT7プロモーターに作動可能に連結した。このベクターで使用する選択マーカーはアンピシリンである。

【0860】

pGRN165

このベクターを、E. coliにおけるhTRT配列の発現および変異誘発のために構築した。コード配列はT7プロモーターに作動可能に連結する。kozak前方末端と共にhTRT ORFを含有するpGRN145からのEcoRIフラグメントを、hTRTがT7プロモーターと同一方向の方向となるように、pBluescript IISK+のEcoRI部位に挿入した。このベクターで使用する選択マーカーはアンピシリンである。

【0861】

pGRN166

このベクターを、哺乳動物細胞におけるTRT配列の発現および変異誘発のために構築した。コード配列はT7プロモーターに作動可能に連結する。kozak前方末端および後方末端のIBI flagと共にhTRT ORFを含有するpGRN151からのEcoRIフラグメントを、hTRT ORFがT7プロモーターと同一方向の方向となるようにpBluescript IISK+のEcoRI部位に挿入した。このインサートは5'および3' UTRを有さないhTRTの全長cDNA、FLAG配列 (Immunex Corp., Seattle, WA)、およびkozak配列を含んだ。このベクターで使用する選択マーカーはアンピシリンである。

【0862】

pGRN167

hTRT ORFの5'末端を含有するpGRN144からのAvRII-StuIフラグメントを、pBBS161のXbaI-StuI部位に挿入した。

【0863】

pGRN168

最適化hTRT発現カセットを含有するpGRN145からのEcoRIフラグメントを、hTRTコード配列がミニCMVプロモーターと同一方向となるように、pINDのEcoRI部位に挿入した。

【0864】

10

20

30

40

50

pGRN169

最適化hTTRT発現カセットを含有するpGRN145からのEcoRIフラグメントを、hTTRTがミニCMVプロモーターと逆方向になるように、pINDのEcoRI部位に挿入した。

【0865】

pGRN170

最適化hTTRT発現カセットを含有するpGRN145からのEcoRIフラグメントを、hTTRTがミニCMVプロモーターと逆方向になるように、pIND(sp1)のEcoRI部位に挿入した。

【0866】

pGRN171

pGRN163からのEco47III-NarIフラグメントを、pGRN167のEco47III-NarI部位に挿入し、M1 10
L変異をhTTRTゲノムDNAのフラグメントに入れた。

【0867】

pGRN172

hTTRT ORFにおけるMetからLeuの変異を含有するpGRN171からのBamHI-StuIフラグメントを、pSEAP2-BasicのBglII-NruI部位に挿入した。

【0868】

pGRN173

hTTRTプロモーター領域の5'末端を含有するpGRN144からのEcoRV-EC047IIIフラグメントを、pGRN172のSrfI-Eco47III部位に挿入した。これにより、Met1->Leu変異と共に、hTTRT ORFの開始からほぼ2.3kb上流からコード領域における第1イントロンの直後までのhTTRTのプ 20
ロモーター領域を含有するプロモーターレポータープラスミドが作製される。

【0869】

pGRN174

「最適化」hTTRT発現カセットを含有するpGRN145からのEcoRIフラグメントを、hTTRTがミニCMVプロモーターと同一方向になるように、pIND(sp1)のEcoRI部位に挿入した。

【0870】

実施例7

テロメラーゼ活性の再構成

A. インビトロにおけるhTTRTおよびhTRの共発現

本実施例では、インビトロ無細胞発現系を用いるhTTRTおよびhTRの共発現を記載する。こ 30
れらの結果は、pGRN121によってコードされるhTTRTポリペプチドが触媒的に活性なテロメラーゼタンパク質をコードし、テロメラーゼRNPのインビトロ再構成(IVR)が組換えにより発現されたhTTRTおよびhTRを用いて達成できることを示す。

【0871】

カップリングした転写-翻訳網状赤血球溶解物系(Promega TNTTM)に、hTTRT(pGRN121;XbaIで消化した1μg DNA)およびhTR(phTR+1;FspIで消化した1μg)の線状化プラスミドを添加することによって、テロメラーゼ活性を還元した。phTR+1は、FspIで線状化し、次いで、T7 RNAポリメラーゼによって転写した場合に、ヌクレオチド+1で始まり、hTRのヌクレオチド446まで伸びる445ヌクレオチド転写体を生じるプラスミドである(Autexierら, 1996, EMBO J. 15:5928)。50μl反応につき、以下の成分を添加した: 2μl TNTTM緩衝 40
液、1μl TNTTM T7 RNAポリメラーゼ、1μl 1mMアミノ酸混合物、40ユニットRnasinTM RNaseインヒビター、1μgの各線状化テンプレートDNA、および25μl TNTTM網状赤血球溶解物。成分は製造業者によって推奨される比率で添加し、30で90分間インキュベートした。転写は、T7プロモーターの指示下であり、また、網状赤血球溶解物の添加に先立って行うことができ、同様の結果であった。インキュベーションの後、プログラムされた転写-翻訳反応の5および10μlを、シグナルを増幅するために20サイクルのPCRを用い、前記したようにTRAPによってテロメラーゼ活性についてアッセイした(Autexierら, 前掲)。

【0872】

再構成の結果を図10に示す。アッセイした各転写/翻訳反応につき、3レーンがある。最初の2レーンは二連アッセイであって、第3レーンは、PCR生成人工物をなくするためのTRA 50

P相に先立って熱変性した（95℃、5分）二連試料である。

【0873】

図10に示すように、網状赤血球溶解物は単独では検出可能なテロメラーゼ活性を有さない（レーン6）。同様に、hTR単独（レーン1）または全長hTRT遺伝子（レーン4）のいずれかを溶解物に添加した場合、検出可能な活性は観察されない。両成分を添加した場合（レーン2）、特徴的な反復ラダーパターンによって示されるようにテロメラーゼ活性が生じている。hTRT遺伝子のカルボキシル末端領域を、NcoIでのベクターの消化によって除去した場合（「切形hTRT」）、テロメラーゼ活性はなくなる（レーン3）。レーン5は、切形hTRT単独の翻訳はテロメラーゼ活性を生じないことを示す。レーン「R8」は、TSR8のTRAPによって生じたテロメラーゼ産物ラダーについての陽性コントロールを示す（5'-A T T C C G T C G A G C A G A G T T A G [G G T T A G]₇-3'のヌクレオチド配列を有する合成テロメラーゼ産物）。

10

【0874】

B．インビトロでのhTRTおよびhTRの混合

テロメラーゼ活性のインビトロ再構成もまた、混合によって達成された。hTRプラスミドを添加しないこと以外は前記のように、hTRTを転写し、翻訳させた。テロメラーゼRNPの復元は、次いで、hTRT翻訳混合物と（phTR+1-FspからT7 RNAポリメラーゼ転写により予め生じた）hTRとを、hTRの2μl（1μg）に対してhTRT翻訳混合物2μlの比で混合し、次いで、30℃で90分間インキュベートされることによって達成された。hTRT/hTR復元のこの方法を「連結復元」または「連結IVR」と呼ぶ。この混合物においてテロメラーゼ活性は存在する（すなわち、検出することができる）。DEAEクロマトグラフィーによる活性の部分精製の後に、改良されたシグナルが観察された。この場合、Millipore Ultrafree-MC DEAE Centrifugal Filter Devicesを製造業者に指示に従って使用した。使用した緩衝液は、hypo0.1、hypo0.2、およびhypo1.0であり、ここでhypoは、20mM Hepes-KOH、pH7.9、2mM MgCl₂、1mM EGTA、10%グリセロール、0.1% NP-40、1mM DTT、1mMメタ重亜硫酸ナトリウム、1mMベンズアミジン、および0.2mMフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）であり、そしてここで0.1、0.2および1.0は、0.1、0.2または1.0M HClをいう。フィルターをhypo1.0で予備コンディショニングし、hypo0.1で洗浄し、復元されたテロメラーゼを添加し、カラムをhypo0.1次いでhypo0.2で洗浄し、そして再構成されたテロメラーゼを添加した容量の半分にhypo1.0で溶出した。この処方物は、-70℃にて凍結保存することができ、活性を保持する。

20

30

【0875】

テロメラーゼ活性を、2工程手法でアッセイした。工程1において、放射性標識を使用しなかったことを除き、Morin, 1989, Cell 59:521に記載されているように、通常のテロメラーゼアッセイを行った。工程2において、前記したように、TRAP手法によって、20~30サイクルで、アリコートのアッセイした。25mMトリス-HCl、pH8.3、50mM酢酸カリウム、1mM EGTA、1mM MgCl₂、2mM dATP、2mM TTP、10μM dGTP、および1μMプライマー（通常、M2, 5'-A A T C C G T C G A G C A G A G T T）の40~50μlの最終容量中にて、30で60~180分間、1-10μlの再構成テロメラーゼをアッセイすることによって、通常のアッセイを行った。95℃で5分間加熱することによって反応を停止し、1~10μlの第1工程混合物を工程2のTRAP反応（50μl）で続けた。

40

【0876】

さらなる実験において、インビトロ復元間のhTRTおよびhTRの合成を、それぞれ、³⁵S-メチオニン取り込みおよびノーザンブロッティングによってモニターした。ほぼ予測されたサイズのタンパク質が、相互に対してほぼ等モル量にて、hTRT（127kD）、hTRT-Nco（85kD）、およびpro90hTRT（90kD）について合成された。ノーザン分析は、hTR合成が正しいサイズ（445ヌクレオチド）であって、インタクトが優勢であることを示した。

【0877】

再構成プロトコル（前掲）の変形は当業者には明らかである。例えば、復元の時間および温度、および一価塩（例えば、NaCl、KCl、酢酸カリウム、グルタミン酸カリウムなど）

50

、二価塩 (MgCl_2 、 MnCl_2 、 MgSO_4 など)。変性剤 (尿素、ホルムアミドなど)、界面活性剤 (NP-40、Tween、CHAPS など) のような成分の存在または濃度、(免疫沈降、アフィニティーまたは標準的クロマトグラフィーのような) 別の改良された精製手法を使用することができる。これらのおよび他のパラメーターは、特定のアッセイまたは他の再構成プロトコルに対する条件を最適化するために体系的に変化させることができる。

【0878】

C. hTERT変異型および融合タンパク質を用いる再構成

ほぼ野生型レベルで、EGFP-hTERT、増強された緑色蛍光タンパク質とhTERTとの融合物 (実施例6および15参照)、またはエピトープタグ化hTERT (IBI FLAG、実施例6参照) 両再構成テロメラーゼ活性をhTRを用いて共発現させた場合、テロメラーゼ触媒活性の再構成が起こった。

10

【0879】

対照的に、変異型hTERT、pro90hTERT (RTモチーフB'、C、DおよびEを欠く) を使用した場合、テロメラーゼ活性は復元されなかった。これは、pro90hTERTが他の部分的活性 (例えば、RNA [すなわち、hTR] 結合能力) を有し、前記したようにインビボでテロメラーゼのドミナントネガティブなレギュレーターとして機能し得るが、十分なテロメラーゼ触媒活性を保有しないことを示す。

【0880】

D. ゲルプロットおよび通常のテロメラーゼアッセイを用いるインビトロ再構成テロメラーゼ活性のアッセイ

20

以下の実施例は、インビトロ復元した (IVR) テロメラーゼが増幅に基づくアッセイ (すなわち、TRAP) に加えて通常のテロメラーゼアッセイを用いてアッセイできることを示す。以下の反応条件: 30 における180分間の、 $40\mu\text{L}$ 最終容量の25mMトリス-HCl、pH8.3、50mM酢酸カリウム、1mM EGTA、1mM MgCl_2 、0.8mM dATP、0.8mM TTP、1.0mM dGTP、および $1\mu\text{M}$ プライマー (M2、前掲; またはH3.03、5' - T T A G G G T T A G G G T T A G G G) 中の $1\text{--}10\mu\text{L}$ の連結したIVRテロメラーゼを用いるゲルプロットアッセイを使用して、パート (B) に記載したようなIVRテロメラーゼ (前掲) (「連結復元方法」)、続いて前記したようにDEAE精製を行ったIVRテロメラーゼをアッセイした。合成されたテロメリックDNAを標準的な手法によって単離し、8%ポリアクリルアミド/8M尿素ゲルで分離し、ナイロン膜に移し、ドットプロットアッセイで用いた ^{32}P -(CCCTAA) $_n$ リボプローブを用いてプローブした。このプローブは、モノQおよびヘパリンクロマトグラフィーによって精製された $5\mu\text{L}$ の天然核テロメラーゼにつき観察されたラダーと同等の $10\mu\text{L}$ のIVRテロメラーゼを表すレーンにおいて、6ヌクレオチドラダーを同定した。結果は、IVRテロメラーゼが天然テロメラーゼと同等の進行的テロメラーゼ触媒活性を保有することを示す。

30

【0881】

また、通常の ^{32}P -dGTP取り込みテロメラーゼアッセイによって、連結IVRテロメラーゼをアッセイした。前記したように、連結再構成方法により調製し、続いてDEAE精製を行ったIVRテロメラーゼを、進行的および非進行的の両反応条件下でアッセイした。アッセイ条件は、30 [進行的反応] または37 [非進行的反应用] における180分間の、 $10\mu\text{M}$ ^{32}P -dGTP (720Ci / ミリモル) [進行的条件のアッセイ用] または $1\mu\text{M}$ ^{32}P -dGTP (720Ci / ミリモル) [非進行的用]、および $1\mu\text{M}$ プライマー (すなわち、H3.03、前掲) を含む、25mMトリス-HCl、pH8.3、50mM酢酸カリウム、1mM EGTA、1mM MgCl_2 、2mM dATP、2mM TTPの $40\mu\text{L}$ の最終容量の中の $5\text{--}10\mu\text{L}$ 連結IVRテロメラーゼであった。合成されたテロメリックDNAを標準的な手法によって単離し、そして8%ポリアクリルアミド/8M尿素ゲル配列決定ゲルで分離した。進行的反応は、進行的テロメラーゼ反応と合致する弱い6ヌクレオチドラダーを示し、そして非進行的反応は、1の反復を付加した。これは、天然テロメラーゼ調製物を用いるコントロール反応と同等のパターンである。IVRテロメラーゼを用いる通常のアッセイは、本明細書に記載するテロメラーゼモジュレーターについてのスクリーニング、ならびにテロメラーゼの構造および機能特性の解明のような他の用途で有用である。

40

50

【0882】

E. インビトロ復元テロメラーゼはプライマー3'末端を認識する

本実験は、IVRテロメラーゼが、天然（精製）テロメラーゼと同等にプライマー3'末端を認識することを示す。テロメラーゼはプライマー3'末端およびhTRのテンプレート領域との間に塩基対合二重鎖を形成し、そして次の特定されるヌクレオチドを付加する（Morin, 1989, 前掲）。IVR（組換え）テロメラーゼが同一特性を有することを確認するために、前記にて詳細に記載した2工程の通常 / TRAPアッセイによってアッセイしたIVRおよび天然のテロメラーゼを用い、- - - G G Gまたは- - - T A G 3'末端を有するプライマー（A A T C C G T C G A G C A G A G G GおよびA A T C C G T C G A G C A G A T A G）の反応を、- - - G T T 3'末端（M2前掲）を有するプライマーと比較した。標準プライマー（- - - G T T 3'末端）と比較すると、- - - G G Gおよび- - - T A Gプライマーの産物ラダーは、それぞれ、+4および+2シフトし、天然テロメラーゼで観察されたものと同じ効果であった。この実験は、IVRおよび天然のテロメラーゼが同様にプライマー末端を認識することを示す。

10

【0883】

これらの結果は、（IVRテロメラーゼが進行的および非進行的な両触媒活性を保有することを示す前掲の結果と共に）IVRテロメラーゼが天然もしくは精製のテロメラーゼと比較して同様の構造および特性を有することを示す。

【0884】

実施例 8

20

抗hTERT抗体の生産

A. hTERTペプチドに対する抗hTERT抗体の生産

抗hTERT抗体を生産するために、アミノ末端残基としてC（システイン）を付加させて、hTERT由来の以下のペプチドを合成した（図54参照）。

【0885】

【化16】

S-1: FFY VTE TTF QKN RLF FYR KSV WSK

S-2: RQH LKR VQL RDV SEA EVR QHR EA

S-3: ART FRR EKR AER LTS RVK ALF SVL NYE

A-3: PAL LTS RLR FIP KPD GLR PIV NMD YVV

30

【0886】

システイン部分を用いて、ペプチドをBSAおよびKLH [キイホールリンベットヘモシアニン] キャリアータンパク質に固定化（すなわち、共有結合）させた。KLH - ペプチドを抗原として使用した。BSA - ペプチドコンジュゲートを、免疫抗血清の特異性を試験するためにELISA用材料として供した。

【0887】

40

KLH - ペプチドコンジュゲートをニュージーランド白ウサギに注射した。初回の注射は腋窩および鼠径リンパ節近位に注射物を置くことによってなされる。追加注射は筋肉内で行った。初回の注射のために、抗原をフロイントの完全アジュバントで乳化し；追加注射のために、フロイントの不完全アジュバントを用いた。ウサギには続いて3週間のブーストサイクルを行い、ここで、20~25mlの血清を生じる50mlの血液を各ブーストの10日後に採取する。ウェスタンブロットに際して、4つのペプチドのそれぞれに対する抗血清は、組換えhTERT融合タンパク質のhTERT部分（GST-HIS₆-hTERT - フラグメント2426~3274；実施例6参照）を認識した。

【0888】

PCT出願第97 / 06012号に記載されているように生産されたヒト293細胞からの部分的精製

50

テロメラーゼ画分（粗製核抽出物と比較してほぼ1000倍精製）およびアフィニティー精製抗S-2抗体を用い、130kdタンパク質のダブレットがウェスタンブロットで検出できた。感受性化学ルミネセンス検出方法を用いた（SuperSignal化学ルミネセンス基質、Pierce）が、ブロットでのシグナルは弱く、これは、hTERTがこれらの不死化細胞では低いまたは非常に低い量で存在することを示す。ダブレットの観察は、hTERTの翻訳後修飾、すなわち、リン酸化またはグリコシル化と合致する。

【0889】

アフィニティー精製のために、S-2ペプチドを、製造業者のプロトコルに従ってそのN末端システイン残基を介してSulfoLink（Pierce, Rockford, IL）に固定化した。KLH-S-2ペプチド抗原で免疫化したウサギからの第1の採血血清をS-2-SulfoLinkに添加し、そしてS-2ペプチドに特異的に結合した抗体を溶出させた。

10

【0890】

B. hTERT融合タンパク質に対する抗hTERT抗体の生産

GST-hTERT融合タンパク質を、実施例6に記載したGST-hTERTフラグメント#4（ヌクレオチド3272～4177）およびGST-HIS8-hTERTフラグメント#3（ヌクレオチド2426～3274）タンパク質としてE. coliで発現させた。融合タンパク質を不溶性タンパク質として精製し、そして抗原の純度をSDSポリアクリルアミドゲルによってアッセイし、GST-hTERTフラグメント#4組換えタンパク質につき約75%の純度、およびGST-HIS8-hTERTフラグメント#3組換えタンパク質につき75%を超える純度が見積もられた。日常的な方法が、90%を超える純度でこれらのおよび他の融合タンパク質を得るために用いることができる。これらの組換えタンパク質を用いて、ウサギおよびマウスの双方を前記したように免疫化した。

20

【0891】

マウスおよびウサギ双方からの第1および第2採血を、固定化GSTを含有するマトリックスを用いて、抗GST抗体の除去後における抗hTERT抗体の存在について、試験した。抗血清を、固定化組換えGST-hTERT融合タンパク質を用いるウェスタンブロットティングによって、および部分的に精製した天然テロメラーゼ酵素を用いる免疫沈降によって、抗hTERT抗体について試験した。これらの初期採血ではシグナルは観察されなかったが、予測されるような抗hTERT抗体の力価は引き続いての採血で増加した。

【0892】

実施例9

30

182 RNA変異体に対応するhTERT mRNAの検出

ヒト睾丸および293細胞株からのポリA⁺RNAを、RT-PCRおよびネスト化プラスマーを用い、hTERT mRNAについて分析した。第1プライマーセットはTCP1.1およびTCP1.15であり；第2プライマーセットはTCP1.14およびBTCP6であった。それぞれからの増幅は182bpだけ異なる2つの産物を与えた；睾丸RNAからの大および小産物を配列決定し、それぞれ、確かにpGRN121（図16）および712562クローン（図18）に相当することが判明した。変異型hTERT RNA産物はSW39i、OVCAR4、293、および睾丸からのmRNAで観察された。

【0893】

さらなる実験を行って、182 cDNAが逆転写の人工物ではないことが示された。略言すれば、全長hTERT RNA（すなわち、欠失なし）を、RT-PCR用のテンプレートとして使用するpGRN121のインビトロ転写によって生産した。42 または50 で、ランダム-プライマーまたは特異的プライマーにて、Superscript[®] 逆転写酵素（Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD）を用いて別々のcDNA合成反応を行った。15PCRサイクル後、長い産物が検出できた；しかしながら、小さな産物（すなわち、欠失に対応する）は30以上のサイクルの後でも検出できなかった。これは、RT-PCR産物が人工物ではないことを示す。

40

【0894】

実施例10

睾丸hTERT mRNAの配列決定

hTERT RNAの睾丸形態の配列は、ThermoSequenase放射性標識ターミネーターサイクル配列決定キット（Amersham Life Science）を用い、睾丸cDNA（Marathon Testes cDNA, Clontech

50

ch, San Diego, CA)からのPCRによって生成したDNAフラグメントの直接的自動配列決定によって決定した。PCR工程は表 2 2 に示すようにネスト化PCRによって行った。全ての場合において、cDNAなしのプライマーとの陰性コントロール反応を行った。コントロール反応において産物が存在しないことは、存在するcDNAとの反応に由来する産物が、pGRN121または他の細胞供給源（例えば、293細胞）からのhTERTの汚染によるものではないことを示した。DNAフラグメントをアガロースゲルから切り出して、配列決定に先立って、DNAを精製した。

【 0 8 9 5 】

pGRN121挿入配列の塩基27～3553に対応し、全hTERT ORF（塩基56～3451）を含有する睾丸mRNA配列が得られた。この領域において、睾丸およびpGRN121配列の間で差異はなかった。

10

【 0 8 9 6 】

【表 2 2 】

フラグメント	プライマー-セット 1	プライマー-セット 2	配列サイズ	画記列用 プライマー
OA	na	K320/K322	208	K320, K322
A	K320/TCP1.43	TCP1.40/TCP1.34	536	TCP1.52, TCP1.39, K322, TCP1.40, TCP1.41, TCP1.30, TCP1.34, TCP1.49
B	TCP1.42/TCP1.32B	TCP1.35/TCP1.21	492	TCP1.35, TCP1.28, TCP1.38, TCP1.21, TCP1.46, TCP1.33, TCP1.48
C	TCP1.65/TCP1.66	TCP1.67/TCP1.68	818	TCP1.67, TCP1.32, TCP1.69, TCP1.68, TCP1.24, TCP1.44, K303
D2	K304/billTCP6	LT1/TCP1.6	546	LT2, LT1, TCP1.6, bTCP4, TCP1.13, TCP1.77, TCP1.1
D3	TCP1.12/TCP1.7	TCP1.14/TCP1.15	604	TCP1.6, TCP1.14, TCP1.73, TCP1.78, TCP1.25, TCP1.15, TCP1.76
EF	na	TCP1.74/TCP1.7	201	TCP1.74, TCP1.7, TCP1.75, TCP1.15, TCP1.3
E	TCP1.3/TCP1.4	TCP1.2/TCP1.9	687	TCP1.2, TCP1.8, TCP1.9, TCP1.26
F	TCP1.26/UTR2	TCP1.10/TCP1.4	377	TCP1.4, TCP1.10, TCP1.11

【 0 8 9 7 】

実施例 1 1

RNase保護によるhTRT mRNAの検出

RNase保護アッセイを、hTRT mRNAまたは変異型mRNAの存在を検出し、モニターし、または診断するために用いることができる。1の例示的RNase保護プローブは、hTRT mRNA配列に相補的な配列ならびに追加の非相補的配列よりなるインビトロ合成したRNAである。後者の配列は、アッセイにおける陽性結果から生じるプローブのフラグメントと全長プローブ

10

20

30

40

50

とを区別するために含まれる。陽性アッセイでは、プローブの相補的配列はRNase消化から保護される。何故ならば、それらはhTRT mRNAにハイブリダイズするからである。非相補的配列を、RNaseおよび標的相補的核酸の存在下で、プローブから消化して取り去る。

【0898】

2つのRNase保護プローブを例示のために記載する：いずれもアッセイで利用できる。プローブはhTRTに相補的なそれらの配列において異なるが、本実施態様では、SV40後期mRNAリーダー配列に由来する同一の非相補的配列を含有する。5'から3'へ、1のプローブは、非相補的配列の33ヌクレオチドおよび227ヌクレオチドの全長プローブサイズのhTRTヌクレオチド2513 - 2707に相補的な配列の194ヌクレオチドよりなる。5'から3'へ、第2のプローブは、非相補的配列の33ヌクレオチドおよび231ヌクレオチドの全長プローブサイズのhTRTヌクレオチド2837 - 3035に相補的な配列の198ヌクレオチドよりなる。アッセイを行うためには、いずれかのプローブを、試験試料からのRNA、すなわちポリA+RNAにハイブリダイズさせることができ、次いで、T1リボヌクレアーゼまたはRNaseAを添加する。消化の後、プローブRNAを精製し、ゲル電気泳動によって分析する。227ヌクレオチドプローブの194ヌクレオチドフラグメントおよび231ヌクレオチドプローブの198ヌクレオチドフラグメントは試料におけるhTRT mRNAの指標である。

【0899】

本実施例に記載した例示的RNase保護プローブは、T7 RNAポリメラーゼを用い、インビトロ転写によって生じさせることができる。放射性または他の方法で標識したリボヌクレオチドを標識プローブの合成用に含ませることができる。RNAプローブを生産するインビトロ転写反応のためのテンプレートはPCR産物である。これらの例示的プローブは、hTRT遺伝子またはmRNAの対応する相補的領域にまたがるプライマーを用いるpGRN121 DNAのPCR増幅後にT7ポリメラーゼを用いて、合成することができる。加えて、下流プライマーはT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列および非相補的配列を含有する。

【0900】

第1のRNase保護プローブの生成のために、以下のプライマー対（T701およびリバーズ01）からのPCR産物を用いる：

【0901】

【化17】

T701 5'-GGGAGATCT TAATACGACTCACTATAG ATTCA GGCCATGGTG
CTGCGCCCGGC TGTCA GGCTCCC ACGACGTAGT CCATGTTTCAC-3'; および
リバーズ 01 5'-GGGTCTAGAT CCGGAAGAGTGT CTGGAGCAAG-3'.

【0902】

第2のRNase保護プローブの生成のために、以下のプライマー対（T702およびリバーズ02）からのPCR産物を用いる；

【0903】

【化18】

T702 5'-GGGAGATCT TAATACGACTCACTATAG ATTCA GGCCATGGTG
CTGCGCCCGGC TGTCA GGGCG GCCTTCTGGA CCACGGCATA CC-3'; および
リバーズ 02 5'-G GTCTAGA CGATATCC ACAGGGCCTG GCGC-3'.

【0904】

実施例12

hTRTおよび他の逆転写酵素を比較する系統樹の構築

系統樹（図6）を、XiongおよびEickbush（1990, EMBO J. 9:3353）によって定義された7つ

10

20

30

40

50

のRTドメインの比較によって構築した。4つのTRT、67のRT、および3つのRNAポリメラーゼからのモチーフ1、2、およびA - Eの配列アラインメントの後、NJ (隣接結合) 方法 (SaitouおよびNei, 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406) を用いて系統樹を構築した。系統樹の同一枝に位置する同一クラスからの要素をボックスとして単純化する。各ボックスの長さは、そのボックス内の最も発散した要素に対応する。

【0905】

TRTは、LTR - レトロトランスポゾンおよびウイルスRTよりも、msDNA、グループIIイントロン、および非LTR (長末端反復) レトロトランスポゾンに関連するRTに、より密接に関係するようである。これらの後者の要素がショウジョウバエにおいてテロメア維持のためにテロメラーゼを置き換えたとすれば、レトロ要素の非LTR枝に対するテロメラーゼRTの関係は興味深い。しかしながら、最も驚くべき発見は、TRTが、以前に知られているRTのいずれかに関してポリオウイルスのようなプラス鎖RNAウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼにほとんど密接に関連している離れた亜群を形成するということである。4つのテロメラーゼ遺伝子が進化的に距離のある生物 - - 原生動物、菌類、および哺乳動物 - - に由来することを考慮すると、この別々のグループ分けは、データセットにおける系統発散の欠如によって説明することができない。事実、この深い分岐は、テロメラーゼRTが、恐らくは第1真核生物とともに始まる古代群であることを示唆する。

【0906】

系統樹分析で使用したGenBankタンパク質同定または受託番号は以下の通りであった：msDNA (94535、134069、134074、134075、134078)、グループIIイントロン (483039、101880、1332208、1334433、1334435、133345、1353081)、ミトコンドリアプラスミド/RTL (903835、134084)、非LTRレトロトランスポゾン (140023、84806、103221、103353、134083、435415、103015、1335673、85020、141475、106903、130402、U0551、903695、940390、2055276、L08889)、LTRレトロトランスポゾン (74599、85105、130582、99712、83589、84126、479443、224319、130398、130583、1335652、173088、226407、101042、1078824)、ヘパドナウイルス (I18876、1706510、118894)、カウリモウイルス (331554、130600、130593、93553)、レトロウイルス (130601、325465、74601、130587、130671、130607、130629、130589、130631、1346746、130651、130635、1780973、130646)。アラインメントはClustalW 1.5 [J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, Nucleic Acids Res. 22, 4673 (1994)] およびPHYLP 3.5 [J. Felsenstein, Cladistics 5, 164 (1989)] を用いて分析した。

【0907】

実施例13

コントロールプラスミドおよびhTRTをコードするプラスミドでの培養ヒト線維芽細胞 (BJ) のトランスフェクション

本実施例は、哺乳動物細胞における組換えhTRTタンパク質の発現の結果、活性テロメラーゼが生成されることを示す。

【0908】

サブコンフルエントなBJ線維芽細胞をトリプシン処理し、そして 4×10^6 細胞 / ml の濃度にて、新鮮な培地 (10% ウシ胎児血清を含有するDMEM / 199) に再懸濁した。BioRad Gene PulserTM エレクトロポレーターでのエレクトロポレーションを用い、細胞をトランスフェクトした。必要に応じて、製造業者の指示に従い、SuperfectTM 試薬 (Qiagen) を用い、細胞をトランスフェクトしてもよい。エレクトロポレーションでは、500 μ l の細胞懸濁液をエレクトロポレーションキュベット (BioRad, 0.4cm電極ギャップ) に入れた。プラスミドDNA (2 μ g) をキュベットに添加し、懸濁液を静かに混合し、そして氷上で5分間インキュベートした。コントロールプラスミド (pBBS212) は、MPSVプロモーターの後にはインサートを含まず、実験プラスミド (pGRN133) はMPSVプロモーターからhTRTを発現した。300ボルトおよび960 μ FDで細胞をエレクトロポレートした。パルスを送った後、キュベットを氷上に約5分間置き、その後、100mm組織培養皿で培地中に播種した。6時間後、培地を新鮮な培地で置き換えた。トランスフェクションの72時間後、細胞をトリプシン処

10

20

30

40

50

理し、PBSで1回洗浄し、ペレット化し、そして - 80 で凍結保存した。細胞抽出物を、改変された界面活性剤溶解法 (Bodnarら, 1996, Exp. Cell. Res. 228:58; Kimら, 1994, Science 266:2011参照, および前掲のTRAPアッセイに関連する特許および出版物に記載される) によって $25,000$ 細胞 / μ l の濃度で調製し、そして細胞抽出物におけるテロメラーゼ活性を、改変されたPCRに基づくTRAPアッセイ (Kimら, 1994, Bodnarら, 1996) を用いて測定した。略言すれば、 5×10^4 細胞当量を反応のテロメラーゼプライマー伸長部分で用いた。抽出物は、典型的には、PCR増幅に対するテロメラーゼ伸長反応から直接採取されたが、また、PCR増幅に先立って、フェノール/クロロホルムで1回、およびクロロホルムで1回洗浄抽出され得る。1/5の物質をTRAP反応のPCR増幅部分で使用した (ほぼ $10,000$ 細胞当量)。TRAP反応の1/2を、図25における各レーンが $5,000$ 細胞当量からの反応産物を表すように、分析のためにゲルに負荷した。pGRN133でトランスフェクトした細胞由来の抽出物はテロメラーゼ活性につき陽性であり、他方、トランスフェクトされない (示さず) またはコントロールプラスミドでトランスフェクトされた細胞由来の抽出物はテロメラーゼ活性を示さなかった。RPE細胞を用いる同様の実験は、同一の結果を与えた。

【0909】

また、BJ細胞における再構成はまた、他のhTERT構築物 (すなわち、pGRN145、pGRN155およびpGRN138) を用いて行った。これらの構築物を用いる再構成は、pGRN133トランスフェクト細胞におけるよりも多くのテロメラーゼ活性が生じるようであった。

【0910】

最高レベルのテロメラーゼ活性は、pGRN155を用いて達成された。前記にて議論したように、pGRN155は、hTERTの発現のための制御エレメントとしてアデノウイルス主要後期プロモーターを含有するベクターであり、BJ細胞にトランスフェクトした場合、テロメラーゼ活性を再構成することが示された。

【0911】

注目すべきことに、hTERT-GFP融合タンパク質 (これは核に局在化する、後記実施例15参照) を用いて再構成が行われた場合、pGRN138は、インビトロ (実施例7参照) またはインビボ (BJ細胞へのトランスフェクション) のいずれかのテロメラーゼ活性が得られた。例えば、前記のようにBJ細胞へのトランスフェクションによって、テロメラーゼ活性は、pGRN133またはpGRN145を用いるインビトロ再構成から得らる活性に匹敵した。

【0912】

同様の結果が、本発明のhTERT発現ベクターを用いる、正常ヒト網膜色素沈着上皮 (RPE) のトランスフェクションに際して得られた。RPE細胞の老化は、老化関連の斑状変性の疾患に寄与するか、あるいはそれを引き起こすと考えられる。本発明のhTERT発現ベクターを用いる本発明の方法により処理したRPE細胞は、未処理細胞と比較して、遅延した老化を示すはずであり、従って、老化関連の斑状変性を処置または防止する移植療法で有用である。

【0913】

実施例14

プロモーターレポーター構築物

本実施例は、レポーター遺伝子がプロモーターエレメントを含有するhTERT上流配列に作動可能に連結したプラスミドの構築を記載する。ベクターは、インビボでのシスおよびトランスの転写調節因子の同定およびhTERT発現を調節 (例えば、活性化または阻害) し得る薬剤のスクリーニング (例えば、薬物スクリーニング) を含む多数の用途を有する。多数のレポーターを使用できるが (例えば、ホタルルシフェラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、およびGFP等)、ヒト分泌アルカリホスファターゼ (SEAP, Clone Tech) を最初の実験で使用した。SEAPレポーター遺伝子は、膜固定ドメインを欠く胎盤酵素の切形形態をコードし、それによりタンパク質がトランスフェクト細胞から効果的に分泌されることを可能とする。培養培地中で検出されるSEAP活性のレベルは、SEAP mRNAおよびタンパク質の細胞内濃度の変化に直接比例することが示されている (Bergerら, 1988, Gene 66:1; Cullenら, 1992, Met

10

20

30

40

50

h. Enzymol. 216:362)。

【0914】

4つの構築物 (pGRN148、pGRN150、「pSEAP2ベーシック」(プロモーター配列無し = 陰性コントロール) および「pSEAP2コントロール」(SV40初期プロモーターおよびエンハンサーを含有) を、有寿命性細胞および不死細胞に三連にてトランスフェクトした。

【0915】

プラスミドpGRN148を、図9に例示するように構築した。略言すると、pGRN144からのBgl2-Eco47IIIフラグメントを消化し、そしてpSeapBasic (Clontech, San Diego, CA)のBglII-NruI部位にクローン化した。第2のレポーター - プロモーター、プラスミドpGRN150は、実施例3に記載したhTRTイントロンからの配列を含み、このイントロンに存在し得る調節配列を使用する。プロモーター領域後の第2のATGがSEAP ORFの開始ATGとなるように、開始MetをLeuに変異する。

10

【0916】

(hTRTプロモーターを含む) pGRN148およびpGRN150構築物を有寿命性細胞 (BJ細胞) および不死細胞 (293) にトランスフェクトした。全てのトランスフェクションを2つのコントロールプラスミド: 1つの陰性コントロールプラスミド (pSEAPベーシック) および1つの陽性コントロールプラスミド (SV40初期プロモーターおよびSV40エンハンサーを含有するpSEAPコントロール) と平行して行った。

【0917】

不死細胞では、pGRN148およびpGRN150構築物は、(SV40初期プロモーターおよびエンハンサーを含有する) pSEAP2陽性コントロールと同程度に効果的にSEAP発現を行うようである。対照的に、不死細胞においては、pSEAP2コントロールのみが検出可能な活性を与えた。これらの結果は、予測されるように、hTRTプロモーター配列が有寿命性細胞ではなく、腫瘍細胞で活性であることを示す。

20

【0918】

同様の結果が、別の正常細胞株 (RPE、または網膜色素沈着上皮細胞) を用いて得られた。(2.2KBの上流ゲノム配列を含有する) pGRN150でトランスフェクトしたRPE細胞において、hTRTプロモーター領域は不活性であり、他方、pSEAP2コントロールプラスミドは活性であった。

【0919】

前記したように、レポーター遺伝子が、プロモーターエレメントを含有するhTRT上流配列に作動可能に連結しているプラスミドは、一過性および安定なトランスフェクション技術の両方を用いる、テロメラーゼ活性調節剤の同定およびスクリーニングで極めて有用である。1つのアプローチにおいて、例えば、Ausubelら (1997) (前掲) に従って、(neoのような) 真核生物の選択マーカーとの共トランスフェクションによって、pGRN148の安定な形質転換が、テロメラーゼ陰性およびテロメラーゼ陽性の細胞でなされる。得られた細胞株は、例えば、試験化合物の存在下または非存在下で、hTRT - プロモーター - 駆動の発現を比較することによって、推定テロメラーゼ調節剤のスクリーニングに使用される。

30

【0920】

本発明のプロモーター - レポーター (および他の) ベクターはまた、トランス - およびシス - 作用性の転写および翻訳調節エレメントを同定するために使用される。シス - 作用性転写調節エレメントの例は、テロメラーゼ遺伝子のプロモーターおよびエンハンサーを含む。シス - およびトランス - 作用性の調節剤の同定および単離は、テロメラーゼの転写および翻訳を調節する薬剤を同定するためのさらなる方法および試薬を提供する。

40

【0921】

実施例 15

hTRTの細胞下 (subcellular) 局在化

hTRTおよび増強された緑色蛍光タンパク質 (EGFP; Cormackら, 1996, Gene 173:33) の領域を有する融合タンパク質を後記するように構築した。EGFP部分は、融合タンパク質の存在または位置が容易に決定できるような検出可能なタグまたはシグナルを提供する。EGFP

50

- 融合タンパク質は正しい細胞区画に局在化するので、この構築物を用いて、hTERTタンパク質の細胞下局在化を決定することができる。

【0922】

A . pGRN138の構築

哺乳動物細胞におけるhTERT-EGFP融合タンパク質の発現用ベクターは、pGRN124（実施例6参照）由来のEcoRIインサートをpEGFP-C2（Clonetech, San Diego, CA）のEcoRI部位に入れることによって構築した。融合タンパク質のアミノ酸配列を以下に提供する。EGFP残基は太字で示し、hTERT mRNAの5'非翻訳領域によってコードされる残基には下線を施し、そしてhTERTタンパク質配列は通常の字体で示す。

【0923】

【化19】

```

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVWPWT
LVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDTL
VNRIELKGIDFKEDGNILGEKLEYNTYNHNHNYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA
DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKPDHVVLLLEFVTAAGITLGMDELYKS
GRTQISSSSFEFAAATQPCVLLLEETNEALAPATPAMPAPRCRAVRSLRSHYREVLPLA
TFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCPWDARPPPAAPSFQVSCCLKELVARVL
QRLCERGAKNVLAFFGALLDGGARGGPFPAFTTSVRSYLENTVTDALRGSGAWGLLLRRVG
DDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPPLYQLGAATQARPPPHASGPRLRLGCERAWNH
SVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPPEPERTFVGQGSWAHPGRTRGP
SDRGFCVVSPPAPAEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTSRPPRPWDTPCPFPVY
AETKHFLLYSSGQKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRFWMPTPRRLPRLPQR
YVQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLPAAVTPAAGVCAREKPOGSVAAPPEEDTDP
RRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNRRLRNTKKFISLGKHAQLSL
QELTWKMSVRDCANLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWMMSVTVVELLSFFVYTE
TTFQKNRLFFYRPSVWSKLQSIGIRQLKRVQLRELSEAEVRQHQREARFALLTSRLRFIP
KPDGLRPIVNM DYVVGARTFRREKPAERLTSRVKALFSVLNYPAPRRPGLLGASVLGLDD
IHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYA
VVQKAANGHVVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDADVIEQSSSLNEASSGL
FDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPOGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRPDGLLLR
LVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVPEDEALGGTAFVQMPAH
GLFPWCGLLLDTRTLEVSQSDYSFYARTSIPASVTFNRGFKAGRNMRKLPGLVPLKCHSL
FLDLQVNSLQTVCTNIYKILLLAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYS
ILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTQHRVTYVPLLGSRLTAQTQLSR
KLPGTTTLTALEAAANPALPSPDFKTILD

```

【0924】

部分的（例えば、切形的）hTERTコード配列を用い、他のEGFP融合構築物を作製することができ、後記するようにこれをを用いて、hTERTポリペプチドの特定の領域の活性を同定することができる。

【0925】

B . pGRN138の核局所化および使用

pGRN138でのMIH293細胞およびBJ細胞のトランスフェクションにより、組換えにより発現されたhTERTの核局所化が確認された。pGRN138（EGFP-hTERT）および（EGFPのみを発現する）コントロール構築物で細胞をトランスフェクトした。EGFP-hTERTの核局所化は、蛍光顕微鏡により両細胞タイプで明らかである。前記したように、pGRN138 hTERT-GFP融合タンパク質は、BJ細胞にトランスフェクトした場合にはインビトロ転写翻訳系およびインビボ系の双方で、テロメラーゼ活性の再構成を支持する。

【0926】

hTERT-EGFP融合タンパク質（または同様の検出可能な融合タンパク質）を種々の適用で使うことができる。例えば、本実施例で記載する融合構築物、またはEGFPの構築物およびhTERTの切形形態を用いて、hTERT、ならびに細胞核に侵入し、および/または染色体末端に局所化する変異型を能力を評価することができる。さらに、pGRN138を用いて安定また

10

20

30

40

50

は一過的にトランスフェクトされた細胞は、テロメラーゼ調節薬物または化合物を同定するための化合物をスクリーニングするのに使用される。核局所化またはテロメラーゼ局所化を妨害する薬剤は、テロメラーゼインヒビターとして同定できる。EGFP-hTERTを安定に発現する腫瘍細胞株はこの目的に有用であり得る。テロメラーゼの潜在的なモジュレーターを、これらのトランスフェクトされた細胞に投与し、そしてEGFP-hTERTの局所化が評価される。さらに、FACSまたは他の蛍光に基づく方法は、hTERTを発現する細胞を選択して、特に細胞の一過性トランスフェクションを使用する場合に、薬物スクリーニングのための同種集団を提供するために使用され得る。

【0927】

別の適用において、hTERTの領域を変異誘発させて、抗テロメラーゼ薬物（テロメラーゼ活性モジュレーター）についての標的である、核局所化に必要な領域（例えば、残基193 - 196（PRRR）および235 - 240（PKRRR））を同定することができる。他の適切な適用は、以下を含む；

一過性トランスフェクション実験のため、およびEGFP-hTERTを発現する安定な細胞株を確立する場合のための両方の効率的な細胞トランスフェクションの蛍光マーカーとしての融合タンパク質の使用；

hTERT変異体 - EGFPが、hTRを細胞質に保持し、テロメラーゼ維持を防止する不死細胞の全てのhTRを一掃するように、不死細胞における（核局所化に不十分な）変異した核局所化シグナルを伴うhTERT-EGFP融合の発現；および

免疫沈降のためのタグ化タンパク質としての使用。

【0928】

実施例 16

テロメラーゼ触媒活性に対する変異の効果

本実施例は、変化したアミノ酸および変化した触媒活性を有するhTERT変異型タンパク質を記載する。アミノ酸置換、続いての機能的分析は、ポリペプチド配列の重要性および機能を評価する標準的手段である。本実施例は、逆転写酵素（RT）およびテロメラーゼ（T）のモチーフの変化がテロメラーゼ触媒活性に影響することを示す。

【0929】

通常の名法を用いて、変異体を記載する；天然分子（hTERT）における標的残基は、一文字コードおよび位置によって同定され、変異タンパク質における対応する残基は、一文字コードによって示される。従って、例えば、「K626A」は、hTERTの626位における（すなわち、モチーフ1における）リジンがアラニンに変化した変異体を特定する。

【0930】

A．hTERT FFYxTEモチーフの変異

最初の実験において、標準的な技術を用いるpGRN121の部位特異的変異誘発によってhTERTのアミノ酸560がフェニルアラニン（F）からアラニン（A）に変化した、hTERT変異タンパク質「F560A」をコードするベクターを産生した。この変異は、TRTのFFYxTEモチーフを破壊する。得られたF560A変異ポリヌクレオチドは、³⁵S - メチオニンの存在下での無細胞の網状赤血球溶解物転写 / 翻訳系を用いて評価されるように、全長hTERTタンパク質の合成を行うことが示された。

【0931】

変異ポリペプチドを実施例7で記載したようにhTERTと共翻訳した場合、20サイクルのPCRを用いるTRAPにより観測されるように、テロメラーゼ活性は検出されなかったが、コントロールhTERT/hTR共翻訳は活性を再構成した。TRAPアッセイにおける30サイクルのPCRで、テロメラーゼ活性は変異hTERTで観察できたが、コントロール（野生型）hTERTよりもかなり低かった。

【0932】

B．hTERTアミノ酸残基のさらなる部位特異的変異誘発

標準的な部位特異的変異誘発技術（例えば、Ausubel, 前掲参照）を用い、6つのRTモチーフにおける保存されたアミノ酸をアラニンに変化させて、触媒活性に対するそれらの貢献を

10

20

30

40

50

評価した。実施例7に詳細に記載した2工程の通常の / TRAPアッセイを用いる IVRテロメラ
ーゼを用い、変異体をアッセイした。

【 0 9 3 3 】

K626A (モチーフ1)、R631A (モチーフ2)、D712A (モチーフA)、Y717A (モチーフA)
、D868A (モチーフC) の変異体は、大きく減少したかまたは検出できないテロメラ
ーゼ活性を有したが、Q833A (モチーフB) およびG932A (モチーフE) の変異体は中レベルの
活性を呈した。RTモチーフの外側の2つの変異体、R688AおよびD897Aは、野生型hTRTと同
等の活性を有した。これらの結果は、逆転写酵素における類似の変異と合致し (Joyceら,
1994, Ann. Rev. Biochem. 63:777)、そしてEst2pで得られた結果と同様である (Lingne
r, 1997, Science 276:561参照)。実験は、酵素活性に重要および重要でないR Tモチーフ
における残基を同定し、そしてhTRTがヒトテロメラーゼの触媒タンパク質であることを
示す。変異は、例えば、テロメラーゼ活性の優性 / 陰性のレギュレーターとしての利用性
を有する変異hTRTポリペプチドを提供する。

10

【 0 9 3 4 】

既知のTRTのアミノ酸のアライメントは、テロメラーゼ特異的モチーフ、モチーフT (前
掲参照) を同定した。hTRTにおけるこのモチーフの触媒的な役割を決定するために、標準
的な部位特異的変異誘発技術 (Ausubel, 前掲) を用いてこのモチーフにおける6つのアミノ
酸欠失 (560 - 565; FFYxTE) を構築した。実施例7に詳細に記載した2段階の通常 / TRAP
アッセイを用い、欠失をIVRテロメラーゼを用いてアッセイした。560 - 565変異体は観
察可能なテロメラーゼ活性を25サイクルのPCRの後に有さず、他方、野生型hTRT IVRテロ
メラーゼは強力なシグナルを生じた。モチーフT内の各残基における各アミノ酸を同様な
方法で独立して調べた; 変異体F560A、Y562A、T564、およびE565Aは中レベルのテロメラ
ーゼ活性を保持し、他方、コントロール変異体F487Aは活性に対して最小の影響を有した
。注目すべきは、変異体F561Aは、大きく減少したかまたは検出できないテロメラーゼ活
性を有し、他方、活性はその「復帰変異体」F561A561Fで完全に復帰した。F561A561Fは、
変異位置をその元のフェニルアラニンに変化させる。これは、観察された低下した活性を
説明し得るプラスミドに対して他のアミノ酸変化が起こらなかったことを示すコントロール
である。従って、Tモチーフは、テロメラーゼ活性で絶対的に必要とされることが示さ
れた最初の非RTモチーフである。

20

【 0 9 3 5 】

モチーフTは他の生物由来のTRTの同定で用いることができ、そしてこのモチーフの変異
型を含むhTRTタンパク質を、テロメラーゼ活性の優性 / 陰性レギュレーターとして使用す
ることができる。多くの他のRTとは異なり、テロメラーゼは単一RNAの小部分 (すなわち
、hTR) と安定に会合し、そして前進的にそれをコピーし、従って、モチーフTはhTR結合
の媒介、反応の進行性、またはテロメラーゼRTに対してユニークな他の機能に関与し得る
。

30

【 0 9 3 6 】

実施例 17

組換えにより発現されたテロメラーゼ成分を用いるテロメラーゼ活性モジュレーターにつ
いてのスクリーニング

40

本実施例は、テロメラーゼ活性モジュレーターをスクリーニングし、同定するためのイン
ビトロ再構成されたテロメラーゼの使用を記載する。記載したアッセイは、容易に (例え
ば、マルチウェルプレートおよび / またはロボット系を用いる) 高処理能力の方法に適合
される。アッセイの工程に対する多数の変形は、この開示のレビューの後に当業者に明ら
かである。

【 0 9 3 7 】

テロメラーゼ成分 (例えば、hTRTおよびhTR) についての組換えクローンを、製造者の指
示に従い、米国特許第5,324,637号に記載されているTNT (登録商標) Coupled Reticulocyte
溶解物系 (Promega) を使用、以下のインビトロ反応で、そして前記実施例7に記載されて
いるように、転写および翻訳する (hTRTのみ)。

50

【0938】

試薬

反応当たりの量 (μL)

TNTウサギ網状赤血球溶解物

25

TNT反応緩衝液

2

TNT T7 RNA Pol.

1

AA混合物 (完全)

1

プライムRNaseインヒビター

1

無ヌクレアーゼ水

16

XbaI切断のpGRN121[hTRT](0.5 μg)

2

FspI切断のpGRN164[hTR](0.5 μg)

2

反応物を30 で2時間インキュベートする。次いで、生成物をultrafree - MC DEAEフィルター (Millipore)で精製する。

10

【0939】

DMSOに溶解した試験化合物の複数の濃度 (例えば、10 μM - 100 μM) の存在下および非存在下で組換えテロメラーゼ産物 (IVRP) をアッセイする。2.5 μL IVRP、2.5% DMSO、および1X TRAP緩衝液 (20mM Tris - HCl、pH8.3、1.5mM MgCl₂、63mM KCl、0.05% Tween20、1.0mM EGTA、0.1mg/mlウシ血清アルブミン) の存在下、室温にて、試験化合物を25 μLの合計容量中で30分間プレインキュベートする。プレインキュベーションの後、25 μLのTRAPアッセイ反応混合物を各試料に添加する。TRAPアッセイ反応混合物は、1X TRAP緩衝液、50 μl dNTP、2.0 μg/mlプライマーACX、4 μg/mlプライマーU2、0.8attomol/ml TSU 2、2ユニット/50 μl Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer)、および2 μg/ml [³²P] 5'末端標識プライマーTS (3000Ci/mmol) からなる。次いで、反応チューブをPCRサーモサイクラー (MJ Research)に入れ、そしてPCRは以下のように行う: 30 における60分間、20サイクルの { 94 における30秒、60 における30秒、72 における30秒 }、72 における1分、10 への冷却。TRAPアッセイは、米国特許第5,629,154号において、前記したように記載されている。使用されたプライマーおよび基質は以下の配列を有する:

20

【0940】

【化20】

TS プライマー (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'); ACX プライマー

(5'-GCGCGG[CTTACC]3CTAACC-3'); U2 プライマー

(5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3'); TSU2

(5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3')

30

【0941】

PCR工程の完了後、プロモフェノールブルーを含有する4 μlの10X 負荷緩衝液を各反応チューブに添加し、生成物 (20 μl) を400Vにおいて0.5X TBE中の12.5% 非変性PAGEで泳動する。完了したゲルを続いて乾燥し、TRAP生成物をPhosphorimagerまたはオートラジオグラフィによって可視化する。試験化合物の存在下におけるテロメラーゼ活性を、薬剤を欠く平行反応に対して反応生成物中の標識の取り込みを比較することによって測定する。

40

【0942】

実施例に記載する以下のクローンを、American Type Culture Collection, Rockville, MD 20852, USAに寄託した:

ラムダファージ 25 - 1.1 ATCC受託番号209024

pGRN121 ATCC受託番号209016

ラムダファージ G 5 ATCC受託番号98505

本発明は、hTRTに関する新規な方法および物質、ならびにテロメラーゼ関連疾患の診断および処置を提供する。特定の実施例を提供したが、前記の記載は例示的なものであって限

50

定的なものではない。本発明の多くの変形が本明細書のレビューにより当業者に明らかになる。従って、本発明の範囲は、前記の記載を参照することなく決定されるべきであり、代わりに、等価物のその全範囲と共に添付の請求の範囲を参照して決定されるべきである。

【0943】

本出願で引用された全ての刊行物および特許書類は、それぞれ個々の刊行物または特許書類が個々に示されるのと同程度に全ての目的でその全体において参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト、*S.pombe* (tez1)、*S.cerevisiae* (EST2)、および *Euplotes aediculatus* (p123) 由来のTRTモチーフにおける、高度に保存された残基を示す。同一のアミノ酸はアスタリスク(*) [わずかに上付き] で示し、他方、類似のアミノ酸残基は、ドット(・)によって示す。図におけるモチーフ「0」はモチーフTとも呼ばれ、モチーフ「3」はモチーフAとも呼ばれる。

10

【図2】 テロメラーゼタンパク質および他の逆転写酵素のテロメラーゼ - 特異的およびRT特異的配列モチーフの位置を示す。テロメラーゼ特異的モチーフTおよび保存されたRTモチーフ1.2およびA - Eの位置を、ボックスによって示す。白い正方形で示したHIV-1 RTは、図3に示したこのタンパク質の一部を示す。

【図3】 HIV-1逆転写酵素のp66サブユニットの結晶構造を示す (Brookhavenコード1HNV)。この図は、全てのモチーフが示され得るように右側の裏からのものである。

【図4】 複数のテロメラーゼRT (Sp Trt1p (*S.pombe*TRT) [本明細書では「tez1p」ともいう] ; hTRT (ヒトTRT) ; Ea p123 (*Euplotes*p123) ; Sc Est2p (*S.cerevisiae*Es2p))、および他のRTファミリーのメンバー (Sc al、*S.cerevisiae*ミトコンドリア由来のシトクロムオキシダーゼのグループIIイントロン1 - がコードするタンパク質)、Dm TART (*Drosophila melanogaster*)のTART非LTRレトロトランスポゾンエレメント由来の逆転写酵素) ; HIV-1 (ヒト免疫不全ウイルス逆転写酵素) 配列アライメントを示す。TRTconおよびRTconは、テロメラーゼRTおよび非テロメラーゼRTについてのコンセンサス配列を表す。アミノ酸はh (疎水性) ; p (極性) ; c (荷電) で示される。三角形は、テロメラーゼタンパク質間で保存されているが、他のRTでは異なる残基を示す。モチーフE下方の実線は、プライマーグリップ領域を示す。

20

【図5】 実施例2に記載したテロメラーゼ陰性の有寿命細胞株およびテロメラーゼ陽性不死細胞株のhTRT RNA発現を示す。

30

【図6】 RNA依存性RNAポリメラーゼに基づくテロメラーゼおよびレトロエレメントの可能性のある系統樹を示す。

【図7】 ローンG 5の制限地図を示す。

【図8】 示された (hTRT遺伝子の近くに位置する) STSマーカーD5S678の位置と共に染色体5pの地図を示す。

【図9】 hTRTプロモーター - レポータープラスミドの構築物を示す。

【図10】 触媒的に活性なヒトテロメラーゼを生産するためのhTRTおよびhTRのインビトロでの同時発現を示す。

【図11】 触媒的に活性なヒトテロメラーゼを生産するためのhTRTおよびhTRのインビトロでの同時発現を示す。

40

【図12】 4つのTRTタンパク質からの配列のアラインメントを示し、そして目的のモチーフを同定する。TRTconは、TRTコンセンサス配列を示す。RTconは、他の逆転写酵素についてのコンセンサス残基を示す。上方の場合のコンセンサス残基は、TRTタンパク質における絶対的な保存を示す。

【図13】 4つのTRTタンパク質からの配列のアラインメントを示し、そして目的のモチーフを同定する。TRTconは、TRTコンセンサス配列を示す。RTconは、他の逆転写酵素についてのコンセンサス残基を示す。上方の場合のコンセンサス残基は、TRTタンパク質における絶対的な保存を示す。

【図14】 配列番号7に対応する示された配列と共に、hTRTイントロンにおけるトポイ

50

ソメラゼII切断部位およびNFκB結合性部位を示す。

【図 1 5】 Euplotes123kDaテロメラーゼタンパク質サブユニット (EuplotesTRT) をコードするDNAの配列を示す。

【図 1 6】 Euplotes123kDaテロメラーゼタンパク質サブユニット (EuplotesTRT) をコードするDNAの配列 (続き) を示す。

【図 1 7】 Euplotes123kDaテロメラーゼタンパク質サブユニット (EuplotesTRTタンパク質) のアミノ酸配列を示す。

【図 1 8】 S.pombeテロメラーゼ触媒サブユニット (S.pombeTRT) のDNAおよびアミノ酸配列を示す。

【図 1 9】 S.pombeテロメラーゼ触媒サブユニット (S.pombeTRT) のDNAおよびアミノ酸配列を示す (続き)。

【図 2 0】 S.pombeテロメラーゼ触媒サブユニット (S.pombeTRT) のDNAおよびアミノ酸配列を示す (続き)。

【図 2 1】 S.pombeテロメラーゼ触媒サブユニット (S.pombeTRT) のDNAおよびアミノ酸配列を示す (続き)。

【図 2 2】 S.pombeテロメラーゼ触媒サブユニット (S.pombeTRT) のDNAおよびアミノ酸配列を示す (続き)。

【図 2 3】 1 にhTRT cDNA配列を示し、この示された配列は配列番号 1 に対応する。

【図 2 4】 1 にhTRT cDNA配列 (続き) を示し、この示された配列は配列番号 1 に対応する。

【図 2 5】 図 2 3 および図 2 4 のcDNAによってコードされるhTRTタンパク質を示す。この示されたタンパク質配列は配列番号 2 に対応する。

【図 2 6】 クローン712562の配列を示し、この示された配列は配列番号 3 に対応する。

【図 2 7】 クローン712562によってコードされた259残基タンパク質を示し、この示された配列は配列番号 10 に対応する。

【図 2 8】 182変異ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸の配列を示し、この示された配列は配列番号 4 に対応する。また、この図は、この182変異ポリペプチドのアミノ酸配列を示し、この示されたアミノ酸配列は配列番号 5 に対応する。

【図 2 9】 182変異ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸の配列を示し、この示された配列は配列番号 4 に対応する。また、この図は、この182変異ポリペプチドのアミノ酸配列を示し、この示されたアミノ酸配列は配列番号 5 に対応する。

【図 3 0】 182変異ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸の配列を示し、この示された配列は配列番号 4 に対応する。また、この図は、この182変異ポリペプチドのアミノ酸配列を示し、この示されたアミノ酸配列は配列番号 5 に対応する。

【図 3 1】 182変異ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸の配列を示し、この示された配列は配列番号 4 に対応する。また、この図は、この182変異ポリペプチドのアミノ酸配列を示し、この示されたアミノ酸配列は配列番号 5 に対応する。

【図 3 2】 182変異ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸の配列を示し、この示された配列は配列番号 4 に対応する。また、この図は、この182変異ポリペプチドのアミノ酸配列を示し、この示されたアミノ酸配列は配列番号 5 に対応する。

【図 3 3】 182変異ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸の配列を示し、この示された配列は配列番号 4 に対応する。また、この図は、この182変異ポリペプチドのアミノ酸配列を示し、この示されたアミノ酸配列は配列番号 5 に対応する。

【図 3 4】 182変異ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有す

る核酸の配列を示し、この示された配列は配列番号4に対応する。また、この図は、この182変異ポリペプチドのアミノ酸配列を示し、この示されたアミノ酸配列は配列番号5に対応する。

【図35-1】Euplotes由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列の一部を示す図である。

【図35-2】Euplotes由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列の一部を示す図である。図35-1の続きの配列を示す図である。

【図35-3】Euplotes由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列の一部を示す図である。図35-2の続きの配列を示す図である。

【図35-4】Euplotes由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列の一部を示す図である。図35-3の続きの配列を示す図である。

【図35】hTRTゲノムクローン由来の配列を示し、この示された配列は配列番号6に対応するコンセンサスモチーフおよびエレメントを示し、トポイソメラーゼII切断部位、NF B結合性部位、Alu配列、および他の配列エレメントに特徴的な配列を含む。

【図36】hTRTゲノムクローン由来の配列(続き)を示し、この示された配列は配列番号6に対応するコンセンサスモチーフおよびエレメントを示し、トポイソメラーゼII切断部位、NF B結合性部位、Alu配列、および他の配列エレメントに特徴的な配列を含む。

【図37】hTRTゲノムクローン由来の配列(続き)を示し、この示された配列は配列番号6に対応するコンセンサスモチーフおよびエレメントを示し、トポイソメラーゼII切断部位、NF B結合性部位、Alu配列、および他の配列エレメントに特徴的な配列を含む。

【図38】hTRTゲノムクローン由来の配列(続き)を示し、この示された配列は配列番号6に対応するコンセンサスモチーフおよびエレメントを示し、トポイソメラーゼII切断部位、NF B結合性部位、Alu配列、および他の配列エレメントに特徴的な配列を含む。

【図39】hTRTゲノムクローン由来の配列(続き)を示し、この示された配列は配列番号6に対応するコンセンサスモチーフおよびエレメントを示し、トポイソメラーゼII切断部位、NF B結合性部位、Alu配列、および他の配列エレメントに特徴的な配列を含む。

【図40】hTRTゲノムクローン由来の配列(続き)を示し、この示された配列は配列番号6に対応するコンセンサスモチーフおよびエレメントを示し、トポイソメラーゼII切断部位、NF B結合性部位、Alu配列、および他の配列エレメントに特徴的な配列を含む。

【図41】実施例1に記載した、酵母におけるTRT遺伝子の変異の効果を示す。

【図42】配列番号8に対応する、EST AA281296の配列を示す。

【図43】クローン712562において欠失された182塩基対の配列を示し、この示された配列は配列番号9に対応する。

【図44】実施例13に記載したhTRTタンパク質をコードする発現ベクター(pGRN133)またはコントロールプラスミド(pBBS212)でトランスフェクトしたBJ細胞からのテロメラーゼ活性についてのアッセイの結果を示す。

【図45】結合および置換溶出工程を示すテロメラーゼのアフィニティー精製の模式図である。

【図46】実施例1に記載した精製プロトコルの間に得られたテロメラーゼ調製物のノーザンブロットの写真である。レーン1は、1.5fmolテロメラーゼRNAを含有し、レーン2は4.6fmolテロメラーゼRNAを含有し、レーン3は14fmolテロメラーゼRNAを含有し、レーン4は41fmolテロメラーゼRNAを含有し、レーン5は核抽出物(42fmolテロメラーゼ)を含有し、レーン6はAffi-Gel-ヘパリン精製テロメラーゼ(47fmolテロメラーゼ)を含有し、レーン7はアフィニティー精製テロメラーゼ(68fmol)を含有し、レーン8はグリセロールグラジエント精製テロメラーゼ(35fmol)を含有した。

【図47】精製プロトコルによるテロメラーゼ活性を示す。

10

20

30

40

50

【図 4 8】 SDS-PAGEゲルの写真であり、*Euplotes aediculatus*由来の約123kDaポリペプチドおよび約43kDaダブレットの存在を示す。

【図 4 9】 *Euplotes aediculatus*テロメラーゼの沈降係数を示すグラフである。

【図 5 0】 *Euplotes*テロメラーゼの基質利用性を示す36%ホルムアミドでのポリアクリルアミド/尿素ゲルの写真である。

【図 5 1】 テロメラーゼRNAテンプレート、およびテロメラーゼRNAを有するヘアピンプライマーの推定のアラインメントを示す。

【図 5 2】 より明るい露光レベルで示した、図 5 0 に示したゲルのレーン 25 - 30 の写真である。

【図 5 3】 *Euplotes*由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットをコードする遺伝子のDNA配列を示す。 10

【図 5 4】 *Euplotes*由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列を示す。

【図 5 5】 *Euplotes*由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列を示す(続き)。

【図 5 6】 *Euplotes*由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列を示す(続き)。

【図 5 7】 *Euplotes*由来の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの3つ全てのオープンリーディングフレームのDNA配列ならびにアミノ酸配列を示す(続き)。

【図 5 8】 *Euplotes*の123kDaテロメラーゼタンパク質サブユニット(上方配列)と*T. thermophila*の80kDaポリペプチドサブユニット(下方配列)との間の配列比較を示す。 20

【図 5 9】 *E. aediculatus*の123kDaテロメラーゼタンパク質サブユニット(上方配列)と*T. thermophila*の95kDaテロメラーゼポリペプチド(下方配列)との間の配列比較を示す。

【図 6 0】 *E. aediculatus*の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの「Laドメイン」の一部(上方配列)と*T. thermophila*の95kDaポリペプチドサブユニットの一部(下方配列)との間のベストフィットアラインメントを示す。

【図 6 1】 *E. aediculatus*の43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットの「La - ドメイン」の一部(上方配列)と*T. thermophila*の80kDaポリペプチドサブユニットの一部(下方配列)との間のベストフィットアラインメントを示す。 30

【図 6 2】 *E. aediculatus*の123kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットのポリメラーゼドメインおよび*S. cerevisiae*ミトコンドリアからのシトクロムオキシダーゼグループIIイントロン1がコードするタンパク質(al *S. c.* (グループII))、Dong (LINE)、および酵母ESTp (L8543.12)を含む、種々の逆転写酵素のポリメラーゼドメインのアラインメントおよびモチーフを示す。

【図 6 3】 43kDaテロメラーゼタンパク質サブユニットのドメインと、種々のLaタンパク質とのアラインメントを示す。

【図 6 4】 *T. thermophila*80kDaタンパク質サブユニットをコードするヌクレオチド配列を示す。

【図 6 5】 *T. thermophila*80kDaタンパク質サブユニットのアミノ酸配列を示す。 40

【図 6 6】 *T. thermophila*95kDaタンパク質サブユニットをコードするヌクレオチド配列を示す。

【図 6 7】 *T. thermophila*95kDaタンパク質サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【図 6 8】 L 8543.12 (「Est2p」)のアミノ酸配列を示す。

【図 6 9】 *Oxytricha*PCR産物によってコードされるアミノ酸配列と*Euplotes*p123配列とのアラインメントを示す。

【図 7 0】 Est2のDNA配列を示す。

【図 7 1】 ヒトテロメラーゼペプチドモチーフをコードするcDNAクローンからの部分的アミノ酸配列を示す。

【図 7 2】 ヒトテロメラーゼペプチドモチーフをコードするcDNAクローンの部分DNA配 50

列を示す。

【図 7 3】 *S.pombe*trtとも呼ばれる *tez1* のアミノ酸配列を示す。

【図 7 4】 *tez1* の DNA 配列を示す。イントロンおよび他の非コード領域は小文字で示し、エクソン（すなわち、コード領域）大文字で示す。

【図 7 5】 *tez1* の DNA 配列を示す（続き）。イントロンおよび他の非コード領域は小文字で示し、エクソン（すなわち、コード領域）大文字で示す。

【図 7 6】 EST2p、*Euplotes*、および *Tetrahymena* 配列、ならびにコンセンサス配列のアラインメントを示す。

【図 7 7】 抗 hTRT 抗体の産生に有用なペプチドの配列を示す。

【図 7 8】 *tez1*⁺ は配列決定実験を模式的にまとめる。

10

【図 7 9】 *E. aediculatus*p123 配列の *S.pombe* ホモログを同定するための PCR で使用する 2 つの縮重プライマーを示す。

【図 8 0】 *E. aediculatus*p123 配列の *S.pombe* ホモログを同定するための縮重プライマーを用いる PCR で生じた 4 つの主要なバンドを示す。

【図 8 1】 M2 PCR 産物と、*E. aediculatus*p123、*S.cerevisiae*、および *Oxytricha* テロメラーゼタンパク質配列とのアラインメントを示す。

【図 8 2】 *E. aediculatus*p123 の *S.pombe* ホモログを同定するための 3' RT PCR 戦略を模式的に示す。

【図 8 3】 *S.pombe* テロメラーゼタンパク質配列をスクリーニングするために使用するライブラリーの特徴を示し、そして *S.pombe* テロメラーゼタンパク質配列についてライブラリーをスクリーニングした結果を示す。

20

【図 8 4】 *S.pombe* テロメラーゼ配列を含有する HindIII - 消化された陽性ゲノムクローンをを用いて得られた陽性結果を示す。

【図 8 5】 全長 *S.pombe* TRT クローンを得るために使用した、5' RT PCR 戦略を模式的に示す。

【図 8 6】 *S.pombe* (*S.p.*)、*S.cerevisiae* (*S.c.*) および *E. aediculatus* (*E.a.*) についての、テロメラーゼ触媒サブユニット由来の RT ドメインのアラインメントを示す。

【図 8 7】 *Euplotes* (*Ea p123*)、*S.cerevisiae* (*Sc Est2p*)、および *S.pombe* (*Sp Tez1p*) 由来の配列のアラインメントを示す。パネル A において影をつけた領域は、2 つの配列間で共有される残基を示す。パネル B において、影をつけた領域は、3 つの全ての配列間で共有される残基を示す。

30

【図 8 8】 *S.pombe* におけるテロメラーゼ遺伝子を用いる中断戦略を示す。

【図 8 9】 *tez1* の中断を確認する実験結果を示す。

【図 9 0】 *tez1* 中断に起因する *S.pombe* におけるテロメアの進行的短縮化を示す。

【図 9 1】 クローン 712562 の EcoRI-NotI インサートによってコードされる約 63kDa のテロメラーゼタンパク質をコードする ORF の DNA およびアミノ酸またはそのフラグメントを示す。

【図 9 2】 クローン 712562 の EcoRI-NotI インサートによってコードされる約 63kDa のテロメラーゼタンパク質をコードする ORF の DNA およびアミノ酸またはそのフラグメントを示す（続き）。

40

【図 9 3】 クローン 712562 の EcoRI-NotI インサートによってコードされる約 63kDa のテロメラーゼタンパク質をコードする ORF の DNA およびアミノ酸またはそのフラグメントを示す（続き）。

【図 9 4】 クローン 712562 の EcoRI-NotI インサートによってコードされる約 63kDa のテロメラーゼタンパク質をコードする ORF の DNA およびアミノ酸またはそのフラグメントを示す（続き）。

【図 9 5】 種々の供給源由来の逆転写酵素モチーフのアラインメントを示す。

【図 9 6】 プラスミド pGRN121 の制限地図および機能地図を提供する。

【図 9 7】 hTRT cDNA 配列の予備的核酸配列決定解析の結果を示す。

【図 9 8】 hTRT cDNA 配列の予備的核酸配列決定解析の結果を示す（続き）。

50

【図 9 9】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す。

【図 1 0 0】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 0 1】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 0 2】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 0 3】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

10

【図 1 0 4】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 0 5】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 0 6】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 0 7】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 0 8】 hTRTの予備的核酸配列および3つのリーディングフレームにおける推定のORF配列を示す(続き)。

20

【図 1 0 9】 プラスミドpGRN121の制限地図および機能地図を提供する。

【図 1 1 0】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す。

【図 1 1 1】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 1 2】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 1 3】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 1 4】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 1 5】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す(続き)。

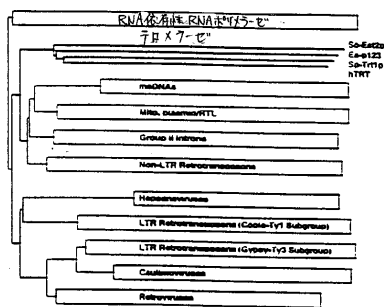
【図 1 1 6】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す(続き)。

【図 1 1 7】 hTRTの精密な核酸配列および推定のORF配列を示す(続き)。

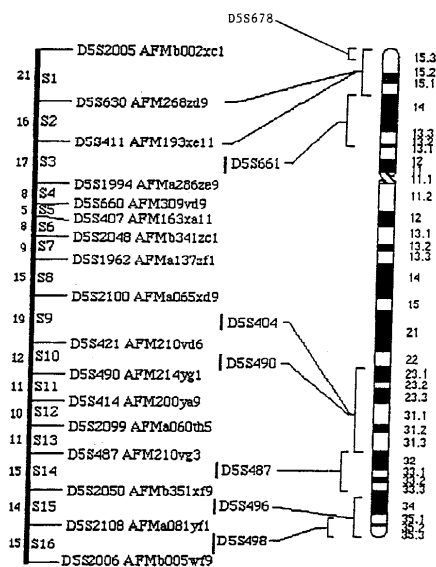
【図 1 1 8】 クローン25 - 1.1の制限地図を示す。

30

【 図 6 】



【 义 8 】



ページ2

[illegible][illegible]

へじ3

3137	TTG	TTG	TTG	AAA	TTC	TTC	TTC	AGA	TAC	GAG	TCT	TTT	AGT	TTC	CAT	TAT	TTC	AGT	AAC	TAA	AAG	2394
176	F	L	K	L	S	R	Y	C	S	F	S	F	S	L	H	Y	L	M	S	N	I	395
3297	gtccaccctcccacaactccccctccagccaccacacacacacacg att tca gaa att gaa tgc cta gtc ctt cga																				2465	
1397														I	S	E	I	E	W	L	V	100
2466	AAA	AGG	TCA	AAT	CCG	AAA	ATG	TGC	TTA	AGT	GAT	TTT	GAG	AAA	CCG	AAC	GAA	ATA	TTT	CGC	2525	
406	K	R	S	N	A	K	C	K	M	C	T	D	F	E	S	K	K	Q	I	F	A	425
3256	GAA	TTC	ATC	TAC	TGC	TGC	TCA	TAC	AAT	TCT	TTT	ATA	CCT	ATT	TTA	CAC	TCT	TTT	TAT	TAT	250	
426	E	F	T	Y	W	L	Y	M	L	Y	N	S	A	I	P	I	L	Q	S	G	F	245
485	ATC	ACT	GAA	TTC	GAT	TTA	CGA	AAT	CGA	ACT	GTT	TAT	TTT	AGA	AAA	S	AT	TTT	Y	AAA	466	
446	I	T	E	S	C	D	L	R	N	R	T	V	Y	T	F	G	K	D	I	W	K	245
2648	CTC	TTC	TGC	GCA	CCC	TTT	ATT	ACA	TCA	ATG	ATA	GAA	CGC	TTT	GAA	AAA	ATA	AAC	GAG	2705		
466	L	C	R	A	P	F	I	T	T	S	N	K	N	H	E	A	F	E	K	I	N	485
476	gtacccttcaagtgaccctccccgcacaaagctcaaacctctccag aac att tct agc att gat act gac gaa aac act																				2775	
1806														N	N	V	R	H	D	T	Q	495
4776	ACT	TTT	CCA	GCA	GCA	GTT	ATT	CGT	CTA	CTA	CGT	AAG	AAG	AAT	ACC	TTT	CGT	CTC	ATT	ACT	2835	
496	T	L	P	P	A	A	G	V	I	R	L	L	P	K	K	N	T	F	R	L	I	515
2816	AAT	TTA	AGA	AAA	AGA	CTT	TTA	ATA	AGA	gtaccacacattctctgtccctccacagtcactctctctctcaactccatca										2904		
516	N	L	R	K	R	K	R	F	L	I	K										526	
3297	ttccagcg atg ggt tca aac aaa aaa atg tta gtc att acc aac caa act tta cga cct gtc																				2967	
523														N	G	S	N	K	K	N	L	302
2968	GCA	TTC	ATG	TTC	AAA	ACT	TTC	ATC	AAT	GAA	GAA	AGT	AGT	GCT	ATT	CTA	TTT	TAC	TTC	GAG	3427	
543	A	S	I	L	K	M	L	H	L	E	N	E	E	G	I	F	F	N	L	E	562	
1028	TTG	TAC	ATG	GAG	CTT	CTT	ACT	TTT	GAG	AAG	GAT	CTT	CTT	GAG	CAC	ATA	TTC	TTT	GG	CAACT	3088	
563	Y	M	K	F	Y	M	K	T	F	K	K	D	L	L	K	H	R	H	F	G	581	
1089	tctacatctggctatccgcctccctccactcaactctccag g cgt aag aag tat ttt gta cga ata gat ata																				3155	
591														R	K	K	Y	F	V	R	I	592
1156	AAA	TTC	TGT	TAT	GAT	GCA	ATA	AGA	CTT	AGG	CTG	TTT	CGG	ATT	GTT	AAA	AGA	CTC	CTC	3215		
592	K	S	C	Y	D	R	I															

ページ4

3533	cctacgtccaccagc	ATA GGA AAT TCT CAA TAC TTG CTG CAA AAA GTT GGT ATC CTC CAG CGC TCA	3593
593	I G N S Q Y C Q X V Y G I P D Q	708	
3594	ATT CTG TCA TTT TTT TTT TCG TCT CAT TTC TAT ATG GAA GAT TGT ATT GAA TAC CTA TCG	1653	
709	C L S S F L C H F Y M E D L I D E Y L S	728	
3694	TTC AAA AAG AAG AAA GGA TCA GTG TGA TCA GTC GAC GAT GAT TTT AAA ACA	3713	
729	F A K K K G S V T L L R V V D F L F I T	748	
3714	GTT AAT AAA AAG GAT GCA AAA TTT TTT TTT TTA AGA G gtagagccccgccccccc	3774	
749	V N K K D A K K F L L N L S L R G	769	
3778	caagctcccaacctgcgaag	FA TTT GAG AAA CAC AAT TTT TCT ACG AGC CTC GAG AAA ACA TTA	3840
765	G E R K H M F S T C S L D E K R T V	778	
3841	ATA AAC TTT GAA AAT AGT AAT GGG ATA AAA AAC AAT AAT TTT AAT GAA CAC AAA	3900	
775	I H E E N S N G C I I N N T F F N E S K K A	798	
3901	AGA ATG CCA TTC TCT GGT TCT GTG AAT AGG TCT GAT ACA TTA TTA GCA TTT	3960	
799	R M P F F G P S V N H R S L D T T L L A C	818	
3981	CGT AAA AAT GAT GAA CGC TTA TTT AAC TCT ACA TCT GTA GAG CTG ACC AAA CAT ATG GGG	4020	
815	P K I D E A C L F N S T S V E L T K H N C	838	
4021	AAA TTT TTT TAC AAA-AAT CTA AG gtaactctgttgaatcgatactgacagtcagaacaacacagc	A TCG	4089
839	K S F F Y K I L L R	S	848
4090	AGC CTC CCA TCC TTC CCA GAA CTA TTT ATT GAC ATT ACC CAC AAT TCA AAA TCT AAT TCT	4149	
849	S L A S T A Q V F I D I T H N S K F N S	868	
4150	TGC TCT AAT ATA TAT AGG CTA GCA TAC TCT ATG TGT ATA AGA GCA CCA GCA TAC TTA AAA	4209	
869	C N I Y R L G Y S M C H R A Q A Y L L K	888	
4210	AGG ATG AAG GAT ATA TTT ATT CCC CAA AGA ATA TTC ATA ACG G gtagaacattctctccaaccagc	4274	
889	R K K D I F I P P O R H F I Y D	903	
4275	aaagctctaactcaaccctcagc	AT CTT TCG AAT GCT ATT GCA AGA AAA TTT AAA AAG TCG GCT	4335
704	L L N V I G R K I W K K L A	917	
4340	GAA ATA TTA GCA TAT ACQ APT AGG GGT TTC TCT GCA GAA GTC AAA TCT gtagagctgc	4403	
918	E I L G Y T S R R F L S S A E V K W	925	
4402	ggctccgagacctccagaacattcgacatcatcg	G CTT TTT TCT CTT GSA ATG AGA GAT CGT TTC AAA	4468
936	L F C L C H R D G L K	946	
4469	CCC TCT TTC AAA TAT CAT CCA TGC TTC GAA CAG CTA ATA TAC CAA TTT CAG TCA TCT ACT	4528	
947	P S F K Y N P C F E Q L I Y Q F Q S L T	966	
4529	GAT TCT ATC AAG CCG CTA AGA CCA GTC CCA CAG GGT TCT TTA CAT AGA AGA ATA	4588	
966	D L K P L R P V L R Q V L F L H R R I T	986	
4589	CGT CAT TAA gtagacattctcaactctcacacacatctttcttacctggtgtcttaadacacattccaccatgataca	4665	
987	A >	989	

【 ㊦ 2 3 】

5-5-5

图列番号 1

1	gcagctgtccc	cctgtgtgc	gaaagtggga	acgtctgggc	ccagctcaac	cgcagatgac
6	gcgtctctcc	cgtctgcgag	cgtgtgtatc	ccgtctgggc	ccagctcaac	cgcagatgac
121	gcagctgtccc	acgttgtctg	ggcagctggg	ccctcagggg	gtgtgtctgg	gcgaagtgag
181	gcagctgtccc	ctgtttccgg	cgtgtgtggc	ccagctgggt	gtgtgtctgg	cctgtgtctg
241	acagctgcgcc	ccctccgcgc	cctctcttcg	ccaggtgttc	tgctgtgaag	acgtgtgtgc
301	ccagatgtctg	ccagatgtctg	gcgacgtcgc	ccgcaagaac	tgctgtctgc	tgtgtgtctg
361	gtctctgtgac	ggggcgcctc	ggggcccccc	acgacgcttc	accacagct	tgtagctata
421	ctctgcacac	acgtgtacgc	agcagctcag	ggggagagct	gtgtgggggc	tgctgtctgc
481	ccgtctgggc	gcagatgcgtg	tgggttcaact	gttgtagcgc	tgctgtctgc	tgtgtctctg
541	gcagctgtccc	gggtgtgtgc	gggtgcgcgt	tcacagctgc	tcacagctgc	gcgtctgcac
601	tcagagctgc	ccctccacac	gggtgtgtgc	ccagctggat	ccagctggat	gcgaacagag
661	cttgaaacct	agcttcagg	ggcggcggc	ccctctgggc	tcagctgggc	gcgtgtggag
721	gcagctgtccc	ggcagtcgca	acgcgaagtc	gcctgtggcc	tcagagacct	tcagagacct
781	tgccctgagc	ccagagacga	gcctctgttg	ccagagggct	tgggcagacc	cgggcagagc
841	gtgtgtcagc	agtgacagca	gtttctcttg	gggtgtcacct	gcgcgcaccc	ccagaaagac
901	caacctctctg	gagggctggc	tctgttcgac	ggcgcacctc	ccacctctgc	tgggcgcctg
961	gcacacagcg	gggcccccat	ccacatcgtg	gccacacgtg	ccctgggagc	acgtctgtcc
1021	ccggctggac	gcagagacga	agcaactctc	ctacatcttc	gggcagacgc	agacgtctgc
1081	gcagctgtccc	gggtgtgtgc	gggtgtgtgc	gggtgtgtgc	gggtgtgtgc	gggtgtgtgc
1141	gacacattct	ctgggtctcca	ggcgcgcac	ccctctgggc	ccctctgggc	tgccctctgc
1201	gcccccagcc	tactgtccaa	tgctgcctct	gtgtgtggag	gtgtgtggag	gtgtgtggag
1261	gtgccccatc	ggggctgttc	tcagagacga	ctgcctctgc	ccagctgtgc	tcacccagcc
1321	ctacggtctg	tgctgcctgg	agaaacgcca	gggtctcttg	gggcgcctcc	agagagagga
1381	caacagacccc	gtctcctggg	tgacagcttg	ccgcacagac	ccagcgcctc	gcgaagctgt
1441	cgttgtctgc	cgggtctgcg	tgagcgcgtt	gggtccccca	ggcctctctg	gtctccagcc
1501	caagagacgc	cgctctctcca	ggacacacaa	gaagtctctc	ctctctggga	agatcagcaa
1561	ggagctgtctg	ggagagtgta	gtgtgaagat	gagctgtctg	gagctgtctg	ggctgtcgcc
1621	gagctgtctg	ggagctgtctg	ggagctgtctg	ggagctgtctg	ggagctgtctg	ggagctgtctg
1681	caagctgtctg	caagctgtctg	tgagctgtctg	gtgtgtgtgc	gtgtgtgtgc	gtgtgtgtgc
1741	tgctcaaggag	acacagcttc	aaagacagca	gctctttctc	tgccagaaag	gtgtctgtgc
1801	caagctgtctg	agcatgtgaa	tcagacagca	cttgagagag	gtacgtgtgc	ggagctgtct
1861	gttgacagcgc	gttcagagag	atctggagag	ccagcggccc	ctgtgtctgc	ccagatctgc
1921	cttcaccccc	acagctcagc	gggtctgcct	gattgtgaa	ctgtgtgacg	ctgtgtggag
1981	cagaaagctct	ccgacagaaa	agaggggggc	gggtctccac	tcagaggggc	aggaactctg
2041	gcagctgtctc	actacagagc	ggggcggcgc	cccgccgctc	ctggcgctct	ctgtgtgtgc
2101	gcagctgtctc	actacagagc	ggggcggcgc	ctctgtgtgc	gggtgtgggc	ccccagaccc
2161	gcggctgtgag	ctgcacacgc	gtgtgtgtgc	ctctgtgtgc	ctctgtgtgc	ccctccccca
2221	ggacgtgtctg	acagggctgta	tgctgcagct	catcaaaaac	ccagacagct	ccctccccca
2281	tgctgtatcc	gggtgtcaga	agcgcgccca	tgggcagctc	ccagagagct	tcagagacga
2341	cgctctgcac	tgtagaacac	tcacagcagc	ctatgcagac	tgctgtgtct	acctgtgcac
2401	gaccagcgcg	cttagaggtg	cctgtcctgc	cagacagcag	ctctctctca	atgagcgcga
2461	acgtgtgcctc	tctagaagct	tctatcagct	cattgtgcac	acgcgcctgc	gatacaggg
2521	caagctcctca	gtccacgtgc	agggagtcac	gcagggctgc	actctctcca	ctgtctctgc
2581	acgtctgtctg	tcagagacga	tgtagaagaa	gcgtgtgtgc	ggagatgtgc	ggagcggctc
2641	gcagctgtctg	gcagctgtctg	gcagctgtctg	gcagctgtctg	gcagctgtctg	gcagctgtctg
2701	ctctctcagc	acctctgtgc	gagggctctc	gcagctgtctg	gcagctgtctg	gcagctgtctg
2761	acagctgtgtg	aactctctct	tagaagacga	ggcctctgct	ggcagcagct	tggtctcagc
2821	gcgcgcacac	ggcctctctc	cctctgtgcg	cctgtctgct	gataccacgc	ccctgtaggt
2881	gcagagacgc	tactctcagc	atctgtgcag	ctctacagc	cgctctcca	ctctcaacgc

【 ㊦ 2 5 】

配列番号 1

ヒト TRT マシバ 實 配列
(配列番号 2)

2941 gggctctcaag gggggaga acatggctgc caaacctctc 999tctcttgc ggcctgaagt
 2942 tccacgctgt tttctgtgt cttgtgcgtg cactgcctac ggcctctctc tccactctca
 2943 caagatcctt cttggcagtg gtcacatgtg cctgcgcgtc gctctgcagc tccactctca
 2944 ctgcgaagtt ttgtggaacc cacaattttt cctcgtgcgt atctctgcgt cggctctctc
 2945 ctgtcacttc actctgaag ccaaaagacc agggatcgct ctgggggccc agggctgcagc
 2946 cggctctctg cctccgagtg cctgcgcgtg cctgtggccc caggaattcc tggctgaagt
 2947 cggctcactg cggctcact agtgcctgac cctggggccc cctcaggacg cccacagcgc
 2948 cggctcactg cgttcacga gctcactgca cctggggccc gaggcgcgtg ccaacagcgc
 2949 cctcactgca cctcactgca cctcactgca cctggggccc gaggcgcgtg ccaacagcgc
 2950 atgcctcact cctcactgca cctcactgca cctggggccc gaggcgcgtg ccaacagcgc
 2951 gggcagcagc cagcagcctg cctgcgcgtg gctctcagc cagggtctg cccagggcgc
 2952 caccacagc cctccacgc cttggagctg agggctcagt caagcttgg cctggagcgc
 2953 cactgcctgc tgaagctgc gcttcgcgtg gaggctcagt cggctgtcca gccagggcgc
 2954 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc
 2955 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc
 2956 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc
 2957 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc
 2958 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc
 2959 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc
 2960 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc
 2961 gattgtcttc cactgcctgc gcttcgcgtg cccacacagc cggctgtcca gccagggcgc

MPRAPRCRAVRSLLSRSHYREVPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDP
A AFRALVAQCLVCPVWDARPPPAAPSRFQVSCLELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFA
LLDGARGGPPEAFTTSVRSYLNPVTVDALRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHLLARCALFV
LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRLRGCEARWNHSVREAGVPLGLPA
PGARRRGGSASRSLPLPKPRRGAAPPERTPVQGQSWAHPGTRGPRSDRGFCVVSPA
RPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTRPRPMDTFCPPVYAETKHWFLYS
SGDKEQLRPSFLLSSRLPSLTGARRLVETIFLGRSPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPL
FLELLGNHAGCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQGSVAAPEEEDTPRRLVQ
LLRHQSSPWQYGVFRACLRLVPPGLWGRSHNRERRFLRNTKKFISLGHAKHLSLQEL
TWKMSVRDCAWLRRSPGVGCPAAEHLRREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFVVTET
TFQKNRLFFYRKSVMVSKLQSIGIRQHCLKRVQLRELSAEVRQHRARPALLTSRLRFI
PKPDGLRPIVMNDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLG
LDDIHRAWRTFVLVRVAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLETVIASI IKPQNTYC
VRYAYVQKAHGHVRKAFKSHSVTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRAVAVIEQSSSL
NEASSGLDFVFLRPMCHHAVIRKGSYVQCQSIGIPQGSILSTLLCSLYGDMMENKFLAG
IRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLLTHAKTFLRLTVRGVPEYCGVNLKRTVNVNFVEDEAL
GGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKGAGRNMRR
KLGVLRLKCHSLFLDLQVNSLQVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPT
FFLRVISDTSALCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVT
YVPLLGSLRTAQTLQSRKPLGTTLLTALEAANPALPSDFKTILD

【 ㊤ 2 6 】

クローン 712562
(西列番号 3)

GGCCAAAGTTCTCGACTGGCTGATGAGTGTGTACGTGTCGCAGCTGCTCAGGTCCTTTCTT
TTATGTCAAGGAGGACGACCGCTTTCAAAGAACAGCGCTCTTTTCTTACCCAGGAAGTGTCTG
GCTCAGGTTTCCAAAGCTATGGAATTCAGACAGCATCTGAGAGGGTGCTGCTCGGGAGGAT
TGCGGAAGACAGGCTGCGCAGCATCTGAGGAGACGACGGCCGGCTCTGAGCTCCAGCATCT
CCGCTTCATCCCAAGGCTCAGCGGGCTCGGCCAGCTATGTGAACATGGAATAGCTGTGGG
AGCCAAAGACTCTCCGACGAGAAAAGAGGCGGCGAGCTGTCACTCTCAGGGTGTCGAGGCACT
GTTCAGCGTGCTCACTACGACGGGGCGGGCGCCCGCTCTGGCGGCGCTCTTAAGTC
GGGCTCGGAGATATTCACAGGGCTCTGGCCAGCTCTCGTGCTGCTGTCTGGGGCCACAGA
CCCGCGCGCTGAGCTGTACTTTGTCAAGTGTGATGTGAGGGGGCTGACGACCATCTCGT
CCAGGACAGAGCTCAGGAGGTTCTGCCCAGCATCTCAACCCCGGAGAACAGTACTGCT
GGTGCGGATGTCCGTGTGTCAGGAAGCGGCCCATGGGCACTCCGACAGGCTTCCAGAG
CCACGTCCTACGTCCAGTCCAGGGGATCCCGCAGGGGCTCATCTCTCCAGCGTGCTCT
GCAGCCTGTCTACCGCGCATCTGGAGAACAGCTGTCTTGGGGGAGTCTCGCGGGAAGCGGC
TGCTCTCGGCTTGTTGGATGATTTCTTGTTGGTGACACTCACTCACCAGCGGAAAA
CTCTCTCCAGGACCTGGTCCGAGTGTCTGCTGAGTATGTGCTGCGTGTGAACTTGGGCA
AGACAGTGGTGAACTCTCTGTGAAGAAGACCGCTCGGTGGTGACCGCTTTTCTTCAGA
TGCGGCGCGACCGGCTACTTCCCTGTGTGGGGCTGTCTGCTGATATCCGCGACCTCGGAG
TGCAAGCAGCATCTCAAGCATGTCCGGCAGCTCATCAGCAGCAGTCTCACTTCAACC
CGGGCTCTCAAGGCTGGGAGGAACATCGTCTGCACAACTCTTTTGGGGTCTTCGGGCTGAAGT
GTACAGCTGTTTCTGGAATTTGCGAGTGAACAGGCTCCAGCAGCGGTGTGACCAACAACT
ACAAGATCTCTCTCGTTCAGGCGTGACAGGTTTCAAGCATGTGTGCTCGAGCTCCAAATTT
ATCAGCAAGTTTGAAGAAACCCCAACTTTTCTCGCGGTGATCTCTGACACGGCTCTCC
TGTGCTCTCCATCTCAAGAACCAAGAACAGGAGTGTGCTGTGGGGGCAAGGGCGCGC
CGGGCGTCTCGGCTCCGAGCGCTGTGCTAGTGCTGTGCCAACAGCATCTCTGCTCAAGT
TGACTGCAGACAGCTGTCTCACTAGCTGCCACTCTTGGGGTCACTCAGCAGCAGCGCAGAGCG
AGCTGAGTGCAGGAAGTCCCGGGGACGACGCTGATCTGCCCTGGAGGCGCGCAGGCACACCGG
CACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCTCGAGCTGAGGACACCGCGCCACAGCGAGGCGC
AGAGCAGACACACGAGCGCTGTGACCGCGGGCTGTAGCTCTCAGGAGGAGGAGGGGCGC
CCACACCCAGGCGCTGACCGCTGGGAGTGTGAGGCGTAGTGAGTGTGGTGGGAGGGGAGCT
CGATGTCCGGCTGAAGCTGTAGTGTCCGGTCTGAGGCTGAGCAGTCTCGGCTCAGGCAAGGGC
TAGTGTCTCAGCACACCTCGGCTGCTACTTCCACACAGCGTGGCGCTCGGCTCAGCACCC
AGGGCCAGCTTTTCTCAGCAGAGAGCGGGCTTCAACTCCCCACATAGAATATGTGCATC
CCGAGATTCGCAATCTGCACTCCCTGCGTGGCTGCTTTGGCTCTACACCCCAACATC
CAGGTGGAGACCTGAGAAGGACCTCGGAGCTCTGGGAATTTGGAGTGCACCAAGATGGG
CGCTGTCAACAGCGAGGACCGCTCAGCTCGATGGTGGGGCTCTGTGGGTCAAAATTTGGG
GAGGTGCTGTGGGAGTAAATATCGAATATATAGTTTTTCAGTTTGTGAAAAAATAA
AAAAAATAAAAAA

【 図 2 7 】

配列番号 10

MetSerValTyrValValGluLeuLeuArgSerPhePhe
TyrValThrGluThrThrPheGlnLysAsnArgLeuPhePheTyrArgLysSerValTyr
SerLysLeuLeuSerIleGlyIleArgGlnHisLeuLysArgValGlnLeuArgGluLeu
SerGluAlaGluValArgGlnHisArgGluAlaArgProAlaLeuLeuThrSerArgLeu
ArgPheIleProLysProAspGlyLeuArgProIleValAsnMetAspTyrValValGly
AlaArgThrPheArgArgGluLysArgGlaGlaLysArgLeuThrSerArgValValAlaLeu
PheSerValLeuAsnTyrGluArgAlaArgArgProGlyLeuGlyAlaSerValAlaLeu
GlyLeuAspAspIleHisArgAlaTyrArgThrPheValLeuArgValArgAlaGlnAsp
ProProGluLeuTyrPheValLysValAspValThrGlyAlaTyrAspThrIlePro
GlnAspArgLeuThrGluValIleAlaSerIleLysProGlnAsnThrTyrCysVal
ArgArgTyrAlaValGlnLysAlaAlaHisGlyHisValArgLysAlaPheLysSer
HisValLeuArgProValProGlyLysProAlaGlyLeuHisProLeuHisAlaAlaLeu
GlnProValLeuArgArgHisGlyGlnHisAlaValCysGlyAspSerAlaGlyArgAla
AlaProAlaPheGlyGly

【 図 2 8 】

配列番号 4 (DNA) および 変異型の翻訳
Δ/P2 hTRT 配列番号 5 (7n17質)

met
GCAGCGCTGCGTCTCTGCTGCGCAGCTGGAGCCCTGGCCCCGCCACCCCCGGG ATG

10
pro arg ala pro arg cys arg ala val arg ser leu leu arg ser
CCG CGC GCT CCC CGC TGC CGA GCC GTG CGC TCC CTG CTG CGC AGC

20
his tyr arg glu val leu pro leu ala thr phe val arg arg leu
CAC TAC CGC GAG GTG CTG CGC CTG GCC ACG TTC GTG CGG CGC CTG

30
gly pro gln gly trp arg leu val gln arg gly asp pro ala ala
GGG CCC CAG GGC TGG CGG CTG GTG CAG CGC GGG GAC CCG GCG GCT

40
phe arg ala leu val ala gln cys leu val cys val pro trp asp
TTC CGC GCG CTG GTG GCC CAG TGC CTG GTG TGC GTG CCC TGG GAC

50
ala arg pro pro pro ala ala pro ser phe arg gln val ser cys
GCA CGG CCG CCC CCC GCC GCC CCC TCC TTC CGC CAG GTG TCC TGC

60
leu lys glu leu val ala arg val leu gln arg leu cys glu arg
CTG AAG GAG CTG GTG GCC CGA GTG CTG CAG AGG CTG TGC GAG CGC

70
gly ala lys asn val leu ala phe gly phe ala leu leu asp gly
GGC GCG AAG AAC GTG CTG GCC TTC GGC TTC GCG CTG CTG GAG GGG

80
ala arg gly gly pro pro glu ala phe thr thr ser val arg ser
GCC CGC GGG GGC CCC CCC GAG GCC TTC ACC ACC AGC GTG CGC AGC

90
100
110
120

【 図 2 9 】

130

tyr leu pro asn thr val thr asp ala leu arg gly ser gly ala
TAC CTG CCC AAC ACG GTG ACC GAC GCA CTG CGG GGG AGC GGG GCG

140

trp gly leu leu leu arg arg val gly asp asp val leu val his
TGG GGG CTG CTG CTG CGC CGC GTG GGC GAC GAC GTG CTG GTT CAC

150

leu leu ala arg cys ala leu phe val leu val ala pro ser cys
CTG CTG GCA CGC TGC CGC CTC TTT GTG CTG GTG GCT CCC AGC TGC

160

ala tyr gln val cys gly pro pro leu tyr gln leu gly ala ala
GCC TAC CAG GTG TGC GGG CCG CCG CTG TAC CAG CTC GGC GCT GCC

170

thr gln ala arg pro pro pro his ala ser gly pro arg arg arg
ACT GAC GCC CGG CCC CCG CCA CAC GCT AGT GGA CCC CGA AGG CGT

180

leu gly cys gly arg ala trp asn his ser val arg glu ala gly
CTG GGA TGC GAA CGG GCC TGG AAC CAT AGC GTC AGG GAG GCC GGG

190

val pro leu gly leu pro ala pro gly ala arg arg arg gly gly
GTC CCC CTG GGC CTG CCA GCC CCG GGT CGC AGG AGG CGC GGG GGC

200

ser ala ser arg ser leu pro leu pro lys arg pro arg arg gly
AGT GCC AGC CGA AGT CTG CCG TTG CCC AAG AGG CCC AGG CGT GGC

210

ala ala pro glu pro glu arg thr pro val gly gln gly ser trp
GCT GCC CCT GAG CCG GAG CGG ACG CCC GTT GGG CAG GGG TCC TGG

220

ala his pro gly arg thr arg gly pro ser asp arg gly phe cys
GCC CAC CCG GGC AGG ACG CGT GGA CCG AGT GAC CGT GGT TTC TGT

230

240

250

260

270

【 3 0 】

280
val val ser pro ala arg pro ala glu glu ala thr ser leu glu
GTG GTG TCA CCT GCC AGA CCC GCC GAA GAA GCC ACC TCT TTG GAG

290 300
gly ala leu ser gly thr arg his ser his pro ser val gly arg
GGT GCG CTC TCT GGC ACG CGC CAC TCC CAC CCA TCC GTG GGC CGC

310
gln his his ala gly pro pro ser thr ser arg pro pro arg pro
CAG CAC CAC GCG GGC CCC CCA TCC ACA TCG CGG CCA CCA CGT CCC

320 330
trp asp thr pro cys pro pro val tyr ala glu thr lys his phe
TGG GAC ACG CCT TGT CCC CGG GTG TAC GCC GAG ACC AAG CAC TTC

340
leu tyr ser ser gly asp lys glu gln leu arg pro ser phe leu
CTC TAC TCC TCA GGC GAC AAG GAG CAG CTG CGG CCC TCC TTC CTA

350 360
leu ser ser leu arg pro ser leu thr gly ala arg arg leu val
CTC AGC TCT CTG AGG CCC AGC CTG ACT GGC GCT CGG AGG CTC GTG

370
glu thr ile phe leu gly ser arg pro trp met pro gly thr pro
GAG ACC ATC TTT CTG GGT TCC AGG CCC TGG ATG CCA GGG ACT CCC

380 390
arg arg leu pro arg leu pro gln arg tyr trp gln met arg pro
CGC AGG TTG CCC CGC CTG CCC CAG CGC TAC TGG CAA ATG CGG CCC

400
leu phe leu glu leu leu gly asp his ala gln cys pro tyr gly
CTG TTT CTG GAG CTG CTT GGG AAC CAC GCG CAG TGC CCC TAC GGG

410 420
val leu leu lys thr his cys pro leu arg ala ala val thr pro
GTG CTC CTC AAG ACG CAC TGC CCG CTG CGA GCT GCG GTC ACC CCA

430

【 3 1 】

ala ala gly val cys ala arg glu lys pro gln gly ser val ala
GCA GCC GGT GTC TGT GCC CGG GAG AAG CCC CAG GGC TCT GTG GCG

440 450
ala pro glu glu glu asp thr asp pro arg arg leu val gln leu
GCC CCC GAG GAG GAG GAC ACA GAC CCC CGT CGC CTG GTG CAG CTG

460
leu arg gln his ser ser pro trp gln val tyr gly phe val arg
CTC CGC CAG CAC AGC AGC CCC TGG CAG GTG TAC GGC TTC GTG CGG

470 480
ala cys leu arg arg leu val pro pro gly leu trp gly ser arg
GCC TGC CTG CGC CGG CTG GTG CCC CCA GGC CTC TGG GGC TCC AGG

490
his asn glu arg arg phe leu arg asn thr lys lys phe ile ser
CAC AAC GAA GCG CGC TTC CTC AGG AAC ACC AAG AAG TTC ATC TCC

500 510
leu gly lys his ala lys leu ser leu gln glu leu thr trp lys
CTG GGG AAG CAT GCC AAG CTC TCG CTG CAG GAG CTG ACG TGG AAG

520
met ser val arg asp cys ala trp leu arg arg ser pro gly val
ATG AGC GTG CGG GAC TGC GCT TGG CTG CGC AGG AGC CCA GGG GTT

530 540
gly cys val pro ala ala glu his arg leu arg glu glu ile leu
GGC TGT GTT CCG GCC GCA GAG CAC CGT CTG CGT GAG GAG ATC CTG

550
ala lys phe leu his trp leu met ser val tyr val val glu leu
GCC AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG AGT GTG TAC GTC GTC GAG CTG

560 570
leu arg ser phe phe tyr val thr glu thr thr phe gln lys asn
CTC AGG TCT TTC TTT TAT GTC ACG GAG ACC ACG TTT CAA AAG AAC

580
arg leu phe phe tyr arg lys ser val trp ser lys leu gln ser
AGG CTC TTT TTC TAC CGG AAG AGT GTC TGG AGC AAG TTG CAA AGC

【 3 2 】

590 600
ile gly ile arg gln his leu lys arg val gln leu arg glu leu
ATT GGA ATC AGA CAG CAC TTG AAG AGG GTG CAG CTG CGG GAG CTG

610
ser glu ala glu val arg gln his arg glu ala arg pro ala leu
TCG GAA GCA GAG GTC AGG CAG CAT CGG GAA GCC AGG CCC GCC CTG

620 630
leu thr ser arg leu arg phe ile pro lys pro asp gly leu arg
CTG ACG TCC AGA CTC CGC TTC ATC CCC AAG CCT GAC GGG CTG CGG

640
pro ile val asn met asp tyr val val gly ala arg thr phe arg
CCG ATT GTG AAC ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA ACG TTC CGC

650 660
arg glu lys arg ala glu arg leu thr ser arg val lys ala leu
AGA GAA AAG AGG GCC GAG CGT CTC ACC TCG AGG GTG AAG GCA CTG

670
phe ser val leu asn tyr glu arg ala arg arg pro gly leu leu
TTC AGC GTG CTC AAC TAC GAG CGG GCG CGC CGC CCC GGC CTC CTG

680 690
gly ala ser val leu gly leu asp asp ile his arg ala trp arg
GGC GCC TCT GTG CTG GGC CTG GAC GAT ATC CAC AGG GCC TGG CGC

700
thr phe val leu arg val arg ala gln asp pro pro pro glu leu
ACC TTC GTG CTG CGT GTG CGG GCC CAG GAC CCG CCG CTT GAG CTG

710 720
tyr phe val lys val asp val thr gly ala tyr asp thr ile pro
TAC TTT GTC AAG GTG GAT GTG ACG GGC GCG TAC GAC ACC ATC CCC

730
gln asp arg leu thr glu val ile ala ser ile ile lys pro gln
CAG GAC AGG CTC ACG GAG GTC ATC GCC AGC ATC ATC AAA CCC CAG

【 3 3 】

740 750
asn thr tyr cys val arg arg tyr ala val val gln lys ala ala
AAC ACG TAC TGC GTG CGT CGG TAT GCC GTG GTC CAG AAG GCC GCC

760
his gly his val arg lys ala phe lys ser his val leu arg pro
CAT GGG CAC GTC CGC AAG GCC TTC AAG AGC CAC GTC CTA CGT CCA

770 780
val pro gly asp pro ala gly leu his pro leu his ala ala leu
GTG CCA GGG GAT CCC GCA GGG CTC CAT CCT CTC CAC GCT GCT CTG

790
gln pro val leu arg arg his gly glu gln ala val cys gly asp
CAG CCT GTG CTA CGG CGA CAT GGA GAA CAA GCT GTT TGC GGG GAT

800 807
ser ala gly arg ala ala pro ala phe gly gly OP
TCG GCG GGA CGG GCT GCT CCT CGG TTT GGT GGA TGA TTTCTTGTGGT

GACACCTCACCTCACCCACGCGAAACCTTCCTCAGGACCTGTCGAGGTGTCCTCGA
GTATGGCTGCGTGGTGAACCTGCGGAAGACAGTGGTGAACCTTCCTGTAGAAGACGAGGC
CCTGGGTGCGACGGCTTTTGTTCAGATGCCGCCACCGCCTATTCCCTTGGTGGCGCCT
GCTGCTGGATACCCGAGCCCTGGAGGTGCAGAGCGACTACTCCAGCTATGCCCGACCTC
CATCAGAGCCAGTCTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTGCAA
ACTCTTTGGGGTCTTGGCGGTGAAGTGTACAGCCTGTTTCTGGATTTCAGGTGAACAG
CCTCCAGACGGTGTGCACCAACATCTACAAGATCTCTGCTGAGGCGTACAGGTTTCA
CGCATGTGTGCTGCAGCTCCCATTTTCATCAGCAAGTTTGAAGAAGACCCCATTTTTCCT
GCGCGTCACTCTGACACGGCCTCCCTCTGCTACTCCATCCTGAAGACCAAGACCGCAGG
GATGTGCTGGGGGCCAAGGGCGCCCGCCCTCTGCCCTCCGAGGCGGTGAGTGGCT
GTGCCACCAAGCATTTCTGCTCAAGCTGACTCGACACCGTGTACCTACGTGCCACTCCT

【図 3 4】

GGGGTCACTCAGGACAGCCAGACGAGCTGAGTCGGAAGCTCCCGGGGACGACGCTGAC
 TGCCCTGGAGGCGCCAGCCAAACCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCTCGGACTG
 ATGGCCACCCGCCACAGCCAGGCGGAGAGCAGACACGAGCAGCCCTGTACGCGCGGGCT
 CTACGTCCCGAGGGAGGAGGGCGGCCACACCCAGGCGCGACCGCTGGGAGTCTGAGG
 CCTGAGTGAGTGTTGGCCGAGGCTGCATGTCCGGCTGAAGGCTGAGTGTCCGGCTGAG
 GGCTGAGCGAGTGTCCAGCCAGGGCTGAGTGTCCAGCACACCTGCCGTCTTCACTTCCC
 CACAGGCTGGCGCTCGGCTCCACCCAGGCGCAGCTTTTCTCACCAGGAGCCGGCTTC
 CACTCCCCACATAGGAATAGTCCATCCCGAGATTGCGCATTTGTCCACCCCTGCCCTGCC
 CTCCTTTGCCCTTCCACCCACCACCTCCAGTGGAGGACCTGAGAAGGACCTGGGAGCTC
 TGGGAATTGGAGTGACCAAGGTGTGCCCTGTACACAGGCGAGGACCTGCACCTGGAT
 GGGGGTCCCTGTGGGTCAAAATGGGGGAGGTGTGTGGGAGTAAATACTGAATATATG
 AGTTTTTTCAGTTTGAIAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図 3 5 - 1】

CCCCAAAACCCAAAACCCAAAACCCCTATAAAAAAGAAAAATTTGAGGTAGTTTGA
 1 GGGGTTTGGGGTTTGGGGTTTGGGGATATTTTTTCTTTTAACTCCATCAAAATCT 60
 a P Q N P K T P K P L * K K K K L R * F R -
 b P K T P K P Q N * G S L E -
 c P K P Q N P K T P I K K E K I E V V * K -
 AATAAAATATTATTTCCCGCACAATGGAGATGGATATTGATTGGATGATATAGAAAT
 61 TTAATTTATAATAAGGGCGTTTACCTCTACCTATAACTAAACCTACTATATCTTTAA 120
 a N K I L L P P H K W R W I L I W M I * K I -
 b I K Y Y S R T N G D G Y * F G * Y R K F -
 c * N I I P A Q M E M D I D L D D I E N L -
 TACTTCCTAATACATTCAACAAGTATAGCAGCTCTTGTAGTGACAAGAAAGGATGAAAA
 121 ATGAAGGATTATGTAAGTTGTTCATATCGTCGAGAACATCACTGTTCTTCTTACGTTT 180
 a Y F L I H S T S I A A L V V T R K D A K -
 b T S * Y I Q Q V * Q L L * C Q E R M Q N -
 c L P N T F N K Y S S S C S D K K G C K T -
 CATTGAAATCTGGCTCGAAATCGCTTCAATGACTATTCCAAAGTTGCAAAACAATAG
 181 GTAACTTTAGACCGAGCTTTAGCGGAAGTAAGTATAAGTTTCAAGCTTTTGTAAATC 240
 a H * N L A R N R L H * L F Q S C K N N * -
 b I E I W L E I A F I D Y S K V A K T I R -
 c L K S G S K S P S L T I P K L Q K Q L E -
 AGTTCTACTTTCGGATGCAAACTTTTATAAGATTCTTTCTTGAGAAATAGTTTAA
 241 TCAAGATGAAGAGCTACGTTTGAATAATTGCTAAGAAAGAACTCTTTAATCAAAAT 300
 a S S T S R M O I F I T I L S * E N * F * -
 b V L L L L G C K S L * R F F L E K I S F K -
 c F Y F S D A N L Y N D S F L R K L V L K -
 AAAGCGGAGAGCAAGAGTAGAAATGAAACATTACTAATGTTAAATAAATCAGGTAA
 301 TTTGCGCTTCGTTTCTCATCTTTAACTTTGTAATGATTACAAATTTATTTAGTCCATT 360
 a K A E S K E * K L K H Y * C L N K I R * -
 b K R R A K S R N * N I T N V * I K S G N -
 c S G E Q R V E I E T L L M F K * N Q V M -
 TGAGGATTATTCTATTTTATGATCACTTCTTAAGGAGCATTATGGAGAAATTAATTA
 361 ACTCTAATAAGATAAAAAATCTAGTGAAGATTCTCTGTAATACCTCTTTAATGAATT 420
 a * G L F Y F L D H F L R S I M E K I T * -
 b E D Y S I F * I T S * G A L W R K L L N -
 c R I I L F F R S L L K E H Y G E N Y L I -

【図 3 5 - 2】

TACTAAAAGTAAACAGTTTGGATTATTTCCTCAGCCAAATGATGAGTATATTAAT
 421 ATGATTTTCCATTGTCAAACATAAAGGGATCGGTGTTACTACTCATATAATTTAA 480
 a Y * K V N S L D Y F P S Q Q * * V Y * I -
 b T K R * T V W I I S L A N N D E Y I K F -
 c L K G K Q F G L F P * P T M M S I L N S -
 CATATGAGATGAGTCAAAGATCTCGATACATCAGACTTACCAAGAGCAAACTCGCTAT
 481 GTATACTCTTACTCAGTTTCTAGAGCTATGTAGTCTGAATGGTTCTGTTTGGCGATA 540
 a H M R M S Q R I S I H Q T V Q R Q T R Y -
 b I * E * V K G S R Y I R L T K D K L A I -
 c Y E N E S K D L D T S D L P K T N S L * -
 AAAACGCAAGAAAAAGTTGATAATCGAACAGCAGAAAGTATTGCAATTACTATTCC
 541 TTTTGGCTCTTTTCAAACATTAGCTTGTGCTCTTGAATAACGTAATGATAAGC 600
 a K T Q E K V * * S N S R R T Y C I Y Y S -
 b K R K K K F D N R T A E E L I A F T I R -
 c N A R K S L I I E Q Q K N L L H L L F V -
 TATGGGTTTTATTACAATTGTTTGGTATCGACGGTGAACCTCCGAGCTTTGAGACAAT
 601 ATACCCAAAAATGTTTAAACAAATCCATAGCTGCCACTTGAGGGCTCAGAATCTGTTA 660
 a Y G F Y Y N C F R Y R R * T P E S * D N -
 b M G F I T I V L G I D G E L P S L E T I -
 c W V L L Q L F * V S T V N S R V L R Q L -
 TGAAGAGCTGTTTACAACTGAAGGAATCGAGTCTGAAAGTTCTGATGTGTATGCCAT
 651 ACTTTTTGCAAAATGTTGACTTCTTACGCTCAAGACTTCAAGACTACACATACGGTA 720
 a * K S C L Q L K E S Q F * K F C C V C H -
 b E K A V Y N * R N R S S E S S D V Y A I -
 c K K L F T T E G I A V L K V L N C M P L -
 TATTTTGTGAATTAATCTCAATATCTTATCTCAATTTAATGGATAGCTATAGAAACAAA
 721 ATAAAAACATTAATAGAGTTTATAGATAGAGTTAAATTAACCTATCGATATCTTTGTT 780
 a Y F V N * S Q I S Y L N L M D S Y R N K -
 b I L * I N L K Y L I S I * W I A I E T N -
 c F C E L I S N I L S Q F N G * L * K Q T -
 CCAATAAACCATCAAGTTTAAATGAATATACGTTAAATCTTTGGGAAACCTGTTTACGTTGT
 781 GGTTTATTTGGTACGTTCAAAATACCTTATATGCAATTTAGGAAACCTGTTTACGTTGT 840
 a P N K P K C F N G I Y V K S F G T N A H -
 b Q I N H A S L M E Y T L N P L G Q M H T -
 c K * T M Q V * W N I R * I L W D K C T L -
 TGAATTTATATTGGATCTTAAAGCATAGATACACGAATGCTTTAGAGACTGATTTAGC
 841 ACTTAAATATAACCTAAGAAATTCGTATCTATGTGCTTACGAAATCTCTGACTAAATCG 900
 a * I Y I G F L K H R Y T E C F R D * F S -
 b E F I L D S * S I D T Q N A L E T D L A -
 c N L Y W I L K A * I H R M L * R L I * L -

【図 3 5 - 3】

TTACAACAGATTACCTGTTTGGATTACTCTTCTATATCTTTAAAGAGACGA
 901 AATGTTGTCTAATGGCAAAACATTAAGAGACGAGTAGAGATATAGAAATTTCTTCGT 960
 a L Q Q I T C F D Y S C S S L I S L K E A -
 b Y N R L P V L I T L A H L L V L * K K Q -
 c T D D Y L F * L L L L I S Y I F K R S R -
 GGGGAAATGAAGAGAGCTAAAGAGAGAGATTCAAAATTTGTTGATTCTCTGTAAAC
 961 CCGCTTACTTTTCTTCTGATTCTTCTCTAAAGTTTAAACAACTAAGAGACATTGG 1020
 a G E M K R R L L K K E I S K F V D S S V T -
 b A K * K E D * R K R F Q N L L I L L * P -
 c R N E K K T K E R D F K I C * F F C N R -
 GGAATTAACAACAAGATATTAGCAACGAAAGAGAGAGCTACCAATCTGATTC
 1021 CCTTAATGTTGTTCTTATAATCGTTGCTTTTCTTCTCGATAGTTTAGGACTAAG 1080
 a G I N N K N I S N E K E E E L S Q S * P -
 b E L T T R I L A T K K K R S Y I H N P D S -
 c N * Q Q E Y * Q R K R R A I T I L I L -
 TTAAAGATTCAAAATTCAGGTAAGAGAGATACATTCAATTAATTCATATATTATAG
 1081 ATTTCTAAAGTTTAAAGGTCATTCTCTATGTAAGTAATTAAAGATATATAATATC 1140
 a L K I S K I P G K R D T F I K I H I L * -
 b * R F Q K F Q V R E I H S L K F I Y Y S -
 c K D F K N S R * E R Y I H * N S Y I I V -
 TTTTTCATTTCAGAGCTGTTATTTCTTTATCTTAAACATATTTTGGATTAGCTGGAA
 1141 AAAAGTAAAGTGTGACAATAAAAGAAATAGAATTGTTAATAAACTAATCGACCTT 1203
 a F F I S Q L L F S F I L T I F F D * L E -
 b F S F H S C Y F L L S * Q Y F L I S W K -
 c F H F T A V I F F Y L N N I F * L A G S -
 GTAAAAGTATCAAAATGAAGAGAGCGCTAGACTGAGGTAACCTTAGCTTATTCACATTCAT
 1201 CATTTTCTAGTTTATTTCTCTCGGATCTGACTCCATTGAATCGAATAAGTGAAGTA 1260
 a V K S I K * E K R * T E V T * L I H I H -
 b * K V S N K R S A R L R * L S L F T F I -
 c K K Y Q I R E A L D * G N L A Y S H S * -
 AGATCGACCTTCATATATCCAATACGATGATAAGGAACAGAGTATCCGTTTAAAAA
 1261 TTAGCTGGAAGTATATAGGTTAGCTACTATTCCTTGTGCTGAGTGAAGCAAAATTTT 1320
 a R S T F I Y P I R * * G N S S H P F * K -
 b D R P S Y I Q Y D D K E T A V I R F K N -
 c I D L H I S N T M I R K Q Q S S V L K I -
 TAGTGCTATGAGGACTAAATTTTATAGACTCAAGAAATGGAGCGGAATCTTAAATCAAAA
 1321 ATCAGTACTCTGATTAAAAATCTCAGTTCTTTACCTCGGCTTAGAATTAGTTTT 1380
 a * C Y E D * I F R V K K K S R N L N Q K -
 b S A M R T K F L E S R N G A E I L I K K -
 c V L * G L N F * S Q E M E P K S * S K R -

【 ㊦ 3 5 】

[illegible]

【 図 3 7 】

(保 3/6)

1501 CCAGGTGCTGCTGACCCCGAGGCTGCCCTTCACCCCTGTGCGGGCGGGATGTGACACAGATGTT
GGTTCACGACGACCTCGGGCTCCGACGGAGTGTGGACACAGCCGCGCCCTACACTGGTCTACA

1561 TGCCCTCATCTCGCAGACAGATGTCGCGGGCGCCAGGCTCAAGGCCGTTGTGGTCTGGTGTG
AGCGGAGTACAGCGGTCTGTCTGACGCCCGGGTCCAGCTTCGGCAGACACACACACAC

1621 AGCGCCGCGGTGTGCGCGGACAGAGAGCGCTGTGCTCCATTCCGACCCCTTCTCGACGG
TCGCGGGCGACACGCGCGCTGTGCTGTCTGCGACCGAGTAAAGGCGGAAGAAGCTGCC

1741 GACGCGCCCGGTGGTGATTAAACAGATTTGGGGTGGTTTGTCTATGTGTGGGAGACCCCT
CTGCGGGGGCCACCCACTAATTTGTCTATAACCCCAACCAACAGTACACACCCCTGGGGA

1741 GCGCCGCTGAGAACCTGCAAAAGAGAAATACGCGGCTGTGTGTCAAGGAGCGCTGCGCGG
GGCGCGACTCTGTGAGCGTTCCTTTACTTACCTGACACAGTCTCCGAGTTGACGGC

1801 GGAATGTTCTCAGGAGGAGCTCTCGGAGAGCTCCCGGCTCGCGGACAGCAATGTGCT
CTCTACAAGCTCGCTCCGTCAGGCGGCTTCAGGCGCGCGGACAGGCTCTGTTATGCGA

1861 CCTCGGGTTCTGTCGCCAGCGCGTCTACGCGCTCTCGTCTCCCTTTCAGTCTCGGCATT
GGAGCCCAAGCAGGGGTCTCGCGAGATCTCGCGCGGCGAGGAGGGGAAGTGTGAGCGCTGA

1921 GTGTGTGCGCGGCTCGCGACGCGCCGCGCTCGGACGTGGAGAGCTGCTGCTCTCGGA
GCACCAAGCGGCTCTGGGCTGTGCGGGCGCAGGCTTGGACCTCTGTCGGGACCTAGAGGCT

1981 TCAGGCGCGCGCAAAAGGCTGCGCCACGCTGCTGCTTCCAGGAGCTCCACATCATGCG
AGTCGGGTGCGCGGTTTCTCAGCGCGCTGTGCTGACAGGCTCCGCGAGGTGTAGTACCG

2041 CCGTCCCTCGGGTTACCCACAGGCTTAGCGGATTCGACCTCTCTCGCTGGGCGCTCG
GGAGGGAGGCCATAGTGGGTGTCTGATCTCGGCTAAGCTGAGAGAGGCGCGCGGAGCG

Sp1

2101 CTGGCTCCCTGCACCTTGGAGAGCGAGCGGCGCGCGGAGCGCGGAGGCGCCCGACAG
GACGACGAGGACTGTGGGAGCTGCTCGGCTCTGCGGCGCGCGCGCCCTCTGGCGCGGTCTG

2161 CGCGCGGTCTGTGGGAGAGCTCTGCTGTGCGGCGCGAGCGCGGCTCTCCAGTGGATGTG
GGGGCCGAGCGGCGCTCTGTGACGACGACAGCCCGCTCGCGCCGAGGTGCTACCTAAGC

2221 GCGGCAACAGACGACGAGGACCGGCTTCCACGTGTGCGGACGAGGACATGGGACCGCGGCA
GCGGCTTCTGTCGGGTCTGCGGCTGCGGAGGCTGACCGGCTCTCGACGCTCCGCGCGCT

Sp1

E2F

2281 CGGTCGCGCCCTTCACTCTCCAGCTCGCGCTGTGCGCGCGCGCGCGCGCCGCGGCTCG
GGCCTAGAGCGGAGGTGTGAAGGTGTGAGCGGTGACGAGCGGCTCTGGGCGCGGACCGG

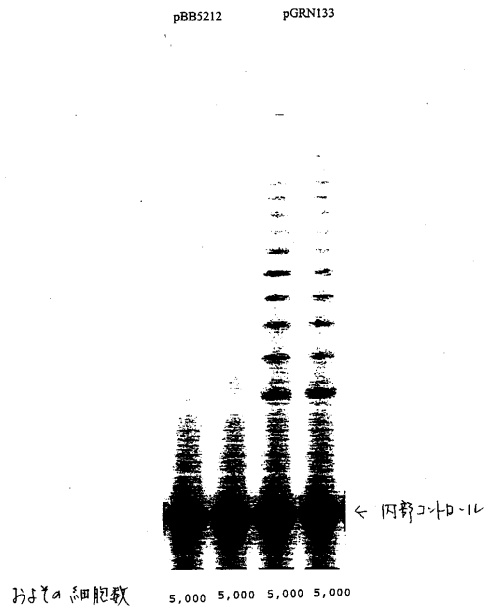
2341 GAAACCTTCCCGGTCCTCGGCGCCAGCGCCCTTCGSGGCCATCCAGCCGTCGCTGCTCT
CTTGGAGAGGCTCCAGGGGCGCGGTCTGGGAGAGCGCCGGTAGGGTCGGACAGGCGAAGG

【図 4 3】

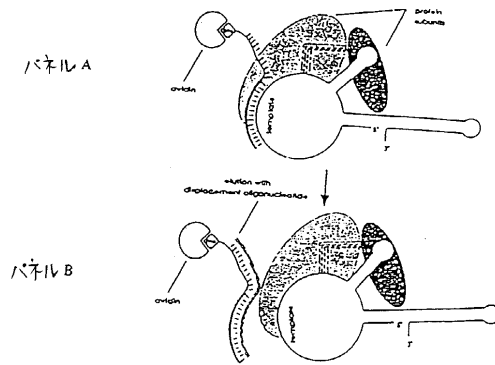
(配列番号 9)

TCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCGTGGCTCACCTGCAGGAG
 ACCAGCCCGCTGAGGGATGCCGTCGTATCGAGCAGAGCTCCTCCTGAATGAGGC
 CAGCAGTGGCCTCTTCGACGTCTTCTACGCTTCATGTGCCACACGCCGTGCGCAT
 CAGGGGCAAGTC

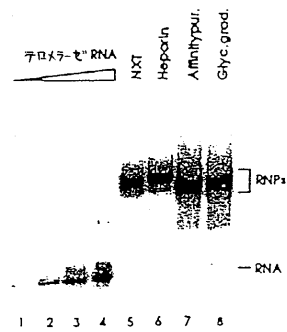
【図 4 4】



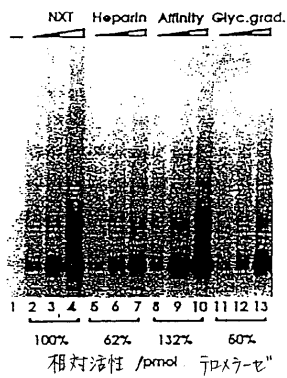
【図 4 5】



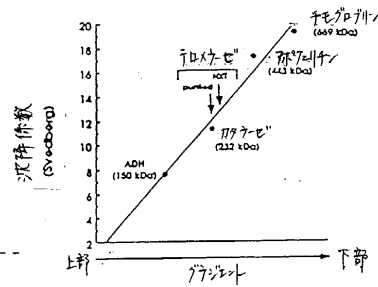
【図 4 6】



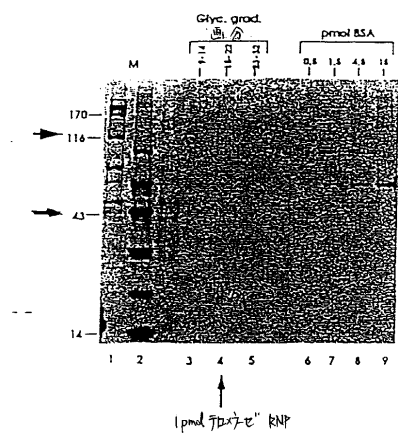
【図 4 7】



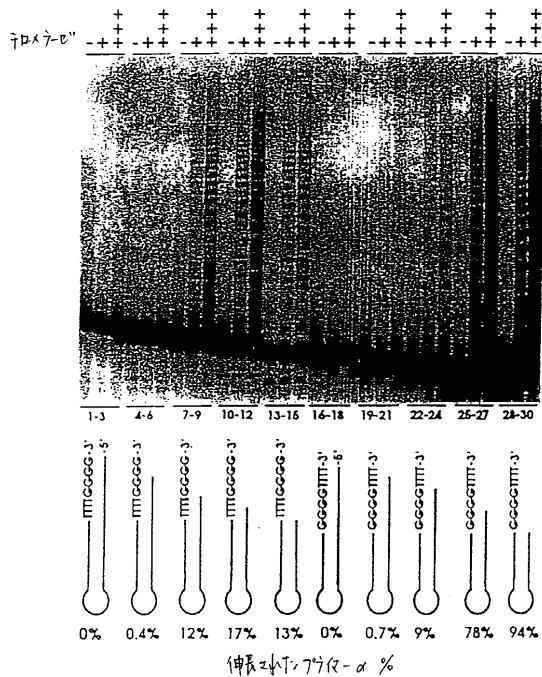
【図 4 9】



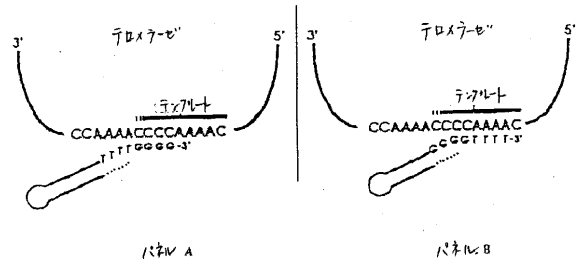
【図 4 8】



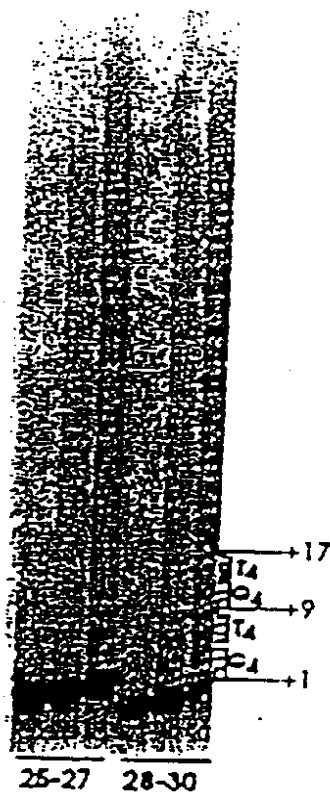
【 ㄨ 5 0 】



【 ㄨ 5 1 】



【 図 5 2 】



【 図 5 3 】

1 CCCCCAACCC CCAAAACCCC AAAACCCCTA TAAAAAAGA AAAAATTGAG
51 TTGGTTTITGA ATAAATAAT TATTCCCGCA CAACATGGGA TGGATATTGA
101 TTGTGGTGAT ATAGAAATTT TACTTCTTCA TACTTCAAC AAGTATAGCA
151 GCTCTTGATG TCACAGAAAG GAATGCGAAA CATTGAAATG TGCGTGGAAA
201 TCGCTTCTAT TGACTATTCC AAGATTTGCCA AAAACAATTAG AGJTCTACT
251 CTCGGGTGCA AACTTCTATA ACGATTCTTT CTTGAGAAAA TTAGTITTTA
301 AAAGCCGGA GAACCAAGAGT GAAATTTGAAA CATTACTAAT GTTTAAATA
351 AATCAGGATA TTAGGATTAT TCTATTTTTT AGATCACTTC TTAAGGAGCA
401 TTATGGTAA AATTACTTAA TACTAAAAAGG TAAACAGTTT GGAATTATTC
451 CCTAGCCAAC AATGATGAGT ATATTAATTT CATATGAGAA TAGTCGAAG
501 GATCTCGATA CATCAGACT CAAACAGACA AACTCGCTAT AAAACGCAAG
551 AAAAAGTTTG ATATTCGAAC ACGAGAAGAA CTTATTGCA TTTACTTTGC
601 TATGGGTTTT ATTACAATGG TTTTGGTAGT CGAGCGTGAA CTCGCCAGTC
651 TTGAGCAAT TGA AAAAAGCT GTTTTCAACT GAAGGAATCG CAGTCTGAA
701 AGTTCTGATG TGATGTCCAT TATTTTGTGA AATTAATCA AATATCTTAT
751 TCTAATTTAA TGGATAGCTA TAGGAAAAA CCAAATTCAC CATGCAAGT
801 TAATGGAAAT TACGTTAAAT CCTTGGGAAC AAATGCGCAC TGAATTATA
851 TTGATTTT AAAGCATAGA TACTCGGAAT CGTTTAGCA CTGATTTAGC
901 TTACAACGA TTACTGTTT TGATTACTCT TGCTCATCTC TTATATCTT
951 AAAAGAAGCA GCGCAATGA AAAGAAGACT AAAGAAGAG ATTCAAAAAT
1001 TTGTGATCT TTCTGTAAGC GGAATTACA ACAAGAATAT TAGCAACGAA
1051 AAAGAAGAAG AGCATTTACA ATCTGATGCT TTAAGAATTT CAAAAATCC
1101 AGGTAAGAGA GATCATTTCA TTTAAATTTCA TATATTATAG TTTTTCATT
1151 CACAGCTGTT ATTTTCTTTT ATCTTCAATA TATTTTITTA TTAGCTGGAA
1201 GTAAAAAAA TCAAAATAGA GAAGCGCTAG ACTGAGGTAA CTGACTTAT
1251 TCACATTTAC AGATCGACTC TCATATTATC AATACATGTA TAAGGAACA
1301 CGAGTCATCC GTTTTAAAAA TGTGCTATG AGGCATAAAT TTTAGATGT
1351 AAAGAAATGG CCGCAATCT TTCTCAAAAA GAATTGGCGT GATATTGCAA
1401 AAGAATCGAA CTCATAACT TTTGTTAATA AGTATTACCA ATCTTGATT
1451 ATTGAAGAGA TTGACGAGGC AACTGCGACG AAGATCACTA AAGAAATAAA
1501 GTAATCTTIT TTAATTAGAG AATAAACTAA ATTACTAATA TAGAGATGAA
1551 CGATCTTCAA TTGAGTAAT AAAAGCTGAA CTTAAAGTTG ACAATAAAAA
1601 ATACAAACCT TGGTCAATA ATTAGGAAGG GAAAAAGAAG CCAAGTAGCA
1651 AAAGAAAAAA TAAAGCAATA AATGAATAAG TCACAGAAGT GAAGAATAAA
1701 AAGGATTTAT TTTTTCATA ATTTATTGAA AAGAGGGGTT TTGGGGTTTT
1751 GGGGTTTTGG GG

【図 5 4】

CCCCAAACCCCAACCCCAACCCCTATAAAAAAAGAAATTCAGTAGTTAGA
 40
 40GGGTTTGGGGTTTGGGGTATTTTCTTTCTTTTAACTCCATCAAACTCT
 4
 3
 2
 1
 P O N P K T P K P L . K X K L R . F R .
 P O N P . P O N P . K K R K N . C G S L E .
 P K P O N P . P Y P I K K E . K E V V . K .
 61
 AATAAAATATTATTCCTCCCAACAAATGGAGTGGATGATTTGATGATAGAAAAT
 120
 TTATTTTATAATAGGGCGCTTTACCTCTACCTAAGTAACCTACTATATCTTTAA
 4
 3
 2
 1
 N K I L F P P K W R W I L I W H I . X I .
 I K T Y S R T N G D G Y C F C C . Y R K F .
 W I I P A O H E M O T D L D D I E N L .
 121
 TACTCTTAATACATCAACAGTATAGACGCTCTTTGTAGTGAAGAAAGATGCAAAA
 180
 ATGAAGCATTATGTAAGTTGTATCATCTCTCGAGAACATCACTGCTCTTCTCTCTCT
 4
 3
 2
 1
 Y F L I H S T S I A A L V V T R K D A K .
 T S . Y I Q Q V . O L L . O E R H Q N .
 L P . T F N K Y S S C S D K K O C K T .
 181
 CATGAAATCTGGCTGAAATGGCTCTCATTTGATATTCCTCAAGTGTGCAAAACATAG
 240
 GTAACCTTACGCGAGCTTTACGCGAAGTAAGTGAATGCTTTCAACGTTTGTATATC
 4
 3
 2
 1
 H C N L A R N R L H C L F O S C K N N .
 I E I W L E I A F I O Y S K V A X T I R .
 L K S C S A S P S L T I P K L O K Q L K .
 241
 AGTCTACTCTTCGATGCAAACTTTTAAAGATCTCTTCTGAGAAAATAGTTTAA
 300
 TCAAGTGAAGCAGCTACGCTTAGAAAATCTGCTGAAGAAAGACTCTTTTATCAAAAT
 4
 3
 2
 1
 S S T S R H I F L T I L S C E H . F .
 V L L L G C K S L . R F F L E K I S F R .
 F Y F S D A N L Y N D S F L A K L V L K .
 301
 AAAGCGAGAGCAAGATGAAATGAAACATTAATCTTAAATGAAATGAGATAA
 360
 TTTGGCTCTGCTTCTCATCTTAACTTTGTATGATTAACATTTTATGATGCTATT
 4
 3
 2
 1
 K A E S K E . K L K H Y . C L N K I R .
 X R R A S R N K N I T N V . I K S C N .
 S G E Q A V R I E T L L H F K . N O V H .
 361
 TGAAGATTTCTATTTTATGATCTCTTAAAGGACATTAAGAGAAAATGACTTAA
 420
 ACTCTTAATAGATAAAGATCTAGTGAAGATCTCTCTGATTAAGCTCTTTTAAAGAT
 4
 3
 2
 1
 C G L F Y F L D H F . L S I H E R I T .
 E O Y S I F . S G I L S . G A L W K L L S .
 R I I L F F R S L L K E H Y C E N T L I .
 421
 TACTAAAGGTAAAGCTTGGCATTATTCCTGAGCAACATGATGAGTATTAATTT
 480
 ATGATTTTCTGATTTGCAAACTTAAAGGATGCTGCTGATTAAGCTCTCATATATTA
 4
 3
 2
 1
 Y . X V N S L D Y F P S Q C C V Y . I .
 T . T V H I T S L A N H D E T I K F .
 L K C K Q F G L F P . P T H M S I L N S .

【図 5 5】

(続き)

CATATGAGATGAGTCAAGGATTCGATACATCAGACTTACCAAGACAACTGCTAT
 540
 GTATACCTCTTACTAGTTCTCTAGAGCTATGATGCTGAAATGCTTCTCTGAGGAGATA
 4
 3
 2
 1
 H H R H S O R I S I H O T Y O R O T R Y .
 I L C E C V K G S R Y I R L T K D K L A I .
 Y E H E S K O L D Y S D L P K T H S L .
 541
 AAAACCGAAGAAAAGTTGATAATCGAACAGAGAGAACTTTATGCTATTACTATCG
 600
 TTTTGGCTCTTTTCAAACTATTAGCTTGTCTCTCTGATAACGTAATGATAAGC
 4
 3
 2
 1
 K T O E R V C . S H S R R T Y C I Y Y S .
 K R K K F D N R T A E E L I A F T T I R .
 H A R K S L I E D O K H L L H L L V .
 601
 TATGGTTTATTACAAATTTTATGATTCAGAGCTGAACTCCGAGCTCTGAGACAA
 660
 ATACCCAAAATATGTAACAAAATCATAGCTGCACTTGGGGCTCAGAACTCTGTA
 4
 3
 2
 1
 Y G F Y Y H C F R Y R R C T P E S C D N .
 H G F I T I V L C I D C E L P S L E T I .
 W L L O L F . V S T V H S R V L R O L .
 661
 TCAAAAAGCTTTTACAACTGAAGGATGCACTCTGAAAGTTCTGATGATGAGCT
 720
 ACTTTTGTCAAAATGTTGACTCTCTAGCTCAAGACTTCAAGACTACAGATGAGTA
 4
 3
 2
 1
 C K S C L O L K E S O F C K F . C V C H .
 E K A V Y P C A R H R S S E S B V Y A I .
 K L F T T E G I A A L K V L R C H P L .
 721
 TATTTGTGAATTAATCTGAAATCTTATCTCAATTAATGATAGCTATGAGAAAA
 780
 ATAAACACTTAATAGAGTTATAGAAATAGAGTTAAATACCTATGATATCTTCTT
 4
 3
 2
 1
 Y F V N . S O I S T L H L H D S T R K .
 L K Y L I S I . W I A I E T H .
 F C E L I S H I L S O F N G . L . K O T .
 781
 CCAAAATGAAGCTGCAAGCTTTAATGCAATATAGCTTAACTCTTGGGCAAAATGAC
 840
 GGTATTTGATGCTCAAAATGCTTATGCAATTTAGCAAGCTCTTATGAGTGT
 4
 3
 2
 1
 P K P C K F N G . I Y K S F G T H A R .
 Q I H H A S L H E Y T L H P L G Q H T .
 K T C Q V . W N I R . I L M D R C T L .
 841
 TCAATTTATGAGTCTTAAAGCAGATACAGAGATGCTTATGAGATGATTTAGC
 900
 ACTGATTTGATGAGCTTATGAGCTTATGAGCTTATGAGCTTATGAGCTTATGAGCT
 4
 3
 2
 1
 C L I C F L K H R Y T E C F R D C F .
 E F I L O S . S I D T O H A L E T D L A .
 M L T . L S A . I H R H L . R L I . L .
 901
 TTACAAACAGTACTCTTTGATGCTCTGCTCATCTTATATCTTTTAAAGAGCA
 960
 AATCTCTCTATGCAAACTATGAGAACTGAGAGATGAGAGATATGAGAAATTTCTCT
 4
 3
 2
 1
 L Q Q I T C T O Y S C S S L I S L K E A .
 Y H R L P V L I T L A H L L Y L . R K O .
 T T D Y L F C L L L L I S Y I P R S R .
 961
 CGGCAATCAAAAGAGCAAAAGAGATTTCAAAATTTGTTATCTTCTTCTTAAAC
 1020
 CGGCTTACTTTCTCTGATTTCTCTTCTTAAAGTTTAAACACTGAAGAGAGATG
 4
 3
 2
 1
 G E H K R R L K X E I S K F V D S S V T .
 A R C I D . R K R F O H L L I L L . P .
 A H E S T . K E R D F K I C F F C H R .
 1021
 GGAATTAACAGAGAAATTTAGCAACGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 1080
 CCTAATTTCTCTCTTATATCTCTGCTTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 4
 3
 2
 1
 C I H H S H I . S H E K E E L S O S C F .
 E L T T H I L A T K K K K S Y H M P D S .
 W . Q D E Y . O P K R R A I T I L I L .

【図 5 6】

(続き)

TTAAGATTCCAAAATTCAGGTAAAGAGATATCATCTTAAATTCATATATTATAG
 1140
 AATTTCTAACTTTTAAAGTATTTCTCTTATGATGATTTTAAAGTATATATATC
 4
 3
 2
 1
 L K I S R I P C K R D T F I K I H I L .
 K O F K N S R . E R Y I H . N S Y I I V .
 1141
 TTTTCTATTCAGAGCTTTATTTCTTTATCTTAAAGATTTTGTATGATGAGAA
 1200
 AAAGCTTAAGCTTCAAGTAAAGAAATAGAAATGTTTATTAAGAACTATGAGCTT
 4
 3
 2
 1
 F F I S O L L F S F I L T I F F O . L E .
 F S F H S C Y F L L S . O Y F L I S W K .
 F H F T A V I F F Y L N N I F C L A G S .
 1201
 CTAAAGATCAAAATGAAGAGCGCTAGAGTGAAGTAACTTACCTTATTCATATCAT
 1260
 CATTTTCTATAGTTTATCTCTCTGCGGATCTGAGCTGATTAAGTGAAGTGAAGTA
 4
 3
 2
 1
 V K S I K . E K R . T E V T . L I H I H .
 K V S K R S A R L R . L S L F T F I .
 K K Y D I R E A L D C N L A T S H S .
 1261
 AGATGACCTCTCATATTCATAGAGATGATGAAGGAACAGAGCTATCCGTTTAAAA
 1320
 TCTAGCTGAGATATAGATGATGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 4
 3
 2
 1
 R S T F I Y P I R C . G H S S H P F . K .
 D R P S Y I Q Y D D K E T A V I R F K N .
 I O L H I S H T H I P K Q S S V L C .
 1321
 TAGTCTATGAGAGTAAATTTTATAGCTGAGAAATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 1380
 ATCAGGATGCTGATTTAAAAATCTCAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 4
 3
 2
 1
 C Y E D . I F R V K K S R N L N O K .
 S A R E L R F L E S R H C A E I L I K I .
 V L C G L N F . S O C H E P K S . S K R .
 1381
 CAATTTGCTGATATTGAGAAAGATGAGATCTTAAATCTTCTCTTAAAGTATTACCA
 1440
 CTAAAGCAGATTAAGCTTTTCTTATGCTTGAATTTAGAAAGCAATTTATCATAAAGT
 4
 3
 2
 1
 E L R I T C K R I E L . I F R . V L P .
 H C V Z I A K E S H S K F V N A Y Y O .
 I A S I L O X N R T L N L S L I S E T H .
 1441
 ATCTTCTGATTTGAGAGATTTACAGGCACTGAGAGAGATCTTAAAGAAATAA
 1500
 TAGAACTAAGTCT
 4
 3
 2
 1
 I L I D C R D . R G N C T E D H . R H R .
 S C L I E F I D E A T A O N I K E I K .
 L O C L K R L T R O L H R R S L I K K . S .
 1501
 CTAACTTTATTAATAGAGATAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
 1560
 CATGAGAAATGATTAATCT
 4
 3
 2
 1
 V T F E H . R I H . L T H I E I S O L O .
 L L L I R E . T K L L I . R S A I F N .
 N F Y . L E N K L N Y . Y R D O R S S I .
 1561
 TTGAGCAATTAAGAGTAAAGTATGAGCAATTAAGCAATTAAGCAATTTCTCTCTCTCT
 1620
 AACT
 4
 3
 2
 1
 L T K . X L N . S . T I K N T H L G Q N .
 C R N X S C T K V R O . K I O T L V K I .
 D E I A E L N L D K K K T K P S . I .
 1621
 ATTGAGCAAGCAAG
 1680
 TAAGCT
 4
 3
 2
 1
 I E C K E D O L A K E I R O . I X C .
 L R K E X T S . O K R K . G H X . H E .
 C G R I A R P V S R E H A I Y A R S .

【図 5 7】

(続き)

GTACAGAGTGAGAAATAAAGATTTATTTTTCATAATTTATTGAAAGAGGGGTT
 1740
 CATCTCTCACTCTCTTTATTTCTAAATAAAAAAGTTATTAATAACTTTTCTCCCAA
 4
 3
 2
 1
 V O K C R H K R P I F F H N L L K R G V .
 Y P S E E I K D L F F S I I Y C K E C F .
 T E V X K . K I Y F F O . F I E K R C F .
 1761
 TTTGGGTTTGGGGTTTGGGG
 1762
 AATCCCAACCCCAATCCCA
 4
 3
 2
 1
 L C F W C F C .
 W G C V L G .
 G V L G F W .

【 図 6 3 】

70x70 p43
 La
 Xenopus Laa
 Drosophila La
 S. c. Lhplp

LQROEFYSDANLYNDEFARKLVLSKSGORVEIETLLM
 ICHOEYVFGDFHLPFRKKEQI.KLDEGWVPLEIMIK
 ICEHOEYVFGDFHLPFRKKEQI.LLDDGWVPLETMIK
 ILROEYVFGDFHLPFRKKEQI.IGKEDGWVPLSVLVT
 CLROEYVSGSEHFPMDRRTTAEK.NDGWVPISTIAT

【 図 6 4 】

1 aactcaatta attactaatt taatcaacaa gattgataaa aagcagtaaa taaaaccctaa
 61 tagatttaal ttagaangta tcaattgaaa aatggaaatt gaaaacaact aagcacaata
 121 gccaaaagcc gaaaattgt ggtgggaact tgaattagag atgcaagaaa accaaaatga
 181 tatataagt agggtaaga ttgacgatcc taagcaatat ctctggaacg tcactgcagc
 241 atgtgtng taggaagga gtactacta agataaagt gaaagaagat atactatcac
 301 taaagcact ctgaggggtg ctgactciga tctgagttc atctgctagt tggcagctca
 361 catccgaat gaacttaca tcaagaactac cactaactac atttagcat ttgtgtgt
 421 ccacaagaat actcaacctc tcatcgaaaa gtacttcaac aaagcagtac ttgtgctaa
 481 tgcattactg gaactgtg aattgcata ggttcttat attttgatg caactgaatt
 541 caaaattgt tatctgata ggatacttc atagaatat ctgaaggaa actctttccg
 601 taagtgtta caaagatgcg tcaagaagaa gttttcgtga tcaacgaat actaacttgg
 661 taagtattgc actgaatctc aacgtagaag acaattgtc cgttaacctc cagttaacca
 721 caagtaaaag tggattataa ctaagaagaa gagaagaag aacttcttaa ccaaaactta
 781 ggcaataaag gaacttgaag ataagttcaa gagagaactc ggagacataa tgaacgttga
 841 agatgaactc aaggttmaa aaccagcagt taagaagaa atagccaaga gatagaatgc
 901 catgaagaa cacatgaagg caccataaat tcttaactct accittgaat caaagtactt
 961 gaccttcaag gatcttata agttctgcca tattttcag ctaagaagaa gacttctata
 1021 gatcttgggt aaaaataacc ctaagccga agaggaaatc aaagcagctt ttgtgtatc
 1081 tgcatttga cctcttaact ctgaattgg tggaaagcgt atgaagattg aaacttctaa
 1141 aacatgggaa atgaagatca gtgcaaaagg caacacgtc gaggtttggg ataatttaa
 1201 ttaagcaat taactccatc ataagccatc gttacgtaac ttgttcaaa tcttaaaagc
 1261 cgggtttca gatactacac actctatgt gtatcaacag attgtgaac ccaaggcgt
 1321 tgaagactcc aagatgttcc ctcttaatt ctttagtgcc atagaagcgt taaatgaagc
 1381 agttactaag gaattcaag ccaagaagag agaaaatag aactttaaag gtcaaatcga
 1441 agcagtaag gaagttgtg aaaaaccga tgaagagaag aaagataagg agttggagta
 1501 aaccgaagaa ggagaatttg ttaagttcaa cgaaggaatt ggcaagcaat acataactc
 1561 catgaactc gcaatcaaga tagcagttaa caagaattta gatgaatca aaggacacac
 1621 tgcacttctc tctgaattt cttgttctat gattacttca atgacagtg ggaccaagaa
 1681 gtaagttcc gttcgtactt gttcgtagtg tgcattagtc ctgtgttga tggtaaaata
 1741 acgtttgaa aggttctatc tctactctc cagttcactc agtttcaat gcaataagtg
 1801 ttacttgaag gttgacttcc ctggagacga acttcttctc tctatgtaa aacttttga
 1861 agagaagaa aacttgggtg gttgacttca ttccctatc gaggttactg atgaatgac
 1921 aaagaataaa actcagtgag acaatactg tattttgtc galaatga tgcagaagg
 1981 atattcagat atcaagtta gaggcagtc cattgttaac agcatcaaaa agtaagaag
 2041 tgaagtaaa cctaactaa aaacttttgc agttgactta gaaggttacc gaaagtgcct
 2101 taactttagt gatgattca atgaacaaa ctactacaa atattcgtta tgaagcattc
 2161 aacttcaag ttacttcaag ccaagcaagg aggaagcaat atgttgaag ttatcaaaa
 2221 ctgttgcctt caaaaaatag gacaaaagtg agtttctga gatttcttca taacaaaat
 2281 ctacccccc ttittgttt tattcatag ccaattgaa atttaata ttactatt
 2341 atttaagta cttaactagt ttatgtatg cagtttata gccatttcaa atgattctgc
 2401 aaagaacaa aagattaaa a

【 図 6 6 】

1 tcaatctat taattaata ataaaaaaa gcaactaca aagaanaatg caagcgttaa
 61 ctaaaaaag ccataggctc ctatagcaa tgaacaaat ctgattgt tattcaaaa
 121 tctagaatt tcaaaaagcc agattagca ttataagcc tagtgaatt agatcaaaaga
 181 ggagatctc aagcttttaa agttcaaaaa taagattag gatgaaact ctggcaacga
 241 tgaatgatg gaagaacaa actcaataaa ataatagaa ttataagga gacttaata
 301 gattaagtg caagttaat tgaataaaaa agttgttctt aagttatga aagatttga
 361 tttagcga gatgaacaa aagaagaatg acttttga tgcacagta aagaagatga
 421 attaagaag attactgaag aatgatttaa gttataaat ttatattta actatgacta
 481 ccagttagt taaattgga gttgtgcca tgaagaacac aagaagaaa cagattaga
 541 tctgaaaaa tggttgaaa tatcttca ccaaaaaat tatgtatca ttacgccaa
 601 ctaaaagca tcaattgtt ggtgtctaa agattattt ataaaaaa attatgata
 661 tcttaagta agcatatca gactagaac tgaagccga ttactgtct tgaattgtt
 721 ttcaacaa atcaaaacta ctataactc ttactagt gttacatag agtttaatt
 781 tgaataat ctctgtatc tgcattgt tagatttta ttactatag aagattcaa
 841 tatttgaat ataagattt ctatcaag aaataaat atttttga aattgttga
 901 gctacttga actatctgc cagtttct ttctatgc cacttcaag gcttcaatt
 961 caagttctc tgcgaagctc tcaattatt agttactcc ttactataa tgaagttaa
 1021 agatgctaa ttataggtt acttttctc tacaactta aaatagtg acactaaca
 1081 agttcaagat tatttaagt tcttataaga atcttctgt ttgactatg taagctaga
 1141 ggctatcca gttatgcta ctacagctg agagaacact aattttac ttaaaaggt
 1201 caagctatg aattttatt tggttcat cctactttaa ttcaatttg attttactt
 1261 ttgttaata taacttga aattagatt ttgattaga ccaaatatt tgaacaaa
 1321 aaagcttga aatttactt ttgattaaa atactcaaaa aacttcaat tttaagtt
 1381 aaactttac actcagcttg cttagaacac ctccagaaa cagatttaa acaagctac
 1441 aaactcaaa aattcaaaa acaataaaa tcaagaagaa acttcttga ctaagattga
 1501 aacttcaag gaagcacaac gttgtatga atttttga catcttctg aattaccca
 1561 gcttgaagt tcaagcgtta actgttgaac taaccaagaa attatgata gcttgcaca
 1621 actttgaat agatcaaca atttaagaa gttcaattta agttcaaat atgaatgga
 1681 aaagattaa atggtatcat tcatgatct taagaattat tatgaacct taacactt
 1741 taaaagatg tctgttata tatcaaatcc taaggaac attttatg aactgacaa
 1801 taaagattct acttttata aatttaact gacttcaac taagaattat aacagctaa
 1861 gttactttt aagtagaac aatttattt ttaataactt aaagtgcaa aatttgaatc
 1921 ttcttatta gaaagctag aagattatga tagttttgc aaactatg ctcttga
 1981 aaattcaaa aatttataa ttatgccag ttgtcttat cccaacaa ttagaataa
 2041 tcttcaat aagcccaact ttctattt caagcaatt gaataatga aaaaattga
 2101 aaagtactc atcaactga ttcttataa gcatatact aatttatt cagaattct
 2161 agaaagaat aaaaaataa aagattcat ttgaaga aattattat tacaattta
 2221 tctgtattt acttaattt ttaaacact tcaatagta cctgaataa attagttta
 2281 caattatg caattaga aattgactg gatgagta cataagtag taaggtaaa
 2341 ccacaagca aaagcttct atgaacctt atgtgattt atcaagaat catcttaac
 2401 ccttagcta atagatttg accaaacac tgaatgatt gacttatta aaagatttt
 2461 agaattata tctgactta agtatcata ttattgaa tgaacctta gttatctag
 2521 cagttattt aaacttga aagaagaat ttaagaactt ccaagctt gcgacgaaa
 2581 aggttatta gtaaaagat actataatt ccttactt ttaccaactg gacttatta
 2641 cgttactat tcatagatg ggttgaatt taaattatg ttaataaa tattaatt
 2701 tgaatttc ttgctattt attgataa tacaataat agtatttt agttttga
 2761 atataata gttatttat tcaatttt aagtaataa ttaatttca atcaattt
 2821 aaaaaag

【 図 6 5 】

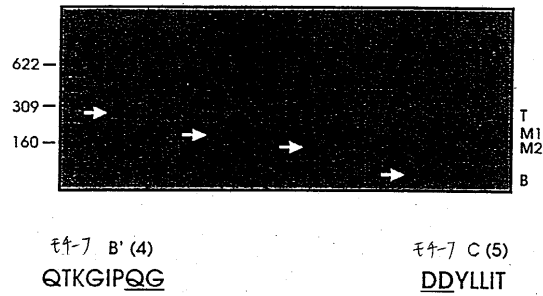
MEIENNQAQQPKAEKLWWELEMEQENQNDIQVRKIDDPKQYL
 VNVTAACLLQEGSYQDKDERRIYITKALLEVAESDPEFICQLAVYRNELYIRTTTN
 YIVAFVHVHKNTPFIEKYFNKAVLLPNDLLEVCEFAQVLYIFDATEFNKLYLDRILS
 QDIRKELTFRKLCQRVRSKFSEFNEYQLGKYCTESQRKKTMFRLSVTNKQKWDQTK
 KKRKENLLTKLQAIKESDCKSKRETGDIMNVEDAIALKPAVMKKIAKRQNMKKHMK
 APKJPNSTLESKYLTFKDLIKFCHISEPKERVYKJLGKKYPKTEEYKAAFSDSASAP
 FNPELAGKRMKJESKTWENELSAKGNTAEVWDNLISSNQLPYMAMLRNLNLKAGV
 SDTTHSVINIKCEPKAVENSKMFPLOFFSAIEAVNEAVTKGFKAKKRENMLKQIE
 AVKEVVEKTDDEEKKDMELEQTEEGEFVKVNEGIGKQYINSIELAKIAVKNKLNDEIKG
 HTAIFSDVSGSMSTSMGGAKKYGVSRVTECALVLGRMLVKQRCEKSSYFIFSSPSQ
 CNKCYLEVLDLPDELRLPMQKLLQEKGLGGGTDFPEYECIDEWTKNKTHVDNVLSD
 MMIAEGYSYDINVRGSSIVNSIKKYKDEVNPNKIFAVDLEGYGKCLNLGDEFENNYI
 KIFGMSDSILKFSAKQGGANMVEVIKNFALQKIQKQK

【 図 6 7 】

MSRRNQKKPQAPIGNETNLDFVLQNLVEYVKSQIEHYTKQQQK
 EEDLKLKFKNQDQDGNNGNDDDEENNSNKQJELLRVNQIKQVQLIKKVGSKVEK
 DLNLNEDENKJNLSEQQVKEEQLRTITEBQVKYQNLVFNMDYQLDLNESGGHRRHR
 ETDYDETEK WFEISHDKQNVSYIANQKTSYCVWLKDFYKNKNYDHLNVSINRLETA
 FYAFDDFSQTKLNNYSYQTVNIDVFNDFNNLCLALLRFLLSLERNILNRSSYTRN
 QYNFEKIGELLETIFA VVFSHRHLQGIHLQVPCFAQYLVNSSSQVSKDSQLQVYSF
 STDKLVDNKNVQDYFKLQEFPLRTHVSQQAIPVSATNAVENLNLKVKHANLNL
 VSIPTQNFDFYFVNLQHLKLEFLEPNILTKQLENLNLKQSKNLKFLRLNFYTY
 VAQETSRKQLKQATTIKNLKNKNQEEETPETKDETPSESTSGMKFFDHLSELTELE
 FSVNLQATQEIYDSLHLKLIIRSTNLKFKFLSYKYEMEKSKMDTFIDLKNYETLNLK
 RCSVNSINPHGNISYELTNKDSFYKFLTLNLQELQHAKYTFKQNEQFNNVKSAKIE
 SSSLESLEDIDSLCKSIASCNKLQNVNIIASLLYPNNIKQNPFNKPLNLFKQFEQLK
 NLENVNSINCILDQHLNLSIFELEKNKKIAFILKRYLLQYLDYTKLFTLQQLPE
 LNQVYINQQLLELTVSEVHKQVWENHKQKAFYEPLCEFIKESQTLQIDFDQNTVSD
 DSIKKJLESISESKYHYHLRNLPSQSSSLIKSENEIEQLLCAKDEKGVLVKAYYKFP
 LCLPTGTYYDYNDSRW

[illegible]

【図 80】



【図 81】

PCR産物M2は、他のテロメラーゼタンパク質と適正な整合性を示した。

```

Ot          LCVSYILSSFTYANLEENALQFLRKESNDPEKPEKNLLMRLT
Sa_p123     KGIPQGLCVSSILSSFTYATLEESLGLRDESNMNPENVNLLMRLTDDYLLIT
Sp_M2       SILSSFLCHFTYMEDDLEYSFKKK-----GSVLLRVV
Sc_p103     DGLFQSSLSAPFVDLVYDDLEFYSFKASPS-----QDTLLKLADDPLIIS

```

```

Q K V G I P Q G
caa aaa gct gct acc cct cag gg ..... <--- 実際のゲム配列

```

```

T M1
c a a g c c c c g
cag acc aaa gga att cca caa gg -----

```

```

ag acc aaa gga att cca caa ggc tca att ctg tca tct ttg tct cat ttc tat atg
cc tgg cct cct caa ggt agt cgg agt taa gac agt aga aaa aac aca gta aag ata tac

```

```

K G I P S G S I L S S F L C H F Y N

```

```

GAA GAT TTG ATT GAT GAA TAC CTA TCG TTT ACG AAA AAG AAA CGA TCA GTG TTG TTA CGA
CTT CTA AAC TAA CTA ATT ATG GAT AGC AAA TGC TTT TTT GCT AGT CAC AAC AAT GCT

```

```

B D L I D E Y L S F T K K K G S V L L R

```

```

GTA GTC gac gac tac ctc ctc acc acc
CAT CAG ctg ctg atg gag gag tag tgg

```

```

V V D D Y L L I T

```

```

----- ctg ctg atg gag gag tag tgg
a a a a a a a a
c c t c t c
c c

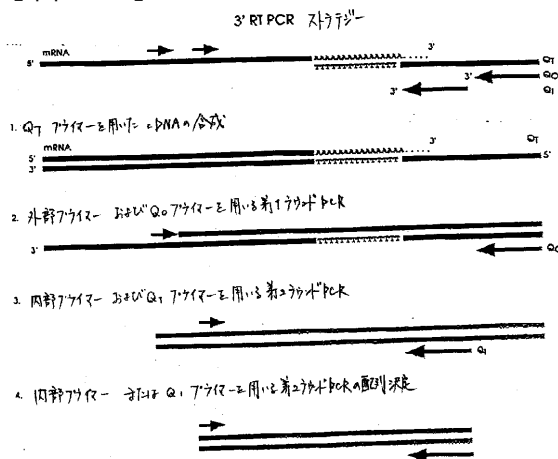
```

```

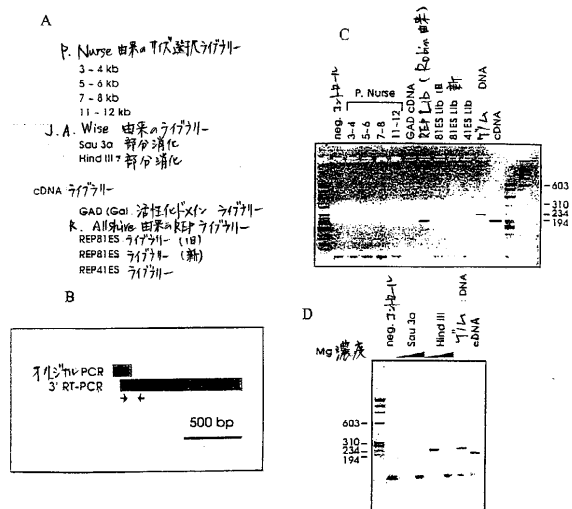
.....gac gat ttc ctc ctc ata aca..... <--- 実際のゲム配列
D D F L F I T

```

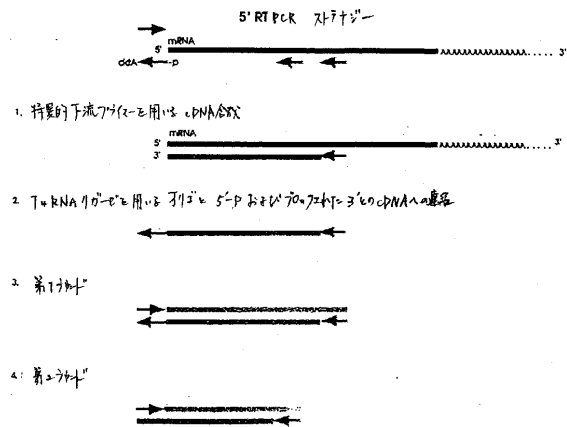
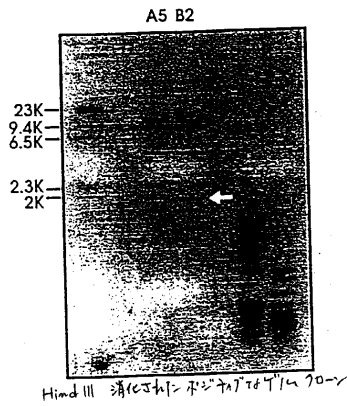
【図 82】



【図 83】



【 図 8 5 】



【 図 8 7 】

70 x 7-e 船煤 77 ユニット 由米の RT トイレ のアラインメント

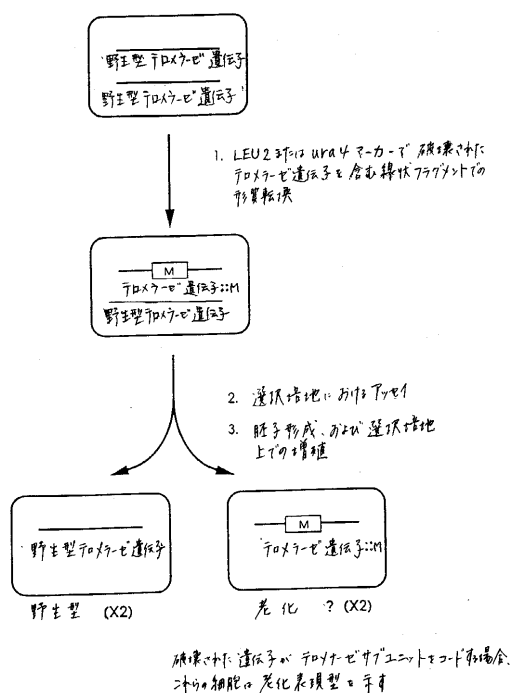
```

          4-7 0
S.p. Tez1p (429). WLYNSFIIPLOSGFYLTSSDLSNRNIVVFRKDIW ... (35)...
S.c. Est2p (366). WFLFRQLPKIKIIITFFVCYTSSTVT--IVVPRDHW ... (35)...
E.a. p123 (441). WIFEDLVSLRLCFPVTBQQKSYSKYTYRKNW ... (35)...
          * * *
          4-7 1 2 3 K
          p h h k k h r h R
S.p. Tez1p AVIRLLPKK--NTRFLIIN-LRKFR ... (61)...
S.c. Est2p SKMRIIIPKKSINFRIIIALPCRGAD ... (62)...
E.a. p123 GLRLRIPKK--TTRFPIMTFPCIV ... (61)...
          * * *
          4-7 3(A) AF
          h hdh GV h
S.p. Tez1p KKVFRVIDIKSCYDRIKQDLMFRIVK ... (89)...
S.c. Est2p ELYFMKFDVKSCYDSIPMECKMRILK ... (75)...
E.a. p123 XLFFATMDIEKCYDSVNRKLSFLTK ... (107)...
          * * *
          4-7 4(B)
          nPG pP h h
S.p. Tez1p YLQVGTGPGQSISLSPCHYFMDELIDEVLSF ... (6)...
S.c. Est2p YIREDDGPGSSLSAPIVDVLDDLEFYSF ... (14)...
E.a. p123 YKQTKGIPQGLCVSISLSFFYATLESSLG ... (8)...
          * * *
          4-7 5(C)
          L F Ddh h Gh h cK h
S.p. Tez1p VLIRVVDFDLFLITVNNKDAKKFLNLSLGRGFEKHNFITSLKTIIVFNFS ... (205)...
S.c. Est2p LILKLADELFIILSYDQGVNVIKILAMGQFQRYAKAKNRDKILAVSSQS ... (173)...
E.a. p123 LMLPTDIIITDTIQNNVALVIEKILNVSREKYNFENMKRLKTSFPLS ... (209)...
          * * *
          4-7 6(D)
          L F Ddh h Gh h cK h
S.p. Tez1p VLIRVVDFDLFLITVNNKDAKKFLNLSLGRGFEKHNFITSLKTIIVFNFS ... (205)...
S.c. Est2p LILKLADELFIILSYDQGVNVIKILAMGQFQRYAKAKNRDKILAVSSQS ... (173)...
E.a. p123 LMLPTDIIITDTIQNNVALVIEKILNVSREKYNFENMKRLKTSFPLS ... (209)...

```

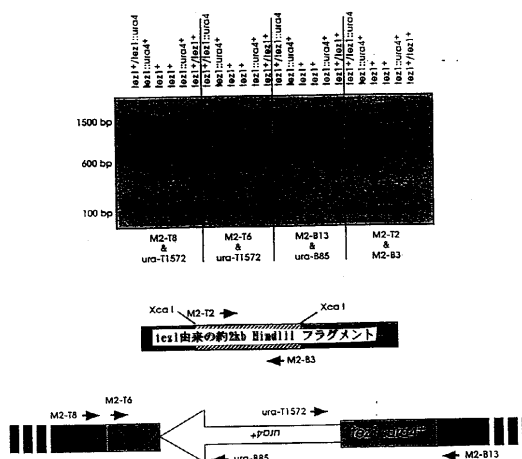
【 図 8 8 】

推定のテロメラーゼ遺伝子に7つの破壊ストラテジー



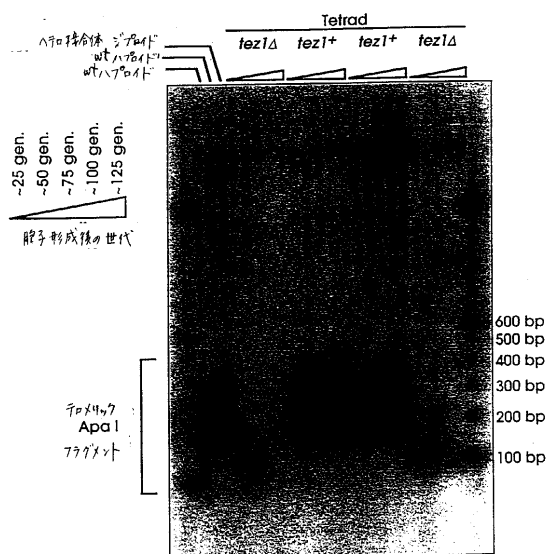
【 図 8 9 】

PCR: 53 tez | 破壞, 確認, 例



【 図 9 0 】

Tez1の破壊により S. Pombeにおけるテロメアの進行性短縮化が生じる



【 図 9 1 】

												1																		
GCCAAGTTCCTGCAGTGGCTG												met ser val tyr val val glu leu leu ATG AGT GTG TAC GTC GTC GAG CTG CTC																		
10												20																		
agg	ser	phe	phe	tyr	val	thr	glu	thr	thr	phe	gln	lys	asn	arg	agg	ser	phe	phe	tyr	val	thr	glu	thr	thr	phe	gln	lys	asn	arg	
AGG	TCT	TTC	TTT	TAT	GTC	ACG	GAG	ACC	ACG	TTT	CAA	AAG	AAC	AGG	AGG	TCT	TTC	TTT	TAT	GTC	ACG	GAG	ACC	ACG	TTT	CAA	AAG	AAC	AGG	
30												40																		
leu	phe	phe	tyr	arg	lys	ser	val	trp	ser	lys	leu	gln	ser	ile	gln	ile	arg	gln	his	leu	lys	arg	val	gln	leu	arg	glu	leu	ser	
CTC	TTT	TTC	TAC	CGG	AAG	AGT	GTC	TGG	AGC	AAG	TTG	CAA	AGC	ATT	GGA	ATC	AGA	CAG	CAC	TTG	AAG	AGG	GTG	CAG	CTG	CGG	GAG	CTG	TGG	
50												60																		
glu	ala	glu	val	arg	gln	his	arg	glu	ala	arg	pro	ala	leu	leu	gln	ala	glu	val	arg	gln	his	arg	glu	ala	arg	pro	ala	leu	leu	
GAA	GCA	GAG	GTC	AGG	CAG	CAT	CGG	GAA	GCC	AGG	CCC	GCC	CTG	CTG	GAA	GCA	GAG	GTC	AGG	CAG	CAT	CGG	GAA	GCC	AGG	CCC	GCC	CTG	CTG	
70												80																		
thr	ser	arg	leu	arg	phe	ile	pro	lys	pro	asp	gly	leu	arg	pro	thr	ser	arg	leu	arg	phe	ile	pro	lys	pro	asp	gly	leu	arg	pro	
AGC	TCC	AGA	CTC	CGC	TTC	ATC	CCC	AAG	CCT	GAC	GGG	CTG	CGG	CCG	AGC	TCC	AGA	CTC	CGC	TTC	ATC	CCC	AAG	CCT	GAC	GGG	CTG	CGG	CCG	
90												100																		
ile	val	asn	met	asp	tyr	val	val	gly	ala	arg	thr	phe	arg	arg	gln	lys	ala	glu	arg	leu	thr	ser	arg	val	lys	ala	leu	phe		
ATT	GTG	ACA	ATG	GAC	TAC	GTC	GTG	GGA	GCC	AGA	ACG	TTC	CGC	AGA	GAA	AAG	ARG	GCC	GAG	CGT	CTC	ACC	TCG	AGG	GTG	AAG	GCA	CTG	TTC	
110												120																		
ser	val	leu	asn	tyr	glu	arg	ala	arg	arg	pro	gly	leu	leu	gly	ser	val	leu	asn	tyr	glu	arg	ala	arg	arg	pro	gly	leu	leu	gly	
AGC	GTG	CTC	AAC	TAC	GAG	CGG	GCG	CGG	CGC	CCC	GGC	CTC	CTG	GGC	AGC	GTG	CTC	AAC	TAC	GAG	CGG	GCG	CGG	CGC	CCC	GGC	CTC	CTG	GGC	
130												140																		
ala	ser	val	leu	gly	leu	asp	asp	ile	his	arg	ala	trp	arg	thr	ala	ser	val	leu	gly	leu	asp	asp	ile	his	arg	ala	trp	arg	thr	
AGC	TCT	GTG	CTG	GGC	CTG	GAC	GAT	ATC	CAC	AGG	GCC	TGG	CGC	ACC	ALA	SER	VAL	LEU	GLY	LEU	ASP	ASP	ILE	HIS	ARG	ALA	TRP	ARG	THR	
150												160																		
phe	val	leu	arg	val	arg	ala	gln	asp	pro	pro	pro	glu	leu	tyr	phe	val	lys	val	asp	val	thr	gln	gly	ala	tyr	asp	thr	ile	pro	gln
TTC	GTG	CTG	CGT	GTG	CGG	GCC	CAG	GAC	CCG	CCG	CCT	GAG	CTG	TAC	TTT	GTC	AAG	GTG	GAT	GTC	ACG	GGC	GCG	TAC	GAC	ATC	ATC	CCC	CAG	AAC
170												180																		
asp	arg	leu	thr	glu	val	ile	ala	ser	ile	ile	lys	pro	gln	asn	asp	arg	leu	thr	glu	val	ile	ala	ser	ile	ile	lys	pro	gln	asn	
GAC	AGG	CTC	ACG	GAG	GTC	ATC	GCC	AGC	ATC	ATC	AAA	CCC	CAG	AAC	GAC	AGG	CTC	ACG	GAG	GTC	ATC	GCC	AGC	ATC	ATC	AAA	CCC	CAG	AAC	

【 図 9 2 】

(續)

190	thr	tyr	cys	val	arg	arg	tyr	ala	val	val	200	gln	lys	ala	ala	met
ACG	TAC	TGC	TGC	CGT	CGG	TAT	GCC	GTG	GTC	GAG	CAA	AAG	GCC	GCC	ATG	
210																
gly	thr	ser	ala	arg	pro	ser	arg	ala	thr	ser	tyr	val	gln	cys		
GGC	ACG	TCC	GCA	AGG	CCT	TCA	AGA	GCC	ACG	TCC	TAC	GTC	CAG	TGC		
220																
gln	gly	ile	pro	gln	gly	ser	ile	leu	ser	230	thr	leu	leu	cys	ser	
CAG	GGG	ATC	CCG	CAG	GGC	TCC	ATC	CTC	TCC	ACG	CTG	CTC	TGC	AGC		
240																
leu	cys	tyr	gly	asp	met	glu	asn	lys	leu	phe	ala	gly	ile	arg		
CTG	TGC	TAC	GGC	GAC	ATG	GAG	AAC	AAG	CTG	TTT	CGC	GGG	ATT	CGG		
250																
arg	asp	gly	leu	leu	leu	arg	leu	val	asp	asp	phe	leu	leu	val		
CGG	GAC	GGG	CTG	CTC	CTG	CGT	TTG	GTG	GAT	GAT	TTC	TTG	TTG	GTG		
270																
thr	pro	his	leu	thr	his	ala	lys	thr	phe	leu	arg	thr	leu	val		
ACA	CCT	CAC	CTC	ACC	CAC	GGG	AAA	ACC	TTT	CTC	AGG	ACC	CTG	GTC		
280																
arg	gly	val	pro	glu	tyr	gly	cys	val	val	asn	leu	arg	lys	thr		
CGA	GGT	GTC	CCT	GAT	TAT	GCG	TGC	GTG	GTG	AAC	TTG	CTG	AGG	ACA		
300																
val	val	asn	phe	pro	val	glu	asp	glu	ala	leu	gly	gly	thr	ala		
GTG	GTG	AAC	TTT	CCT	GTA	GAA	GAC	GAG	GCC	CTG	GGT	GSC	ACG	GCT		
320																
310	phe	val	gln	met	pro	ala	his	gly	leu	phe	pro	trp	cys	gly	leu	
TTT	GTT	CAG	ATG	CCG	GCC	CAC	GGC	CTA	TTT	CCC	TGG	TGG	GGC	GTC		
330																
leu	leu	asp	thr	arg	thr	leu	glu	val	gln	ser	asp	tyr	ser	ser		
CTG	CTG	GAT	ACC	CGG	ACC	CTG	GAG	GTG	CAG	AGC	GAC	TAC	TCC	AGC		
340																
tyr	ala	arg	thr	ser	ile	arg	ala	ser	leu	thr	phe	asn	arg	gly		
TAT	GCC	CGG	ACC	TCC	ATC	AGA	GCC	AGT	CTC	ACC	TTT	AAC	CGC	GGC		
360																
phe	lys	ala	gly	arg	asn	met	arg	arg	lys	leu	phe	gly	val	leu		
TTC	AAG	GCT	GGG	AGG	AAC	ATG	CGT	CGC	AAA	CTC	TTT	GGG	GTC	TTG		
370																
arg	leu	lys	cys	his	ser	leu	phe	leu	asp	leu	gln	val	asn	arg		
CCG	CTG	AGG	TGT	CAC	AGC	CTG	TTT	CTG	GAT	TTG	CAG	GTG	AAC	AGC		
380																

【 図 9 4 】

(續)

AGGTCGTCGCGTTCGGTCCACCCAGGGCCAGCTTTTCTCACCAGGAGCCCGGCTTCCACT
CCCCACATAGGAATAGTCCATCCCAGATTGCGCATTTGTACCCCTTCGCCCTGCCTTCG
TTTGCCTTCAACCCCCACCAATTCAAGTGGAGACCTTGAGAAGGACCTTGGGAGCTTTGGG
AATTGGAGTGACCAAAAGGTGTGCCCTGTACACAGGCGGAGACCTTCACCTGGATGGG
GTTCCTGTGGGTCCAAATTTGGGGGAGGTTGCTGGGAGTAAATACTGAATATATGAGTT
TTCCAGTTTGGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

【 図 9 3 】

(續四)

390
 leu gln thr val cys thr asn ile tyr lys ile leu leu leu gln
 CTC CAG ACG GTG TGC ACC AAC ATC TAC AAG ATC CTC CTG CTG CAG
 400
 ala tyr arg phe his ala cys val leu gln leu pro phe his gln
 GCG TAC AGG TTT CAC GCA TGT GTG CTG CAG CTC CCA TTT CAT CAG
 420
 gln val trp lys asn pro his phe ser cys ala ser ser leu thr
 CAA GTT TGG AAG AAC CCA CAT TTT TCC TGC GCG TCA TCT CTG ACA
 430
 arg leu pro leu leu leu his pro glu ser gln glu arg arg asp
 CGG CTC CCT CTG CTA CTC CAT CCT GAA AGC CAA GAA CGC AGG GAT
 450
 val ala gly gly gln gly arg arg arg pro ser ala leu arg gly
 GTC GCT GGG GGC CAA GGG CGC CGC CGG CCC TCT GCC CTC CGA GGC
 470
 arg ala val ala val pro pro ser ile pro ala gln ala asp ser
 CGT GCA GTG GCT GTG CCA CCA AGC ATT CCT GCT CAA GCT GAC TCG
 480
 thr pro cys his leu arg ala thr act pro gly val thr act asp ser
 ACA CCG TGT CAC CTA CGT GCC ACT CCT GGG GTC ACT CAG GAC AGC
 500
 pro asp ala ala glu ser glu ala pro gly asp asp ala asp cys
 CCA GAC GCA GCT GAG TCG GAA GCT CCC GGG GAC GAC GCT GAC TGC
 510
 pro gly gly arg ser gln pro gly thr ala leu arg leu gln asp
 CCT GGA GGC CGC AGC CAA CCC GGC ACT GCC CTC AGA CTT CAA GAC
 530
 his pro gly leu met ala thr arg pro gln pro gly arg glu gln
 CAT CCT GGA CTG ATG GCC ACC CGC CCA CAG CCA GGC CGA GAG CAG
 540
 thr pro ala ala leu ser ser arg arg ala tyr thr ser gln gly gly
 ACA CCA GCA GCC CTG TCA CGC CGG GCT TAT ACG TCC CAG GGA GGG
 560
 arg gly gly pro his pro gly leu his arg trp glu ser glu ala
 AGG GGC GGC CCA CAC CCA GGC CTG CAC CGC TGG GAG TCT GAG GCC
 564
 OP
 TGA GTGAGTGTTTGGCCGAGGCGCTCGATGTCCGGCTGAAGGCTGAGTGTCCGGCTGAGGC
 CTGACGCGAGTGTCCAGCCAGGGGCTGAGTGTCCAGCACACCTGCGTTTCACTTCCCCAC

【 図 9 5 】

```

たて 7. 1
Ep p123      ...LVVSLIRCFYFYTEQQKSYSKT...
Sp Tez1      ...FIIPILQSFYITESSDLNRRT...
Sc Est2      ...LIPKIJITFYCYTEISSVTIV...
Hs TCP1      ...VYVLELRSFFYVTEITTFQKNRL...
コンヤナ     FFY TE

                K R
たて 7. 0
Ep p123      ...phhh K hR h R
Sp Tez1      ...KSLGFAPGKLRILIPKKT--TFRPIMTFNKKIV...
Sc Est2      ...QKTTLPAPVIRLLPKKN--TFRILTNRKRFL...
Hs TCP1      ...TLSNFNHFSKMRIPKKSNNFEIRHAIPCRGAD...
コンヤナ     ...ARPALLTSRLRFIPKPD--GLRPIVNMDDVYVG...
                R PK RI

                h AF
たて 7. A
Ep p123      ...h hDh GY h
Sp Tez1      ...PKLFFATMDIEKCYDSVNRKLSSTFLK...
Sc Est2      ...RKCYFVRIDIKSCYDRIQDLMFRIVK...
Hs TCP1      ...PELYFMKFDVKSCYDSIPRMECMRILK...
コンヤナ     ...F YFVXVDVTGAYDITPQDRLETVIA...//...
                F D YD

                h PQG S Shh
たて 7. B
Ep p123      ...NGKFYQYKTKGIPQGLCVSSILSSFFYYA...
Sp Tez1      ...GNSQYLQKVGIQPGSSILSSFLCFHYME...
Sc Est2      ...EDKCQYREDGLFQGSLSAPIVDLVYD...
Hs TCP1      ...RATSYVQCQGIQPGSILSTLLCSLCYQ...
コンヤナ     ...G QG S

                Y
たて 7. C
Ep p123      ...h FDDhhh
Sp Tez1      ...PNVNLMLRLTDDYLLITTQENN...
Sc Est2      ...KKGSVLLRVVDLDFLITVNKKD...
Hs TCP1      ...SQDTLILKLADDFLIISTDQQQ...
コンヤナ     ...RRDGLLLRLVDDFLITVPHLTH...
                DD L

                Gh h cK
たて 7. D
Ep p123      ...NVSRENGFKFNMKKL...
Sp Tez1      ...LNLRLRGFEKHNFST...
Sc Est2      ...KKLAMGGFGQFYNAK...
Hs TCP1      ...LRLTVRGVPEYGCVV...
コンヤナ     G

```


【 図 1 0 4 】

[illegible]

【 図 1 0 6 】

[illegible]

【 図 1 0 5 】

[illegible]

【 図 1 0 7 】

[illegible]

【 図 1 0 8 】

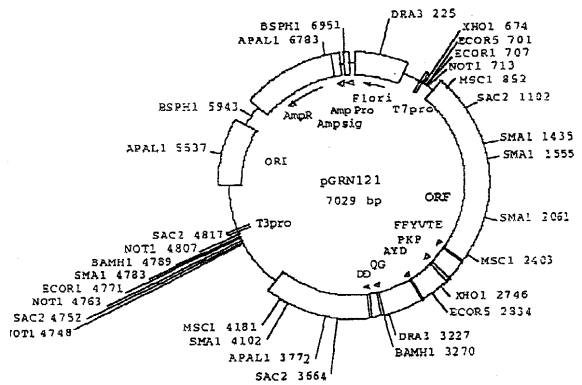
(續)

```

1781      TTCCGATGTTGTAACGCTTCCGCTTGGCTTTTTCCTGTCACCCGCAACGACGAGT
A      -
C      -
G      -
3840
1782      AAGCTTCACTACAGTGTGGAGCGGAGCGCAAGCAACGAAAGTGTGGGTTGTTAGTTCGAC
A      -
C      -
G      -
3840
1783      GAGAGCTTGCAGAAAGACCTTGGAGCTTGGGAATTTGATATATGTAAGCTGTTCCTGCTG
A      -
C      -
G      -
3840
1784      CTCCTGACTCTTCTCGTGGAGCTGACGAGGCTTGAAGCTACACTGCTTTTCAGAGGAGGAC
A      -
C      -
G      -
3840
1785      ETLERSTLGLALGTWSDQRCL
A      -
C      -
G      -
3840
1786      TACACAGGAGGAGGAGGCTGACTGATGAGGAGTCCCTCTGCTGCTGAATTGGGAGAGAT
A      -
C      -
G      -
3840
1787      ATGTGTCGCTGCTGAGGAGCGAGGCTACCCGACAGGACAGGCTAGTTTAACTGCTGCA
A      -
C      -
G      -
3840
1788      VTGREDPARGMGSLHWKLGQC
A      -
C      -
G      -
3840
1789      GCTGTGGAGTTAAATCTGAATATATGATTTTTCGATTTTAAAAAAGAAAAA
A      -
C      -
G      -
3840
1790      GCAGACGCTGATTTATGCTATATATCTGAAGCTCAAAATTTTTTTTTTTTTTTT
A      -
C      -
G      -
3840
1791      AVGVQVKYIYEFSPSEKKKKK
A      -
C      -
G      -
3840
1792      LWEHTEYHSFSLVKKKKKK
A      -
C      -
G      -
3840
1793      GRSKILNIYVQPKKKKKK
A      -
C      -
G      -
3840
1794      AAAAAA
A      -
C      -
G      -
3840
1795      TTTTTTT
A      -
C      -
G      -
3840
1796      KKKK
A      -
C      -
G      -
3840
1797      KK
A      -
C      -
G      -
3840
1798      KK
A      -
C      -
G      -
3840

```

【 図 1 0 9 】



【 図 1 1 0 】

1

met

GCAGCGCTGCGTCTCTGCTGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCCACCCCGCG ATG

10
pro arg ala pro arg cys arg ala val arg ser leu leu arg ser
CCG CGC GCT CCC CGC TGC CGA GCC GTG CGC TCC CTG CTG CGC AGC

20
his tyr arg glu val leu pro leu ala thr phe val arg arg leu
CAC TAC CGC GAG GTG CTG CCG CTG GCC ACC TTC GTG CGG CGC CTG

30
gly pro gln gly trp arg leu val gln arg gly asp pro ala ala
GGG CCC CAG GGC TGG CGG CTG GTG CAG CGC GGG GAC CCG GCG GCT

40
phe arg ala leu val ala gln cys leu val cys val pro trp asp
TTC CGC GCG CTG GTG GCC CAG TGC CTG GTG TGC GTG CCC TGG GAC

50
ala arg pro pro ala ala pro ser phe arg gln val ser cys
GCA CGG CCG CCC CCC GCC GCC CCC TCC TTC CGC CAG GTG TCC TGC

60
leu lys glu leu val ala arg val leu gln arg leu cys glu arg
CTG AAG GAG CTG GTG GCC CGA GTG CTG CAG AGG CTG TGC GCG GCG

70
gly ala lys asn val leu ala phe gly phe ala leu leu asp gly
GGC GCG AAG AAC GTG CTG GCC TTC GGC TTC GCG CTG CTG GAC GGG

80
ala arg gly gly pro pro glu ala phe thr thr ser val arg ser
GCC CGC GGG GGC CCC CCC GAG GCC TTC ACC ACC AGC GTG CGC AGC

90
tyr leu pro asn thr val thr asp ala leu arg gly ser gly ala
TAC CTG CCC AAC ACG GTG ACC GAC GCA CTG CCG GGG AGC GGG GCG

100
120
130

【 図 1 1 1 】

(44)

140												150		
trp	gly	leu	leu	leu	arg	arg	val	gly	asp	asp	val	leu	val	his
TGG	GGG	CTG	CTG	CTG	CGC	CCG	CTG	GGC	GAC	GAC	GTG	CTG	GTT	CAC
160														
leu	leu	ala	arg	cys	ala	leu	phe	val	leu	val	ala	pro	ser	cys
CTG	CTG	GCA	CGC	TGC	GCG	CTC	TTT	GTG	CTG	GTG	GCT	CCC	AGC	TGC
170														
ala	tyr	gln	val	cys	gly	pro	pro	leu	tyr	gln	leu	gly	ala	ala
GCC	TAC	CAG	GTG	TGC	GGG	CCG	CCG	CTG	TAC	CAG	CTC	GGC	GCT	GCC
180														
thr	gln	ala	arg	pro	pro	pro	his	ala	ser	gly	pro	arg	arg	arg
ACT	CAG	GCC	CGG	CCC	CCG	CCA	CAC	GCT	AGT	GGA	CCC	CGA	AGG	CGT
190														
leu	gly	cys	glu	arg	ala	trp	asn	his	ser	val	arg	glu	ala	gly
CTG	GGA	TGC	GAA	CGG	GCC	TGG	AAC	CAT	AGC	GTC	AGG	GAG	GCC	GGG
200														
val	pro	leu	gly	leu	pro	ala	pro	gly	ala	arg	arg	arg	gly	gly
GTC	CCC	CTG	GGC	CTG	CCA	GCC	CCG	GGT	GCG	AGG	AGG	CGC	GGG	GGC
210														
ser	ala	ser	arg	ser	leu	pro	leu	pro	lys	arg	pro	arg	arg	gly
AGT	GCC	AGC	CGA	AGT	CTG	CCG	TTG	CCC	AAG	AGG	CCC	AGG	CGT	GGC
220														
ala	ala	pro	glu	pro	glu	arg	thr	pro	val	gly	gln	gly	ser	trp
GCT	GCC	CCT	GAG	CCG	GAG	CGG	ACG	CCC	GTT	GGG	CAG	GGG	TCC	TGG
230														
ala	his	pro	gly	arg	thr	arg	gly	pro	ser	asp	arg	gly	phe	cys
GCC	CAC	CCG	GGC	AGG	ACG	CGT	GGA	CCG	AGT	GAC	CGT	GGT	TTC	TGT
240														
val	val	ser	pro	ala	arg	pro	ala	gly	glu	ala	thr	ser	leu	glu
GTG	GTG	TCA	CCT	GCC	AGA	CCC	GCC	GAA	GAA	GCC	ACC	TCT	TTG	GAG
250														
260														
270														
280														

【図 1 1 2】

(続)

290 300
 gly ala leu ser gly thr arg his ser his pro ser val gly arg
 GGT GCG CTC TCT GGC ACG CGC CAC TCC CAC CCA TCC GTG GGC CGC

310
 gln his his ala gly pro pro ser thr ser arg pro pro arg pro
 CAG CAC CAC GCG GGC CCC CCA TCC ACA TCG CGG CCA CCA CGT CCC

320 330
 trp asp thr pro cys pro pro val tyr ala glu thr lys his phe
 TGG GAC ACG CCT TGT CCC CCG GTG TAC GCC GAG ACC AAG CAC TTC

340
 leu tyr ser ser gly asp lys glu gln leu arg pro ser phe leu
 CTC TAC TCC TCA GGC GAC AAG GAG CAG CTG CGG CCC TCC TTC CTA

350 360
 leu ser ser leu arg pro ser leu thr gly ala arg arg leu val
 CTC AGC TCT CTG AGG CCC AGC CTG ACT GGC GCT CGG AGG CTC GTG

370
 glu thr ile phe leu gly ser arg pro trp met pro gly thr pro
 GAG ACC ATC TTT CTG GGT TCC AGG CCC TGG ATG CCA GGG ACT CCC

380 390
 arg arg leu pro arg leu pro gln arg tyr trp gln met arg pro
 CGC AGG TTG CCC CGC CTG CCC CAG CGC TAC TGG CAA ATG CGG CCC

400
 leu phe leu glu leu leu gly asn his ala gln cys pro tyr gly
 CTG TTT CTG GAG CTG CTT GGG AAC CAC CGC CAG TGC CCC TAC GGG

410 420
 val leu leu lys thr his cys pro leu arg ala ala val thr pro
 GTG CTC CTC AAG ACG CAC TGC CCG CTG CGA GCT GCG GTC ACC CCA

430
 ala ala gly val cys ala arg glu lys pro gln gly ser val ala
 GCA GCC GGT GTC TGT GCC CGG GAG AAG CCC CAG GGC TCT GTG GCG

【図 1 1 3】

(続)

440 450
 ala pro glu glu glu asp thr asp pro arg arg leu val gln leu
 GCC CCC GAG GAG GAG ACA GAC CCC CGT CGC CTG GTG CAG CTG

460
 leu arg gln his ser ser pro trp gln val tyr gly phe val arg
 CTC CGC CAG CAC AGC AGC CCC TGG CAG GTG TAC GGC TTC GTG CGG

470 480
 ala cys leu arg arg leu val pro pro gly leu trp gly ser arg
 GCC TGC CTG CGC CGG CTG GTG CCC CCA GGC CTC TGG GGC TCC AGG

490
 his asn glu arg arg phe leu arg asn thr lys lys phe ile ser
 CAC AAC GAA CGC CGC TTC CTC AGG AAC ACC AAG AAG TTC ATC TCC

500 510
 leu gly lys his ala lys leu ser leu gln glu leu thr trp lys
 CTG GGG AAG CAT GCC AAG CTC TCG CTG CAG GAG CTG ACC TGG AAG

520
 met ser val arg asp cys ala trp leu arg arg ser pro gly val
 ATG AGC GTG CGG GAC TGC GCT TGG CTG CGC AGG AGC CCA GGG GTT

530 540
 gly cys val pro ala ala glu his arg leu arg glu glu ile leu
 GGC TGT GTT CCG GCC GCA GAG CAC CGT CTG CGT GAG GAG ATC CTG

550
 ala lys phe leu his trp leu met ser val tyr val val glu leu
 GCC AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG AGT GTG TAC GTC GTC CAG CTG

560 570
 leu arg ser phe phe tyr val thr glu thr thr phe gln lys asn
 CTC AGG TCT TTC TTT TAT GTC ACG GAG ACC ACG TTT CAA AAG AAC

580
 arg leu phe phe tyr arg pro ser val trp ser lys leu gln ser
 AGG CTC TTT TTC TAC CGG CCG AGT GTC TGG AGC AAG TTG CAA AGC

590 600
 ile gly ile arg gln his leu lys arg val gln leu arg glu leu
 ATT GGA ATC AGA CAG CAC TTG AAG AGG GTG CAG CTG CGG GAG CTG

【図 1 1 4】

(続)

610
 ser glu ala glu val arg gln his arg glu ala arg pro ala leu
 TCG GAA GCA GAG GTC AGG CAG CAT CGG GAA GCC AGG CCC GCC CTG

620 630
 leu thr ser arg leu arg phe ile pro lys pro asp gly leu arg
 CTG ACG TCC AGA CTC CGC TTC ATC CCC AAG CCT GAC GGG CTG CGG

640
 pro ile val asn met asp tyr val val gly ala arg thr phe arg
 CCG ATT GTG AAC ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA ACG TTC CCC

650 660
 arg glu lys arg ala glu arg leu thr ser arg val lys ala leu
 AGA GAA AAG AGG GCC GAG CGT CTC ACC TCG AGG GTG AAG GCA CTG

670
 phe ser val leu asn tyr glu arg ala arg arg pro gly leu leu
 TTC AGC GTG CTC AAC TAC GAG CGG GCG CGG CGC CCC GGC CTC CTG

680 690
 gly ala ser val leu gly leu asp asp ile his arg ala trp arg
 GGC GCC TCT GTG CTG GGC CTG GAC GAT ATC CAC AGG GCC TGG CGC

700
 thr phe val leu arg val arg ala gln asp pro pro pro glu leu
 ACC TTC GTG CTG CGT GTG CGG GCC CAG GAC CCG CGC CCT GAG CTG

710 720
 tyr phe val lys val asp val thr gly ala tyr asp thr ile pro
 TAC TTT GTC AAG GTG GAT GTG ACG GGC GCG TAC GAC ACC ATC CCC

730
 gln asp arg leu thr glu val ile ala ser ile ile lys pro gln
 CAG GAC AGG CTC ACG GAG GTC ATC GCC AGC ATC ATC AAA CCC CAG

740 750
 asn thr tyr cys val arg arg tyr ala val val gln lys ala ala
 AAC ACG TAC TGC GTG CGT CGG TAT GCC GTG GTC CAG AAG GCC GCC

760
 his gly his val arg lys ala phe lys ser his val ser thr leu
 CAT GGG CAC GTC CGC AAG GCC TTC AAG AGC CAC GTC TCT ACC TTG

【図 1 1 5】

(続)

770 780
 thr asp leu gln pro tyr met arg gln phe val ala his leu gln
 ACA GAC CTC CAG CCG TAC ATG CGA CAG TTC GTG GCT CAC CTG CAG

790
 glu thr ser pro leu arg asp ala val val ile glu gln ser ser
 GAG ACC AGC CCG CTG AGG GAT GCC GTC GTC ATC GAG CAG AGC TCC

800 810
 ser leu asn glu ala ser ser gly leu phe asp val phe leu arg
 TCC CTG AAT GAG GCC AGC AGT GGC CTC TTC GAC GTC TTC CTA CGC

820
 phe met cys his his ala val arg ile arg gly lys ser tyr val
 TTC ATG TGC CAC CAC GCC GTG CGC ATC AGG GGC AAG TCC TAC GTC

830 840
 gln cys gln gly ile pro gln gly ser ile leu ser thr leu leu
 CAG TGC CAG GGG ATC CCG CAG GGC TCC ATC CTC TCC ACG CTG CTC

850
 cys ser leu cys tyr gly asp met glu asn lys leu phe ala gly
 TGC AGC CTG TGC TAC GGC GAC ATG GAG AAC AAG CTG TTT GCG GGG

860 870
 ile arg arg asp gly leu leu leu arg leu val asp asp phe leu
 ATT CGG CGG GAC GGG CTG CTC CTG CGT TTG GTG GAT GAT TTC TTG

880
 leu val thr pro his leu thr his ala lys thr phe leu arg thr
 TTG GTG ACA CCT CAC CTC ACC CAC GCG AAA ACC TTC CTC AGG ACC

890 900
 leu val arg gly val pro glu tyr gly cys val val asn leu arg
 CTG GTC CGA GGT GTC CCT GAG TAT GGC TGC GTG GTG AAC TTG CGG

910
 lys thr val val asn phe pro val glu asp glu ala leu gly gly
 AAG ACA GTG GTG AAC TTC CCT GTA GAA GAC GAG CCC CTG GGT GGC

920 930
 thr ala phe val gln met pro ala his gly leu phe pro trp cys
 ACG GCT TTT GTT CAG ATG CCG GCC CAC GGC CTA TTC CCC TGG TGC

【図 116】

(株)

940
gly leu leu leu asp thr arg thr leu glu val gln ser asp tyr
GGC CTC CTG CTG GAT ACC CGG ACC CTG GAG GTG CAG AGC GAC TAC

950 960
ser ser tyr ala arg thr ser ile arg ala ser val thr phe asn
TCC AGC TAT GCC CGG ACC TCC ATC AGA GCC AGT GTC ACC TTC AAC

970
arg gly phe lys ala gly arg asn met arg arg lys leu phe gly
CGC GGC TTC AAG GCT GGG AGG AAC ATG CGT CGC AAA CTC TTT GGG

980 990
val leu arg leu lys cys his ser leu phe leu asp leu gln val
GTC TTG CGG CTG AAG TGT CAC AGC CTG TTT CTG GAT TTG CAG GTG

1000
asn ser leu gln thr val cys thr asn ile tyr lys ile leu leu
AAC AGC CTC CAG ACG GTG TGC ACC AAC ATC TAC AAG ATC CTC CTG

1010 1020
leu gln ala tyr arg phe his ala cys val leu gln leu pro phe
CTG CAG GCG TAC AGG TTT CAC GCA TGT GTG CTG CAG CTC CCA TTT

1030
his gln gln val trp lys asn pro thr phe phe leu arg val ile
CAT CAG CAA GTT TGG AAG AAC CCC ACA TTT TTC CTG CGC GTC ATC

1040 1050
ser asp thr ala ser leu cys tyr ser ile leu lys ala lys asn
TCT GAC ACG GCC TCC CTC TGC TAC TCC ATC CTG AAA GCC AAG AAC

1060
ala gly met ser leu gly ala lys gly ala ala gly pro leu pro
GCA GGC ATG TCG CTG GGG GCC AAG GGC GCC GCC GGC CCT CTG CCC

1070 1080
ser glu ala val gln trp leu cys his gln ala phe leu leu lys
TCC GAG GCC GTG CAG TGG CTG TGC CAC CAA GCA TTC CTG CTC AAG

1090
leu thr arg his arg val thr tyr val pro leu leu gly ser leu
CTG ACT CGA CAC CGT CTC ACC TAC GTG CCA CTC CTG GGG TCA CTC

【図 117】

(株)

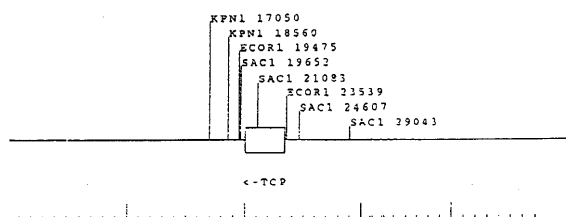
1100 1110
arg thr ala gln thr gln leu ser arg lys leu pro gly thr thr
AGG ACA GCC CAG ACG CAG CTG AGT CGG AAG CTC CCG GGG ACG ACG

1120
leu thr ala leu glu ala ala ala asn pro ala leu pro ser asp
CTG ACT GCC CTG GAG GCC GCA GCC AAC CCG GCA CTG CCC TCA GAC

1130 1132
phe lys thr ile leu asp OP
TTC AAG ACC ATC CTG GAC TGA TGGCCACCCGCCACAGCCAGGCCGAGAGCAGA

CACCAGCAGCCCTGTACGCCGGCTCTACGTCCCAGGGAGGGAGGGCGGCCACACCC
AGGCCCGCACCGCTGGGAGTCTGAGGCCTGAGTGAGTGTGTTGGCCGAGGCCTGCATGTCC
GGCTGAGGCTGAGTGTCCGGCTGAGGCCTGAGCGAGTGTCCAGCCAAAGGCTGAGTGTG
CAGCACACCTGCCCTCTTCTCTCCACAGGCTGGCGCTCGGCTCCACCCAGGGCCAG
CTTTTCCTCACCAGGAGCCGGCTTCCACTCCCCACATAGGAATAGTCCATCCCCAGATT
CGCCATTGTTACCCCTCGCCCTGCCCTCTTTCCTTCCACCCCAACCATCCAGGTGA
GACCCCTGAGAAGGACCCCTGGGAGCTCTGGGAATTTGGAGTGACCAAGAGGTGCCCCGTA
CACAGGCGAGGACCCCTGCACCTGGATGGGGTCCCTGTGGTCAATTTGGGGGAGGTGC
TGTGGGACTAAAATACCTGAATATATGAGTTTTTCAGTTTTTGRAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAA

【図 118】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N 9/12
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N 33/48 M
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50 T

- (31)優先権主張番号 08/851,843
 (32)優先日 平成9年5月6日(1997.5.6)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/854,050
 (32)優先日 平成9年5月9日(1997.5.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/911,312
 (32)優先日 平成9年8月14日(1997.8.14)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/912,951
 (32)優先日 平成9年8月14日(1997.8.14)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/915,503
 (32)優先日 平成9年8月14日(1997.8.14)
 (33)優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

- (72)発明者 トーマス アール. セチ
 アメリカ合衆国 コロラド 80303, ボールダー, ロックモント サークル 1545
 (72)発明者 ジョーチュム リングナー
 アメリカ合衆国 コロラド 80303, ボールダー, 30ティーエイチ ストリート 360
 (72)発明者 ナカムラ トオル
 アメリカ合衆国 コロラド 80303, ボールダー, ナンバー204, サンダーバード
 サークル 4940
 (72)発明者 カレン ビー. チャップマン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94965, サウスリート, クラウド ビュー ロード
 71
 (72)発明者 グレッグ ビー. モリン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303, パロ アルト, ジャニス ウェイ 3407
 (72)発明者 カルビン ビー. ハーレイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94301, パロ アルト, ユニバーシティ アベニュー
 1730
 (72)発明者 ウィリアム エイチ. アンドリューズ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94805, リッチモンド, パーク アベニュー 610
 2

審判長 鵜飼 健
審判官 長井 啓子
審判官 富永 みどり

(56)参考文献 Proc.Natl.Acad.Sci.USA., vol.93, p.10712-10717 (1996)
Science, vol.269, p.1236-1241 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

BIOSIS, WPI, JICST, GenBank/DDBJ/EMBL/Genes
eq