

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-506994

(P2006-506994A)

(43) 公表日 平成18年3月2日(2006.3.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12 Z N A	4 B O 5 O
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-554468 (P2004-554468)	(71) 出願人	502407336
(86) (22) 出願日	平成15年11月25日 (2003.11.25)		ノバルティス・フォルシュングスシュティ
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月7日 (2005.7.7)		フトゥング・ツヴァイクニーダーラッスン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/013251		グ・フリードリッヒ・ミーシェー・インス
(87) 国際公開番号	W02004/048576		ティトゥート・フォー・バイオメディカル
(87) 国際公開日	平成16年6月10日 (2004.6.10)		・リサーチ
(31) 優先権主張番号	0227562.6		Novartis Forschungs
(32) 優先日	平成14年11月26日 (2002.11.26)		stiftung Zweigniede
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		rlassung Friedrich
			Miescher Institute
			for Biomedical Rese
			arch
			スイス、ツェーハー4058バーゼル、
			マウルペーアシュトラッセ66番
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 リン酸化NDRキナーゼ

(57) 【要約】

本発明は、細胞核Dbf2関連キナーゼ(Ndr)として呼称される細胞核セリン／スレオニンタンパク質キナーゼのリン酸化された形態に関し、そしてそのモジュレーターを同定する分析法および材料を提供する。本発明は、分子生物学、化学、薬理学、およびスクリーニング技術の分野に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1 のアミノ酸配列に規定される細胞核 D b f 2 関連 (N d r) ホスホキナーゼであるポリペプチド、その機能的相同体または少なくとも 5 つの連続したアミノ酸を含むそのフラグメントであり、かつ、該ポリペプチド、機能的相同体またはフラグメントが、N d r タンパク質キナーゼ 1 のアミノ酸 T h r - 7 4 またはアミノ酸 T h r - 7 4 に対応するアミノ酸にてリン酸化されているか、または該アミノ酸が、酸性アミノ酸残基で置換されているペプチドである、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

該ポリペプチドがさらに、S e r - 2 8 1 および／または T h r - 4 4 4 におけるリン酸化を包含する、請求項 1 記載のポリペプチド。 10

【請求項 3】

該相同体が、配列番号：1 に規定されるアミノ酸配列と 5 0 % 以上の同一性を有する配列を包含する、請求項 1 記載の機能的相同体。

【請求項 4】

該相同体が、配列：K - E - S / T - E - F / Y で定義される少なくとも 1 つのペプチドを包含する、請求項 1 記載の機能的相同体。

【請求項 5】

該ポリペプチドが N d r 1 である、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 6】

該ポリペプチドが N d r 2 (配列番号：3) であって、アミノ酸 T h r - 7 4 に対応する該アミノ酸が配列番号：3 の T h r - 7 5 である、請求項 1 記載のポリペプチド。 20

【請求項 7】

請求項 1 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体であって、該ポリペプチドが N d r タンパク質キナーゼ 1 (配列番号：1) のアミノ酸 T h r - 7 4 もしくはアミノ酸 T h r - 7 4 に対応するアミノ酸にてリン酸化されており、そして該抗体が該リン酸化されたアミノ酸を含むエピトープを認識する、抗体。

【請求項 8】

該抗体がモノクローナルである、請求項 7 記載の抗体。

【請求項 9】

細胞核 D b f 2 関連 (N d r) キナーゼ (配列番号：1)、その機能的相同体またはそのフラグメントからなる群から選択されるポリペプチドを単離する方法であって、該ポリペプチドが N d r タンパク質キナーゼ 1 の T h r - 7 4 またはアミノ酸 T h r - 7 4 に対応するアミノ酸にてリン酸化されており、かつ、該ポリペプチドと請求項 7 または 8 記載の抗体を接触させ、そして混入物質を除去することを含む方法。 30

【請求項 10】

該ポリペプチドをエンコードする核酸とオカダ酸を含む細胞を処理し、該細胞が該ポリペプチドを発現することを可能とし、そして該細胞から細胞抽出物を調製することをさらに含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

該ポリペプチドを検出または単離するための、請求項 7 または 8 記載の抗体の使用。 40

【請求項 12】

N d r キナーゼ活性のアゴニストまたはアンタゴニストの同定を目的とした、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの使用。

【請求項 13】

医薬としての使用を目的とした、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド。

【請求項 14】

細胞増殖における異常の処置のための医薬の製造を目的とした、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの使用。

【請求項 15】

請求項 1～6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと一緒に M O B 1 を含む複合体。

【請求項 1 6】

前記タンパク質がヒトタンパク質である、請求項 1 5 記載の複合体。

【請求項 1 7】

1 つ以上のタンパク質が標識されている、請求項 1 5 または 1 6 記載の複合体。

【請求項 1 8】

1 つ以上のタンパク質が蛍光標識されている、請求項 1 7 記載の複合体。

【請求項 1 9】

N d r キナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングするための方法であって、

10

a) 請求項 1～6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと一緒に前記可能性のあるモジュレーターをインキュベートする工程；および

b) モジュレーターとポリペプチド間の相互作用を検出する工程を含む方法。

【請求項 2 0】

N d r キナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングするための方法であって、

a) 請求項 1～6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと一緒に前記可能性のあるモジュレーターをインキュベートする工程；および

b) N d r タンパク質キナーゼ 1 の T h r - 7 4 またはアミノ酸 T h r - 7 4 に対応するアミノ酸での該ポリペプチドのリン酸化における変化を検出する工程を含む方法。

20

【請求項 2 1】

該可能性のあるモジュレーターがシグナル伝達経路のキナーゼである、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

N d r キナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングするための方法であって、

a) 請求項 1 5～1 8 のいずれか 1 項記載の複合体と一緒に前記可能性のあるモジュレーターをインキュベートする工程；および、

30

b) M O B 1 とポリペプチド間の結合の変化を検出する工程を含む方法。

【請求項 2 3】

該結合が減少して M O B 1 が放出される、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

該結合が、好ましくは、M O B 1 フラグメントまたは誘導体に対して増加するか、または安定化する、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 5】

請求項 1～6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドおよび取扱説明書を含むキット。

【請求項 2 6】

40

M O B 1 をさらに含む請求項 2 5 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、細胞核セリン／スレオニン タンパク質キナーゼ（細胞核 D b f 2 関連キナーゼ（nuclear Dbf2-related kinase (Ndr)) と呼称される）のリン酸化形態に関し、そして N d r キナーゼ活性のモジュレーターを同定するための分析および材料を提供する。本発明は、分子生物学、化学、薬理学およびスクリーニング技術の分野に関する。

【0 0 0 2】

50

可逆的タンパク質リン酸化は、代謝、増殖および分化を含む、真核生物における多くの基本的な細胞機能の協調的制御のための主要な作用機序である。特定の標的タンパク質のリン酸化状態およびその結果としての活性は、タンパク質キナーゼおよびタンパク質ホスファターゼの拮抗する作用により制御される。一般的に、いくつかの二重特異性 (dual specificity) のキナーゼおよびホスファターゼが、既に記載されているが、これらの酵素は、セリン/スレオニン ホスホアクセプター (phosphoacceptor) か、またはチロシン ホスホアクセプターのどちらかに特異的である。多くのキナーゼ、ホスファターゼの発見、およびそれらが関与するシグナル伝達経路が進化の過程で高度に保存されていることの発見により、リン酸化カスケードの重要性が示されている。近年、細胞周期の制御におけるタンパク質リン酸化の役割に興味が集まっている；多くの細胞性プロトオンコジーンがセリン/スレオニン キナーゼ ファミリーのメンバーをエンコードしており、そして細胞周期制御ネットワークの主要な構成成分として機能するいくつかのセリン/スレオニン キナーゼが次第に明らかとなった。故に、これらの経路の完全な描写が、腫瘍形成および腫瘍進行を理解するために重要である。

【0003】

N d r タンパク質キナーゼ (P u n キナーゼとしても周知) は、身体のおほとんどすべての細胞形で発現される細胞核セリン/スレオニン タンパク質キナーゼである (Millward, T. ら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5022-5026)。W O 9 6 / 1 9 5 7 9 には、N d r キナーゼの同定、N d r キナーゼのインビトロ自己リン酸化形態、N d r キナーゼに特異的な抗体、N d r キナーゼの作製および使用のための有用な方法、ならびに N d r キナーゼの他の関連する局面が記載されている。

【0004】

タンパク質キナーゼの N D R ファミリーには、オーソログス (orthologous) なタンパク質、例えばキイロショウジョウバエ由来の Tricornered (trc)、線虫由来の Sax-1、およびいくつかの密接に関連するキナーゼ、例えば哺乳動物、キイロショウジョウバエおよび線虫由来の Wts/Lats キナーゼ、酵母由来の Cbk1、Dbf2、Dbf20、分裂酵母由来の Orb6、担子菌酵母 (U. maydis) 由来の Ukc1、および糸状菌 (N. crassa) 由来の Cot-1 が含まれる (Stegert, M.R. ら (2001) NATO ASI Series: Protein Modules in Cellular Signalling 318, 68-80 に概説)。これらのキナーゼは、その触媒ドメイン内、ならびにその制御ドメイン内の保存領域にて 40-60% のアミノ酸同一性を共有している。前記キナーゼの N d r サブファミリーは、細胞増殖、細胞分裂および細胞形態の調節に関与している。

【0005】

例えば、L A T S (W t s と同呼称) は元来、それを欠損した場合に、ショウジョウバエにおける異常増殖 (overgrowth) 表現型の原因となる遺伝子として発見され、それ故、腫瘍抑制遺伝子であると提案された (Justice, R. W. ら (1995) Genes Dev. 9, 534-546; Xu, T. ら (1995) Development 121, 1053-1063)。近年、哺乳動物の L A T S 相同体がクローニングされ、その腫瘍抑制機能が確認された。マウスにおける L A T S 相同体のホモ接合体欠失は、軟部組織肉腫および卵巣間質細胞腫瘍の発達の原因となる (St. John, M. A. ら (1999) Nat. Genet. 21, 182-186)。

【0006】

N d r キナーゼファミリーの他のメンバーは、細胞分裂に重要であることが実証されている。分裂酵母にて、O r b 6 は、細胞極性の形成に必要とされ、かつ C d c 2 のインヒビターのような作用も示すようである (Verde, F. ら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7526-7531)。O r b 6 と同じく、アカパンカビ由来の C o t - 1 もまた、極性のある細胞増殖に必要とされる (Yarden, O. ら (1992) EMBO J. 11, 2159-2166)。最後に、D b f 2 は、出芽酵母の有糸分裂の終期における C d c 2 8 - サイクリン B キナーゼ活性の下方制御に必要とされる経路の一部を成す (Jaspersen, S. L. ら (1998) Mol. Biol. Cell. 9, 2803-2817)。

【0007】

前記 N d r キナーゼ・サブファミリーは、細胞増殖制御に重要であることが明らかであ

10

20

30

40

50

るが、それぞれのキナーゼがどのように制御されているのかについては知られていない。Ndr キナーゼファミリーのいくつかのメンバーが、リンタンパク質として周知である (Toyn, J. H. および Johnston, L. H. (1994) *EMBO J.* 13, 1103–1113; Tao ら (1999) *Nature Genetics* 21, 177–181)。また、NDR1 は、タンパク質ホスファターゼ 2A (PP2A) インヒビター・オカダ酸 (OA) で細胞を処理することにより強力に活性化され、NDR1 活性の制御におけるセリン残基および／またはスレオニン残基のリン酸化に与ることが示されている。前記活性化は、活性化断片 (T-ループ) の Ser 281 とカルボキシル末端部分に位置する疎水性モチーフの Thr 444 の 2 つの制御残基のリン酸化を伴う (Millward, T.A. ら (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 33847–33850; EP1097989、題名「Ndr phosphokinase」)。NDR1 のインビトロにおける活性化はまた、NDR1 自己リン酸化を増大する、EF ハンド Ca²⁺ 結合タンパク質 S100B との直接的な相互作用を介しても示される (Millward, T.A. ら (1998) *EMBO J.* 17, 5913–5922)。上記にもかかわらず、依然として、さらなる Ndr キナーゼ シグナル伝達の説明および前記経路における成分の同定の必要がある。

10

【0008】

関連文献

1. Millward, T., Cron, P., and Hemmings, B. A. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 5022–5026
2. Tripodis, N., Palmer, S., Phillips, S., Milne, S., Beck, S., and Ragoussis, J. (2000) *Genome Res.* 10, 454–472
3. Stegert, M. R., Bichsel, S. J., and Hemmings, B. A. (2001) *NATO ASI Series : Protein Modules in cellular signalling* 318, 68–80
4. Geng, W., He, B., Wang, M., and Adler, P. N. (2000) *Genetics* 156, 1817–1828
5. Zallen, J. A., Peckol, E. L., Tobin, D. M., and Bargmann, C. I. (2000) *Mol. Biol. Cell* 11, 3177–3190
6. Yarden, O., Plamann, M., Ebbale, D. J., and Yanofsky, C. (1992) *EMBO J.* 11, 2159–2166
7. Racki, W. J., Becam, A. M., Nasr, F., and Herbert, C. J. (2000) *EMBO J.* 19, 4524–4532
8. Durrenberger, F. and Kronstad, J. (1999) *Mol.Gen.Genet.* 261, 281–289
9. Verde, F., Wiley, D. J., and Nurse, P. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 7526–7531
10. Johnston, L. H., Eberly, S. L., Chapman, J. W., Araki, H., and Sugino, A. (1990) *Mol.Cell Biol.* 10, 1358–1366
11. Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988) *Science* 241, 42–52
12. Millward, T. A., Heizmann, C. W., Schaefer, B. W., and Hemmings, B. A. (1998) *EMBO J.* 17, 5913–5922
13. Millward, T. A., Hess, D., and Hemmings, B. A. (1999) *J.Biol.Chem.* 274, 33847–33850
14. Ilg, E. C., Schaefer, B. W., and Heizmann, C. W. (1996) *Int.J.Cancer* 68, 325–332
15. Wilm, M. and Mann, M. (1996) *Anal.Chem.* 68, 1–8
16. Carr, S. A., Huddleston, M. J., and Annan, R. S. (1996) *Anal.Biochem.* 239, 180–192
17. Wilm, M., Neubauer, G., and Mann, M. (1996) *Anal.Chem.* 68, 527–533
18. Newton, A. C. (2001) *Chem.Rev.* 101, 2353–2364
19. Taylor, C. W. and Broad, L. M. (1998) *Trends Pharmacol.Sci.* 19, 370–375
20. Treiman, M., Caspersen, C., and Christensen, S. B. (1998) *Trends Pharmacol.Sci.* 19, 131–135

20

30

40

50

21. Peterson, R. T. and Schreiber, S. L. (1999) *Curr.Biol.* 9, R521–R524
22. Parker, P. J. and Parkinson, S. J. (2001) *Biochem.Soc.Trans.* 29, 860–863
23. Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991) *Science* 253, 407–414
24. Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V. M., Hess, D., Hemmings, B. A., and Barford, D. (2002) *Mol.Cell* 9, 1227–1240
25. Fujisawa, H. (2001) *J.Biochem.(Tokyo)* 129, 193–199
26. Heierhorst, J., Kobe, B., Feil, S. C., Parker, M. W., Benian, G. M., Weiss, K. R., and Kemp, B. E. (1996) *Nature* 380, 636–639
27. Yamasaki, R., Berri, M., Wu, Y., Trombitas, K., McNabb, M., Kellermayer, M. S., Witt, C., Labeit, D., Labeit, S., Greaser, M., and Granzier, H. (2001) *Biophys.J.* 81, 2297–2313
28. Belham, C., Wu, S., and Avruch, J. (1999) *Curr.Biol.* 9, R93–R96
29. Leslie, N. R., Biondi, R. M., and Alessi, D. R. (2001) *Chem.Rev.* 101, 2365–2380
30. Williams, M. R., Arthur, J. S., Balendran, A., van der, K. J., Poli, V., Cohen, P., and Alessi, D. R. (2000) *Curr.Biol.* 10, 439–448
31. Balendran, A., Hare, G. R., Kieloch, A., Williams, M. R., and Alessi, D. R. (2000) *FEBS Lett.* 484, 217–223
32. Yonemoto, W., McGlone, M. L., Grant, B., and Taylor, S. S. (1997) *Protein Eng* 10, 915–925
33. Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., and Parker, P. J. (1998) *Science* 281, 2042–2045
34. Hill, M. M., Andjelkovic, M., Brazil, D. P., Ferrari, S., Fabbro, D., and Hemmings, B. A. (2001) *J.Biol.Chem.* 276, 25643–25646
35. Hill, M., Feng, J., and Hemmings, B. (2002) *Curr.Biol.* 12, 1251
36. Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 11211–11216
37. Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. A. (1996) *EMBO J.* 15, 6541–6551
38. Lynch, D. K., Ellis, C. A., Edwards, P. A., and Hiles, I. D. (1999) *Oncogene* 18, 8024–8032
39. Shaw, M., Cohen, P., and Alessi, D. R. (1998) *Biochem.J.* 336, 241–246
40. Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Le Good, J. A., Whelan, R. D., Kelly, J. J., Frech, M., Hemmings, B. A., and Parker, P. J. (1999) *Curr.Biol.* 9, 522–529
41. Romanelli, A., Martin, K. A., Toker, A., and Blenis, J. (1999) *Mol.Cell Biol.* 19, 2921–2928
42. Akimoto, K., Nakaya, M., Yamanaka, T., Tanaka, J., Matsuda, S., Weng, Q. P., Avruch, J., and Ohno, S. (1998) *Biochem.J.* 335, 417–424
43. Behn-Krappa, A. and Newton, A. C. (1999) *Curr.Biol.* 9, 728–737
44. Haby, C., Larsson, O., Islam, M. S., Aunis, D., Berggren, P. O., and Zwieler, J. (1994) *Biochem.J.* 298, 341–346
45. Hepworth, T. J., Lawrie, A. M., and Simpson, A. W. (1997) *Cell Calcium* 21, 461–467
46. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, 11–21

【0009】

配列表の簡単な説明

配列番号：1は、ヒトNDR1のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。

配列番号：3は、ヒトNDR2のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。

配列番号：5は、ヒトMOB1のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。

配列番号：7は、マウスNDR1mRNAのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：8は、マウスNDR2mRNAのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：9は、ヒトNDR2mRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0010】

発明の概要

本発明は、細胞核Dbf2関連(Ndr)ホスホキナーゼ、その機能的相同体またはそのフラグメントに関し、ここで前記ポリペプチドは、Ndrタンパク質キナーゼ1(配列番号：1)のアミノ酸Thr-74またはアミノ酸Thr-74に対応するアミノ酸にてリン酸化されているか、または該アミノ酸が、酸性アミノ酸残基により置換されている。前記ポリペプチドはさらに、Ser-281および/またはThr-444にてリン酸化されてよい。前記相同体は典型的に、配列番号：1に示されるアミノ酸配列と50%以上の同一性を有する配列、および配列：-K-E-S/T-E-F/Y-で定義される少なくとも1つのペプチドを含む。 10

【0011】

さらに、本発明は、Ndrキナーゼまたはその機能的相同体に特異的に結合する抗体に関し、ここで前記ポリペプチドは、Ndrタンパク質キナーゼ1(配列番号：1)のアミノ酸Thr-74またはアミノ酸Thr-74に対応するアミノ酸にてリン酸化されており、そして前記抗体は、リン酸化アミノ酸を含むエピトープを認識する。前記抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであるか、もしくは一般的に遺伝子工学的に作製される。本発明にはまた、Ndrポリペプチドもしくはその相同体を検出または単離するための、または診断用もしくは治療用として、特に細胞増殖における異常を処置するための、本発明の抗体の使用も包含される。 20

【0012】

本発明はまた、細胞核Dbf2関連(Ndr)キナーゼ、その機能的相同体またはそのフラグメントからなる群から選択されるポリペプチドを、前記ポリペプチドを本発明の抗体と接触させ、混入物質を除去することにより単離する方法に関し、ここで前記ポリペプチドは、Ndrタンパク質キナーゼ1(配列番号：1)のThr-74またはアミノ酸Thr-74に対応するアミノ酸にてリン酸化されている。所望により、前記方法はさらに、ポリペプチドをエンコードする核酸と一緒にオカダ酸を含む細胞を処理し、細胞がポリペプチドを発現するのを可能とし、そして細胞から細胞抽出物を調製することを含む。 30

【0013】

他の局面にて、本発明は、Ndrキナーゼ活性のアゴニストまたはアンタゴニストの同定を目的とした本発明のポリペプチドの使用に関する。

さらなる局面にて、本発明は、医薬としての使用を目的とした本発明のポリペプチドに関する。

またさらなる局面にて、本発明は、細胞増殖における異常の処置のための医薬の製造を目的とした本発明のポリペプチドの使用に関する。

【0014】

他の局面にて、本発明は、本発明のポリペプチドと一緒にMOB1を含む複合体に関し、ここで所望により、1以上の前記タンパク質が、標識、例えば蛍光標識されていてもよい。 40

他の局面にて、本発明は、Ndrキナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングする方法に関し、該方法は、a)本発明のポリペプチドと一緒に、可能性のあるモジュレーターをインキュベートする工程、およびb)前記モジュレーターと前記ポリペプチド間の相互作用を検出する工程を含む。

【0015】

本発明はまた、Ndrキナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングする方法に関し、該方法は、a)本発明のポリペプチドと一緒に、可能性のあるモジュレーターをインキュベートする工程、およびb)Ndrタンパク質キナーゼ1のThr74 50

またはアミノ酸 T h r ー 7 4 に対応するアミノ酸におけるポリペプチドのリン酸化の変化を検出する工程を含む。この態様にて、前記可能性のあるモジュレーターは、例えば、シグナル経路のキナーゼであり得る。

【0016】

本発明はまた、N d r キナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングするための方法を提供し、該方法は、a) 本発明の複合体と一緒に、可能性のあるモジュレーターをインキュベートする工程、および b) M O B 1 と前記 N d r ポリペプチド間の結合の変化を検出する工程を含む。前記可能性のあるモジュレーターは、結合を減少し M O B 1 を放出し得る。もしくは、前記可能性のあるモジュレーターは、特に前記モジュレーターが M O B 1 フラグメントまたは誘導体である場合に、結合を増加するか、または安定化し得る。

10

【0017】

さらに、本発明は、本発明の前記ポリペプチドおよび／または抗体、ならびに取扱説明書を含むキットに関する。前記キットはさらに、M O B 1 を含み得、所望により、M O B 1 を認識する抗体を含んでよい。

【0018】

発明の詳しい説明

本発明者らは、2つの制御残基である S e r 2 8 1 および T h r 4 4 4 のリン酸化による N D R の制御、および S 1 0 0 ファミリーの E F ハンド C a 2 + 結合タンパク質との直接的な相互作用によるその活性化を詳しく特徴付けている。結果として、本発明者らは、T h r 7 4 と呼ばれる、付加的制御的な N D R 1 のリン酸化部位を対象としていない。3つのアミノ酸残基すべてが、インビボにおける N D R 1 活性に不可欠である；しかしながら、S e r 2 8 1 および T h r 4 4 4 と対照的に、T h r 7 4 は、N D R 1 活性自体を直接的に制御するよりもむしろ、制御タンパク質（例えば、S 1 0 0 B）への結合に関係する。これらの残基に付された番号は、W O 9 6 / 1 9 5 7 9 に記載のようにヒト N d r 1 キナーゼ配列内のそれらの位置を示す（配列番号：1も参照）。さらに、本発明者らは、N D R 1 と同様な方法で制御され、そして保存されたリン酸化部位である S e r 2 8 2 および T h r 4 4 2、ならびに T h r 7 5 のリン酸化に依存するキナーゼ活性を示す、N D R 2 と呼ばれるヒト N d r タンパク質キナーゼの第二のイソ型を同定し、かつ特性化した。前記 N d r 2 の配列を配列番号：3に規定した。

20

30

【0019】

故に、その最も広義の局面にて、本発明は、単離されたポリペプチドに関し、ここで該ポリペプチドは、配列番号：1のアミノ酸配列に規定される細胞核 D b f 2 関連（N d r）ホスホキナーゼ、その機能的相同体またはそのフラグメントであり、そしてここで該ポリペプチドは、N d r タンパク質キナーゼ1の T h r ー 7 4 またはアミノ酸 T h r ー 7 4 に対応するアミノ酸にてリン酸化されている。

【0020】

相同体とは、それらが、ヒト N d r 2（配列番号：3）で示される N d r タンパク質キナーゼと起源（origin）または機能の相同性を共有することを当業者に決定させるために十分な類似性を共有するポリペプチドである。ただし、前記相同体が N d r タンパク質キナーゼ1の T h r ー 7 4 またはアミノ酸 T h r ー 7 4 に対応するアミノ酸、例えば h N d r 2 の T h r ー 7 5 または他の相同体の対応する位置（対応箇所）にあるセリン／スレオニン残基にてリン酸化されているか、またはこの特定のリン酸化部位が酸性アミノ酸残基で置換されている。本発明は、本方法にて改変された他の生物体由来の N d r のすべての種類の相同体、例えばショウジョウバエ N d r（W O 9 6 / 1 9 5 7 9 の配列番号：2に示される）を含み、それらは常套方法により単離され得る。N d r の種相同体は、本明細書に記載のポリペプチド配列の誘導体であると考えられ得る。N d r キナーゼの「機能的相同体」とは、N d r 生物学的活性が残っている限り、その内部もしくはアミノ末端、またはそのカルボキシ末端に生じる一つもしくは複数のアミノ酸付加、置換および／または欠失を含む、これらの相同性ポリペプチドの誘導体および類似体を包含する。すなわち、

40

50

機能的相同体とは、任意のドメインを欠いていて良いか、またはもう1つのポリペプチドと結合して、例えば融合タンパク質の形状であって良い。本発明による変異体は、例えば酵素活性もしくは特異性、またはタンパク質結合に関して、まだ、記載した天然N d rと同様に反応する。

【0021】

故に、機能的相同体には、ポリペプチドの機能的フラグメント、ならびにリン酸化Th r-74（または対応箇所）が残っている生物学的に活性なポリペプチド、リン酸化Th r-74を維持している相同体またはフラグメントが含まれる。N d rのフラグメントには、そのポリペプチドのかなりの部分が除去されているN d rポリペプチド、またはその変異体（または相同体）が含まれる。N d rフラグメントは、天然のN d rとは実質的に異なる活性を有しているか、または実際天然のN d r生物学的活性の1つを欠いていて良い。故に、N d rフラグメントは、個々のN d rキナーゼドメイン、またはN d rキナーゼドメインの一部、ならびにS100B結合ドメインを包含して良い。N d rは、H a n k sとQ u i n nにより同定された12のタンパク質キナーゼ触媒サブドメインすべてを含む（Meth. Enzymol. (1991) 200, 38-62）。これらにより、サブドメインV I bおよびV I I Iの存在は、N d rがセリン／スレオニンキナーゼであることを示唆する。故に、本発明は、N d rのキナーゼドメインの一部、とりわけセリン／スレオニンキナーゼドメインを含む相同体を含む。さらに、ヒトN d rのアミノ酸265-276（K R K A E T W K R N R R）が、核局在化シグナルをコードすることが明らかとなった。従って、本発明はまた、核局在化シグナルを含み、そしてアミノ酸配列K R K A E T W K R N R Rを有するN d rのフラグメントを含む。

【0022】

ポリペプチドの生物学的活性を含むより小さいペプチドが、本発明に包含される。Th r-74部位（または対応箇所）を含むより小さいペプチドは、少なくとも5アミノ酸長であり、好ましくは天然のアミノ酸配列から選択される連続したアミノ酸を含む。好適なペプチドは、典型的に、それらの予定された使用に依存して6-15アミノ酸長であり、例えば、抗体の製造には8-10アミノ酸長のペプチドが好適であり、そしてホスファターゼ基質としては6-10または6-15アミノ酸長のペプチドが好適である。

【0023】

本明細書にて使用した用語「N d r生物学的活性」とは、N d rキナーゼが基質をリン酸化する能力に限定されることなく、タンパク質またはペプチドの他の特性、例えば、Th r-74にてリン酸化されたN d rキナーゼまたはその等価体に特異的な抗体と結合する（すなわち、N d rキナーゼのリン酸化状態と非リン酸化状態の間の識別）能力、もしくは例えばS100BまたはM O B 1などのタンパク質を含むN d rキナーゼの基質またはモジュレーターに結合するその能力も含む。

【0024】

好適な場合に、本明細書にて用いた相同性とは、配列の同一性を示す。故に、相同体とは、本明細書に記載のN d rタンパク質キナーゼと一定量の配列の同一性を有するポリペプチドでもある。配列の同一性とは、典型的に50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは75%以上、最も好ましくは90%以上である。ヒトおよびショウジョウバエのN d r配列は、68%の配列の同一性を有する。一方、D b f 2は、ヒトN d rと全体としてたった32%のアミノ酸の同一性を有し、そのことはD b f 2がN d rに関連するが、2つは種相同体ではないことを示す。N d rタンパク質キナーゼファミリーのメンバーのアミノ酸残基が同一ではない場合、その相同体は、興味のあるキナーゼドメイン（複数可）の構造的／機能的関係を変化させない、保存的置換または変異を含むことが好ましい。相同体のS e r-281、Th r-444、Th r-74またはそれらに対応するリン酸化部位の置換は、好ましくは酸性アミノ酸残基、例えばグルタミン酸で行われる。ただし、リン酸化部位により生じる機能を除去すること、例えば、ネガティブ対照としてアラニンで置換することが望ましい場合を除く。好ましくは、Th r-74、S e r-281および／またはTh r-444を含む相同体は、これらの部位にてリン酸化され得る

が、Th r-74リン酸化部位のみを含む相同体が、例えば相互作用するタンパク質との結合活性に有用である。

【0025】

特に好適な相同体は、配列-K-E-S/T/N-E-F/Y-を含むものであり、ここで、Nは酸性アミノ酸であり、SおよびTは、ホスホセリン残基またはホスホスレオニン残基を示し、残りのアミノ酸は、その常用される一文字表記で記載されており、そして最も好適な相同体は、配列-K-E-S/T-E-F/Y-を含む。前記好適な相同体はさらに、配列-A r g-X a a-L e u/M e t-A l a-X a a-P₁-X a a-V a l-G l y-Th r-P r o-X a a-T y r-I l e-A l a-P r o-G l u-または-P h e-X a a-X a a-X a a-P₂-X a a-X a a-X a a-P h e-のうち 10
少なくとも1つを含んでいて良く、ここで、「/」は、いずれかから選択できるアミノ酸残基を示し、P₁およびP₂はリン酸化されたアミノ酸または酸性アミノ酸残基、好ましくはホスホセリンおよびホスホスレオニンをそれぞれ示し、X a aは任意のアミノ酸であってよく、そして残りのアミノ酸は、その常用される三文字表記で記載されている。より好適な態様にて、前記相同体は、-A r g/G l n-A r g-G l n/V a l/L e u-L e u/M e t-A l a-P h e/T y r/H i s-P₁-Th r/L e u-V a l-G l y-Th r-P r o-A s p/A s n-T y r-I l e-A l a-P r o-G l u-または-P h e-I l e/L e u/P h e-G l u/G l y/A s n-P h e/T y r-P₂-P h e/T y r-L y s/A r g-L y s/A r g-P h e-のうち少なくとも1つ 20
を含み、ここで、「/」は、代替的なアミノ酸残基を示し、P₁およびP₂はリン酸化されたアミノ酸または酸性アミノ酸残基、好ましくはホスホセリンおよびホスホスレオニンをそれぞれ示し、そして残りのアミノ酸は、その常用される三文字表記で記載されている。

【0026】

本発明のポリペプチドが、融合タンパク質の形態で発現される場合、その融合ポリペプチドは、直接的に結合されるか、またはスパーサーにより結合されていてよい。例えば、天然には存在しない場合には、特異的に認識され、化学的または酵素的に切断され得る領域を挿入することが可能である。選択的に切断する試薬または酵素の例は、C N B r、V 8プロテアーゼ、トリプシン、スロンピン、ファクターX、ペプチダーゼ y s c aおよびペプチダーゼ y s c Fである。前記融合ポリペプチドは、当業者に周知のように、「タグ 30
(例えば、H i sタグまたはH Aタグ)などの、タンパク質の単離に有用な配列を含んでいてよい、またはマーカータンパク質、例えば蛍光タンパク質または酵素、例えば、ベーターガラクトシダーゼなどの無関係な配列と連結していてよい。組換え技術または化学的技術による融合タンパク質、変異体またはフラグメントの構築方法は、本技術分野にて周知である。

【0027】

本発明のさらなる局面にて、Th r-74（または対応箇所）にてリン酸化されたN d rキナーゼに特異的な抗体を提供する。上記のように、かかる抗体は、N d rキナーゼのリン酸化形と非リン酸化形の差異を識別することができる。かかる抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、抗体フラグメント（F c、F v）であってよく、そして例えばマウス、ラット、ヤギ、ヒト、組換え体などを起源としてもよい。かかる抗体は、例えば、免疫染色、免疫沈降または免疫分離によるN d rの同定、検出または単離に有用であり得るか、またはインビボもしくはインビトロにおけるN d r活性の阻害に有用であり得る。 40

【0028】

Th r-74（または対応箇所）にてリン酸化されたN d rに特異的な抗体は、本技術分野にて周知の技術により調製され得る。ポリクローナル血清を調製するために、例えば、リン酸化されたTh r-74を含むN d rキナーゼの抗原部分（所望により、アジュバントが存在するか、またはキーホールリンペットヘモシアニンなどの免疫活性化薬剤と結合させたもの）を、マウスまたはウサギなどの哺乳動物に注入し、そして抗体を、固相結合キナーゼまたはその抗原部分を用いた親和性精製によりそれから回収する。モノクロー 50

ナル抗体を、同様の確立された方法により調製することが可能である。

【0029】

N d r キナーゼのリン酸化は、N d r を発現する細胞内で、オカダ酸で処理することにより誘導し得る。前記細胞は、自然にN d r キナーゼを発現し得るか、またはN d r キナーゼをコードする配列を含む発現ベクターを含み得る。故に、前記方法は、多様な宿主細胞での使用が可能である。細胞抽出物からN d r キナーゼを発現および単離する方法は、本技術分野にて周知である（例えば、WO 96 / 19579を参照）。T h r - 74（または対応箇所）にてリン酸化されているN d r に特異的な抗体は、例えば、本技術分野にて周知のような、混入物質から所望のタンパク質を単離するための親和性クロマトグラフィーまたは免疫沈降を使用した、N d r キナーゼ、またはこの部位にてリン酸化されたその相同体の単離に特に有用である。

10

【0030】

前記ポリペプチド、とりわけその誘導体は、天然源から誘導されるよりもむしろ、合成法により得ることが可能である。故に、本明細書に含まれる情報を用いて、N d r ポリペプチドまたはペプチド類を、市販のタンパク質合成装置を用いて合成してよく、または商業用のペプチド合成サービスから得てもよい。合成されたN d r の誘導体は、改変されたアミノ酸残基の使用、またはポリペプチドへの異種基(homologous group)もしくは側鎖の付加を含む、所望の配列修飾を含んでいて良い。その後、前記ポリペプチドまたはペプチド類は、以下の実施例に記載したように、インビトロでリン酸化し得る。

【0031】

本発明者らは、N D R と h M O B 1 の相互作用も検討し、オカダ酸刺激に依存した方法でh M O B 1 がh N D R と相互作用することを発見した（実施例8参照）。h M O B 1 の過剰発現は、N D R キナーゼ活性も刺激する。N D R のN末端制御ドメイン内の保存残基の点変異は、N D R キナーゼ活性、ならびにM O B 1 結合を低下する。前記N D R - M O B 相互作用は、M O B 1 のオカダ酸誘導変異による影響を受けるが、N D R のオカダ酸誘導リン酸化には、相互作用を必要としない。C a ²⁺キレート化剤であるB A P T A - A Mでの細胞の処理は、N D R - M O B 相互作用を低下させ、N D R - M O B 相互作用におけるC a ²⁺の役割を示唆する。

20

【0032】

故に、本発明のさらなる局面にて、N d r、その機能的相同体またはフラグメント、およびM O B 1（M P S 1 ワンバインダー1）を含む複合体を提供する。h M O B 1 の配列は、G I : 11691898および以下の配列番号：5に記載されており、当業者に明らかのように、M O B 1 の相同体もまた、N d r と結合し得る。M O B 1 相同体は、G I 11691898または、配列番号：5もしくは6に記載のM O B 1 配列と一定量の配列同一性を有するポリペプチドである。配列の同一性とは、一般に50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは75%以上、最も好ましくは90%以上である。好ましくは、前記タンパク質はヒトタンパク質である。いくつかの態様にて、1以上のタンパク質を、検出を容易にするために標識し、例えば、蛍光標識を用いて標識する。故に、2つのタンパク質（例えば、N d r 1 と M o b 1）間の相互作用を、結合した蛍光標識の量によるか、または蛍光消光により検出することができる。

30

40

【0033】

N d r などのキナーゼは、細胞内のシグナル伝達に関与することが知られている。この関与とは、シグナル伝達経路を調節する物質のためのキナーゼ標的を構成することである。一般に、シグナル伝達経路の調節は、特定の刺激に対する細胞の応答を変化させる。例えば、ホルモンの作用は、一般に遺伝子発現の調節因子である、ホルモン受容体から生物学的エフェクターへのシグナル伝達に関与するキナーゼを標的化することにより調節され得る。タンパク質のS100ファミリーとは、細胞中の主にカルシウムイオン結合タンパク質を示し、そして多くのカルシウムを介する作用に関与する。N d r の活性は、とりわけS100Bにより制御される。

【0034】

50

本発明のポリペプチドは、N d r キナーゼ活性のアゴニストまたはアンタゴニストの同定に有用であり、そして、例えば細胞増殖の異常の処置における医薬としての可能性を有する。好ましくは、本発明のスクリーニング方法は、細胞をN d r のアクチベータまたはインヒビターと接触させることを含む。モジュレーターとして総称されるアクチベータおよびインヒビターにはN d r 模倣物が含まれ、T h r - 7 4 部位またはT h r - 7 4 部位の近隣でN d r と相互作用し、それによりN d r 活性におけるT h r - 7 4 リン酸化の効果に影響を与える。言い換えれば、モジュレーターは、M O B 1 に作用することが可能であり、N d r のT h r - 7 4 領域へのその結合を阻害または増強し得、それにより他の手段によるN d r の活性を活性化するか、または抑制することができる。

【0035】

10

故に、本発明の1つの局面にて、N d r キナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターを同定する方法は、N d r キナーゼまたはその機能的相同体を、可能性のあるモジュレーターと接触させること、そして、N d r キナーゼのT h r - 7 4 またはN d r タンパク質キナーゼ1もしくはその機能的相同体のアミノ酸T h r - 7 4 に対応するアミノ酸のリン酸化における変化を検出することにより行われる。リン酸化の変化は、リン酸特異的抗体の使用により容易に検出され得る。T h r - 7 4 のリン酸化の減少は、N d r キナーゼ活性を阻害する化合物であることを示す。

【0036】

別の態様にて、N d r キナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターを同定する方法は、T h r - 7 4 (または対応箇所)にてリン酸化されたN d r もしくはその機能的相同体を、可能性のあるモジュレーターと接触させること、そして、前記モジュレーターとリン酸化されたN d r またはその機能的相同体間の相互作用を検出することにより行われる。かかるモジュレーターとしては、限定するものではなく、アゴニスト、シグナル伝達経路のアンタゴニストおよび上流のメンバーが含まれ得る。

20

【0037】

さらなる態様にて、本発明は、M O B 1 およびN d r (またはその相同体もしくはフラグメント)のタンパク質複合体と一緒に、可能性のあるモジュレーターをインキュベートする工程、およびM O B とポリペプチド間の結合の変化を検出する工程を含む、N d r キナーゼ活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングする方法を提供する。故に、モジュレーターは、2つのタンパク質間の結合を減少させ、M O B 1 を放出し、その場合はN D R キナーゼ活性が阻害される(モジュレーターが、全長M O B 1 よりもN D R により高い親和性を有するM O B 1 の機能的フラグメントであることが前提であり、この場合には、M O B 1 の機能的フラグメントが、M O B 1 活性を模倣し得、そしてN d r 活性を活性化し得る)。言い換えれば、モジュレーターは、2つのポリペプチド間の結合を増加することができ、故にN d r 活性を活性化することが可能である。

30

【0038】

故に、本発明のN d r キナーゼ要素を、増殖制御の異常の処置における使用を目的とした推定治療薬剤を同定するためのスクリーニングシステムの設計に用いることができる。参照により本明細書に引用されるW O 9 7 / 1 8 3 0 3 には、スクリーニング方法、キット、可能性のある治療薬およびその製造が記載されており、その教示は、本発明の材料および方法に適用され得る。

40

【0039】

結合実験に関して、本発明のポリペプチドは、例えば、マイクロタイター・プレートまたはビーズのような固形担体上に固定され得るか、または、1以上の識別可能なマーカー、例えばビオチン、または放射性基、蛍光性基もしくは化学発光性基を担持し得る。本発明の好適な態様にて、N d r 1 または2 は、N d r 活性の、可能性のあるモジュレーターをスクリーニングする方法にて使用される。

【0040】

インキュベーション条件は、分析に用いられる正確な方法、例えば、キナーゼ分析を使用するかまたはキナーゼとスクリーニングされた化合物間の相互作用の検出を使用するか

50

により変わる。転写活性検出システム、例えば酵母ツーハイブリッドシステムの場合、インキュベーション条件は、遺伝子転写に適当な条件であり、例えば通常の生細胞内の条件である。しかし、他の検出システムでは、異なるインキュベーション条件が必要とされる。例えば、相互作用の検出がクロマトグラフィー分析における相対的親和性に基づくもの、例えば親和性クロマトグラフィーとして周知のものである場合、条件は、結合を促進するように調整し、そしてその後、スクリーニングされた化合物が、もはやN d rに結合しない点を決定できるように、除々に変える。

【0041】

本発明のインキュベーションは、多くの手段により達成されるが、基本的な要件は、キナーゼまたはその相同体／フラグメントとスクリーニングされた化合物が互いに接触した状態になり得ることである。これは、ポリペプチドおよび前記化合物を混和することにより達成され得るか、またはインサイチュウでそれらを産すること、例えばそれらをエンコードする核酸を発現させることにより達成される。N d rまたはN d rフラグメントおよび／または前記化合物が、他のポリペプチドと融合した形態である場合、それらを例えばインサイチュウで発現させることができる。

10

【0042】

本発明のN d rまたはその相同体もしくはフラグメントを、例えばスクリーニングする化合物と一緒にインキュベートし、そして次に、N d rに特異的な抗体またはM O B 1に特異的な抗体でN d r複合体を「沈降する（pulling down）」ことにより、それと結合する化合物をスクリーニングするために用いることができる。免疫沈降または免疫親和性クロマトグラフィーに適当な抗体を、当業者に周知の常套方法により調製することが可能であり、そしてそれは本質的にモノクローナル、ポリクローナルまたは組換え体であってよい。N d r化合物複合体を、親和性により単離した後、前記化合物を、常套技術によりN d r抗体から分離し、特性化することが可能である。

20

【0043】

本発明はさらに、スクリーニングシステムにおける、T h r - 7 4（または対応箇所）にてリン酸化されたN d r、もしくはこの残基にて酸性アミノ酸を有するN d rの使用を含む。

【0044】

さらなる態様にて、本発明は、N d r（またはM O B 1）またはそのフラグメントと、直接的または間接的に相互作用する化合物を提供する。かかる化合物は、無機物または有機物であり得、例えば、細胞内シグナル伝達に關与する抗生物質またはタンパク質性化合物であり得る。

30

【0045】

本発明の化合物は、上述した技術を用いたスクリーニングにより同定され得、そして、確立された方法に従い天然源から抽出することにより調製され得るか、とりわけ低分子量の化合物の場合には、合成により調製され得る。タンパク質性化合物は、組換え発現系、例えばバキュロウイルス系または細菌系にて発現させることにより調製され得る。タンパク質性化合物は、治療に応用することが可能であるが、主にシグナル伝達経路の機能の探索に有用である。

40

【0046】

一方、低分子量化合物は、好ましくは、確立された方法に従って化学合成により調製される。それらは、主として治療薬として示唆される。一般に、低分子量化合物および有機化合物は、抗増殖剤として有用であり得る。

【0047】

故に、T h e - 7 4（または対応箇所）にてリン酸化されたN d rキナーゼ、もしくはその機能的相同体は、特に細胞増殖の異常、例えばガン、免疫系の疾患または障害（例えば、免疫不全）および神経変性疾患の処置のための、医薬として有用であるか、または医薬の調製のために有用であり得る。

【0048】

50

かかる化合物のスクリーニングに有用なキットを調製可能であり、基本的に T h r 7 4 (または対応箇所) にてリン酸化された N d r またはその機能的相同体と共に取扱説明書を含み、所望により、N d r とスクリーニングされた化合物、M O B 1 またはその相同体の間の相互作用、および M O B 1 と前記スクリーニングされた化合物の間の相互作用を検出する 1 つ以上の手段を含んでいてよい。故に、スクリーニングキットは、上記の検出システムの 1 つを含むことが好ましい。

【0049】

本発明のキットに使用するための N d r は、例えば、溶液中、懸濁液中または凍結乾燥したタンパク質の形態で提供され得るか、もしくは発現系にて N d r またはそのフラグメントの製造を可能とする核酸配列の形態で提供され得る。

10

【0050】

以下の実施例は、本発明の特定の局面を記載しており、当業者に対して本発明を例証し、本発明を説明するものである。実施例は、本発明の理解および実施に有用な特定の方法を単に提供する例としてであって、本発明を限定するものと解釈してはならない。

【0051】

実施例

方法

ランダムプライミング、サブクローニング、シーケンシング、制限酵素での切断、ゲル精製、ライゲーション、形質転換およびアニーリングなどの遺伝子工学における標準的な方法を、基本的に Sambrook らの、Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 1989 に記載のように実施する。

20

【0052】

細胞培養

C O S - 1 細胞を、10% F C S、100 U / m l ペニシリンおよび 100 マイクログラム / m l ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地中にて維持した。細胞を、業者の取扱説明書に従いサブコンフルエント段階で F u g e n e - 6 トランスフェクション試薬 (Roche) にて形質転換した。いくつかの実験にて、トランスフェクションの 24 時間後に、細胞を 0.1% N, N - ジメチルホルムアミド (D M F) (Alexis Corp.) 中 1 マイクロ M オカダ酸、0.1% ジメチルスルホキシド (D M S O ; Sigma) 中 50 30
マイクロ M B A P T A - A M (1, 2 - ビス (o - アミノフェノキシ) エタン - N, N', N' - テトラ酢酸・テトラ (アセトキシメチル) エステル)、または 0.1% D M S O (Alomone) 中 20 マイクロ M タプシガルギンで 60 分間処理した。

【0053】

プラスミド

HA でタグ標識した N D R 1 を有する哺乳動物発現ベクターを、以下のプライマー：
5' - C C C A A G C T T G C C A C C A T G G C T T A C C C A T A C G A T G T T C
C A G A T T A C G C T T C G A T G C A A T G A C G G C A G - 3' (配列番号：10)
および 5' - C G G G A T C C C T A T T T T G C T G C T T T C A T G - 3' (配列
番号：11) を用いて P C R により構築し、そして p C M V 5 の H i n d I I I 部位およ
び B a m H I 部位にサブクローニングした。p G E X - 2 T _ N D R 1 プラスミドは、既
に文献に記載されている (Millward et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 92, 5022
- 5026)。キナーゼ不活性 p C M V 5 _ H A - N D R 1 プラスミドおよび p G E X - 2 T
_ N D R 1 プラスミド (K 1 1 8 A)、およびリン酸化部位アラニン変異体 (T 7 4 A、
S 2 8 1 A および T 4 4 4 A) を、Q u i c k C h a n g e 部位突然変異プロトコル (Stratagene) を用いて以下のプライマーで野生型ベクターから作製した：
5' - G G A C A T G T G T A T G C A A T G G C T A T A C T C C G T A A A G C A G
A T A T G C T T G A A A A G A G C A G G - 3' (配列番号：12) および 5' - G
C A T A T C T G C T T T A C G G A G T A T A G C C A T T G C A T A C A C A T G T
C C C G T A T C T T T C T T C T G A A C A A G C - 3' (K 1 1 8 A ; 配列番号：1 30

40

50

3) ; 5' - G C T C G G A A G - G A A G C A G A G T T T C T T C G T T T G A A G
A G A A C A A G A C T T G G - 3' (配列番号: 14) および 5' - C G A A G A A A
C - T C T G C T T T C C T T T C C G A G C - A T G T G C T G A T C T C C G - 3' (T
74A; 配列番号: 15) ; 5' - C G T C A G C T A G C C T T C - G C T A C A G T
A G G C A C T C C T G A C T A C A T T G C - 3' (配列番号: 16) および 5' - G
G A G T G C C T A C T G T A G C G A - A G G C T A G C T G A C G T C T A T T T C
T T T T C C - 3' (S281A; 配列番号: 17) ; および 5' - G G T C T T C A T
C A A T T A C - G C T T A C A A G C G C T T T G A G G G C C T G A C T G C - 3'
(配列番号: 18) および 5' - C C T C A A A G C G C T T G T A A - G C G T A A T
T G A T G A A G A C C C A G T C T - T T G T T C - 3' (T444A; 配列番号: 1
9) 。

p E C E _ S 1 0 0 B プラスミドは既に文献に記載されている (Millward et al., 1998, EMBO J. 17, 5913-5922) 。すべてのプラスミドの配列を、DNA シークエンシングにより確認した。

【0054】

抗体

抗 S e r 2 8 1 P および抗 T h r 4 4 4 P ウサギポリクローナル抗血清を、S e r 2 8 1 P 部位の合成ペプチド N R R Q L A F S (P O ₄) T V G T P D (配列番号: 20) および T h r 4 4 4 P 部位の K D W V F I N Y T (P O ₄) Y K R F E G (配列番号: 21) に対して作製した。前記ペプチドを、キーホールリンペットヘモシアニンと結合させた。ウサギへの注射および血の収集を、標準的な技術を用いて行った。抗 S 2 8 1 P 抗血清をさらなる精製なしに用い、一方、抗 T 4 4 4 P 抗体を、プロテイン A - セファロース (Pharmacia) で精製し、その後抗原ペプチド結合 C N B r - 活性化セファロース (Pharmacia) で精製した。抗体を、0.1 M グリシン、pH 2.5 で溶出した。12 C A 5 H A モノクローナル抗体ハイブリドーマ上清 (H A に特異的な抗体) を、H A - N D R 1 変異体の免疫検出および免疫沈降に用いた。ウサギ抗 N D R 1 _ C 末端ポリクローナル抗血清を、合成ペプチド T A R G A I P S Y M K A A K (N D R 1、配列番号: 2 の a a 4 5 2 - 4 6 5 に対応する) 結合キーホールリンペットヘモシアニンに対して作製した。ペプチド特異的抗体を、プロテイン A - セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) で精製し、次に免疫ペプチドを結合した A f f i - g e l 10 (Bio-Rad) で精製した。抗体を、6 M 尿素を含む 50 mM T r i s - H C l、pH 7.4 で溶出し、次にリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に対して透析した。S 1 0 0 B を認識するウサギポリクローナル抗血清を、組換えヒト S 1 0 0 B に対して作製し、さらなる精製なしに用いた (Ilg et al., 1996, Int.J.Cancer 68, 325-332) 。

【0055】

ヒト G S T 融合 N D R 1 の細菌性発現

B L 2 1 - D E 3 - p R e p 4 大腸菌株を、p G E X - 2 T _ N D R 1 野生型または変異プラスミドで形質転換した。B L 2 1 - D E 3 はプロテアーゼ欠損大腸菌株であり、p R e p 4 は L a c I q リプレッサー担持プラスミドであり、共に市販されている。所望により、望ましい場合は G r o E S L を含む大腸菌株を使用してよく、それはキナーゼを安定化するシャペロンタンパク質を発現する。対数増殖期中期 (mid-logarithmic phase) の細胞を、30 °C で 4 時間、0.5 mM イソプロピル ベーター D - チオガラクトピラノシド (I P T G) で誘導した。細菌を、1 mg / ml リソソームの存在下で加圧型細胞破壊装置 (French press) を用いて溶解し、融合タンパク質を、前記装置の製造業者が記載のようにグルタチオン - アガロース (Amersham Pharmacia Biotech) で精製した。組換えタンパク質を、下記のようにキナーゼ活性について分析し、自己リン酸化を、S D S - P A G E 分離後にチェレンコフ計測 (Cerenkov counting) によるか、または P h o s p h o r I m a g e r スクリーニングに暴露し、その後、I m a g e Q u a n t ソフトウェア (Molecular Dynamics) で分析することにより決定した。

【0056】

GST-NDR1 キナーゼ分析

1 マイクログラムの精製した組換え GST-NDR1 野生型および変異体（さらなる処理なしにか、または 1 mM CaCl_2 および 10 mM ウシ S100B (Sigma) の存在下または非存在下にて 2 時間自己リン酸化させる) を、20 mM Tris-HCl、pH 7.5、10 mM MgCl_2 、1 mM DTT、100 mM [ガンマー³²P] ATP (～0.5 mCi/マイクロリットル)、および 1 mM NDR1 基質ペプチド (KKRNRRLSVA; 配列番号: 22) を含む 20 マイクロリットルの反応混合物中にて分析した。30℃で30分間インキュベーション後に、反応を 50 mM EDTA で停止し、そして反応混合物 10 マイクロリットルを、2 cm² の正方形の P81 ホスホセルロール・ペーパー (Whatman) 上にスポットとした。それらを、1% リン酸中で 4×5 分、次に 3×20 分間洗浄し、アセトンで 1 度洗浄し、その後、液体シンチレーションカウンター中にて測定した。NDR1 活性の 1 単位を、1 分間に 1 nmol ペプチド基質のリン酸化を触媒する量として定義した。

【0057】

HA-NDR1 キナーゼ分析

形質転換され、かつ処理された COS-1 細胞を氷冷 PBS で一度洗浄し、1 mM Na_3VO_4 および 20 mM ベーターグリセロリン酸を含む 1 ml の氷冷 PBS 中にラバーポリスマン (rubber policeman) で収集し、その後、500 マイクロリットルの IP 緩衝液 (20 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、1% ノニデット P-40、10% グリセロール、1 mM Na_3VO_4 、20 mM ベーターグリセロリン酸、1 マイクロモル マイクロシスチン-LR、50 mM NaF、0.5 mM PMSF、4 マイクロモル ロイペプチン、1 mM ベンズアミジン、および 1 錠/コンプレート・プロテアーゼ・インヒビター 10 ml IP (Roche)) 中に溶解した。溶解物を、20 分間 20000 g で遠心し、そして上清の 3 等分のアリコート (200 mg) を、60 分間 プロテイン A-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) で事前にきれいにしておき、そして次に、4℃で3時間 12CA5 抗体と混合し、プロテイン A-セファロースに事前に結合させた (2 マイクロリットル ビーズに対して～1 mg 抗体)。その後、前記ビーズを IP 緩衝液で 2 度洗浄し、10 分間、1 M NaCl を含む IP 緩衝液で 1 度洗浄し、再び 10 分間、IP 緩衝液で 1 度洗浄し、そして最後に 4 マイクロモル ロイペプチンおよび 1 mM ベンズアミジンを含む 20 mM Tris-HCl、pH 7.5 で 2 度洗浄した。その後、ビーズを、20 mM Tris-HCl、pH 7.5、10 mM MgCl_2 、1 mM DTT、100 マイクロモル [ガンマー³²P] ATP (～0.1 マイクロCi/マイクロリットル)、1 マイクロモル cAMP-依存性タンパク質キナーゼインヒビター・ペプチド PKI (Bachem)、4 マイクロモル ロイペプチン、1 mM ベンズアミジン、1 マイクロモル ミクロシスチン-LR、および 1 mM NDR1 基質ペプチド (KKRNRRLSVA) を含む 30 マイクロリットルの緩衝液中に再懸濁した。30℃でインキュベーションした 60 分後、15 マイクロリットルの上清を除去し、そして基質ペプチドへのリン酸の取り込みを、上記 GST-NDR1 のように判定した。

【0058】

Ser281 または Thr444 でリン酸化された NDR1 の免疫検出

上記の 100 マイクログラムの COS-1 界面活性剤抽出物から免疫沈降した 1 マイクログラムの GST-NDR1 または HA-NDR1 のどちらかを、10% SDS-PAGE で分離し、そして室温で 2 時間、または 4℃で一晩、50 マイクログラム/ml の競合的非リン酸化ペプチドまたは抗 Thr444 P 精製抗体 (1:500) の存在下に抗 Ser281 P 抗血清 (1:1000) で免疫ブロッキングした。両抗体を、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ Ig 抗体 (Amersham biosciences) で検出し、そして ECL (化学発光; Amersham Pharmacia Biotech) で現像した。

【0059】

ウエスタンブロッキング

GST-NDR1 または HA-NDR1 を検出するため、試料を、10% SDS-PAGE

GEにより分離し、そしてPVDF膜 (Immobilon-P; Millipore) に転写した。膜を、5%スキムミルク粉末を含むTBST (50mM Tris-HCl、pH7.5、150mM NaCl、および0.05%Tween-20) 中でブロッキングし、その後、抗NDR1__C末端 (4マイクログラム/ml) または12CA5モノクローナル抗体上清 (1:100) で2時間プロービングした。結合した抗体を、対応するホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ結合二次抗体およびECLで検出した。免疫沈降したS100Bを検出するため、試料を18%SDS-PAGEで分離し、そしてPVDFに転写した。前記膜をTBST中5%BSAおよび1%FCsで2時間ブロッキングし、その後、同じ緩衝液 (BSAおよびFCsを含むTBST) で1:1000に希釈した抗S100B抗血清でプロービングした。その後、結合した抗体をTBST中の対応するホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ結合二次抗体およびECLで検出した。 10

【0060】

NDR1およびS100Bの共免疫沈降

細胞質性のCOS-1細胞抽出物を、低張緩衝液 (10mM HEPES pH7.9、0.5mM CaCl₂、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、1mM Na₃VO₄、20mM ベータグリセロリン酸、1マイクロモル マイクロシスチン-LR、50mM NaF、0.5mM PMSF、4マイクロモル ロイペプチン、1mM ベンズアミジン、および1錠剤/完全なプロテアーゼ・インヒビター10ml) 中にて10分間、細胞を溶解することにより調製した。その後、細胞を、Dounceホモジナイザーを用いてホモジナイズした。3300gで15分間遠心後、細胞質抽出物を含む上清を取っておき、そしてペレット中に見られる単離された核をさらに高塩緩衝液 (20mM HEPES、pH7.9、25% グリセロール、0.5mM CaCl₂、1.5mM MgCl₂、0.5M KCl、1mM Na₃VO₄、20mM ベータグリセロリン酸、1マイクロモル マイクロシスチン-LR、50mM NaF、0.5mM PMSF、4マイクロモル ロイペプチン、1mM ベンズアミジン、および1錠剤/コンプレート・プロテアーゼ・インヒビター10ml) 中にて30分間溶解処理した。20000gで30分間遠心後、細胞質および核抽出物を、4:1の割合で合わせた。1mgのタンパク質抽出物を、60分間プロテインA-セファロースで事前にきれいにしておき、そして10mlプロテインA-セファロースに固定された5mlの抗S100B抗血清と一緒に、4℃で3時間インキュベートした。その後、前記ビーズを、緩衝液 (20mM HEPES、pH7.9、25mM KCl、5% グリセロール、1mM MgCl₂、0.1mM CaCl₂、0.5mM PMSF、4マイクロモル ロイペプチン、1mM ベンズアミジン、1mM Na₃VO₄、20mM ベータグリセロリン酸、1マイクロモル マイクロシスチン-LR、および50mM NaF) 中で4度洗浄した。免疫沈降物を、試料緩衝液中で沸騰し、そして上記のようにS100BまたはHA-NDR1に免疫プロットした。 20 30

【0061】

質量分析

10マイクログラムの未処理GST-NDR1または自己リン酸化GST-NDR1 (1mM CaCl₂ および10マイクロモル ウシS100Bホモ二量体の存在下か非存在下のどちらかにて30℃で2時間) を、10% SDS-PAGEにより分離し、クマシー・ブルーR-350 (Sigma) で染色し、そしてさらなる処理のためにゲルから抽出した。次に、ゲル片をアセトニトリル中で3×8分洗浄し、そして25mM NH₄HCO₃ 中で2×12分洗浄した。その後、ゲル片を10mM DTT中57℃で1時間還元し、続いて55mM ヨードアセトアミド中室温で45分間アルキル化した。アセトニトリル/NH₄HCO₃ 中での洗浄を繰り返した後、ゲル結合GST-NDR1を、37℃で一晩、連続的に等級調製されたトリプシン (Promega) で切断した。その後、切断されたペプチドを、水:アセトニトリル:ギ酸 (20:70:10) および水:メタノール:ギ酸 (93:2:5) 中における2度の15分間の超音波処理工程により抽出した。 40

【0062】

すべての実験を、N a n o E S I 源 (Protana, Odense, Denmark) を備えた A P I 3 0 0 三連四重極質量分析計 (triple-quadrupole mass spectrometer) (PE-Sciex, Toronto, Canada) で行った。m/z-79 の前駆体イオンスキャンに関して、試料を W i l m と M a n n (1996, Anal.Chem. 68, 1-8) にしたがったオフライン・ナノエレクトロスプレーにより注入した。その装置を、ネガティブイオン・モードにて操作した；m/z-79 の検出の感度を良くするため、少量のアンモニアを試料調製中に噴射用注射針に添加した。L C-M S 配列分析に関して、リン酸化ペプチドをさらに A P I 3 0 0 質量分析器と連動した高性能液体クロマトグラフィー (H P L C) により分離した。R h e o s 4 0 0 0 クロマトグラフには、1 × 2 5 0 m m V y d a c C 8 カラム (Hesperia, Canada) が装備されている。H P L C カラムを 9 5 % 溶媒 A (水中 2 % C H ₃ C N、0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸)、5 % 溶媒 B (水中 8 0 % C H ₃ C N、0 . 0 4 5 % トリフルオロ酢酸) にて平衡化し、そして 1 8 0 マイクロリットル/分の流速で 6 0 分間にわたる溶媒 B の 5 から 5 0 % の直線勾配を展開した。カラム後、流出物を質量分析に用いるために少量ずつ (約 5 %) 取り分けた。リン酸化ペプチドを、集めた H P L C 画分にてチェレンコフ計測で検出した。さらなる配列調査のために、リン酸化ペプチド含有画分を乾燥し、数マイクロリットルの水：C H ₃ C N：ギ酸 (4 9 . 5 : 4 9 . 5 : 1) 中に再溶解し、ナノエレクトロスプレー源を用いて質量スペクトル分析器に徐々に注入し、そしてポジティブイオン・モードにて低エネルギー・タンデム M S 装置により分析した。

10

【0063】

実施例 1 : N d r 1 自己リン酸化部位のマッピング

20

N D R 1 を、E F ハンド C a 2 + 結合 S 1 0 0 B タンパク質とインキュベートすることにより、自己リン酸化および N d r 1 キナーゼ活性の両方が増加した (Millward ら, 1995; Millward ら, 1998)。本実施例ではさらに、ナノスプレー E S I-M S / M S 分析法により N D R 1 自己リン酸化部位を分析した。

【0064】

簡単には、1 0 マイクログラムの G S T-N D R 1 を未処理のままか、または 1 m M C a C l ₂ および 1 0 m M ウシ S 1 0 0 B の非存在下または存在下にて 2 時間自己リン酸化した。S D S-P A G E による分離後、G S T-N D R 1 を切り出し、リン酸化ペプチドの質量スペクトル分析のためにトリプシン切断処理した。得られたトリプシンとペプチドの混合物を、三連四重極質量分析計に注入し、ネガティブイオン・モードにて m/z-79 に関して前駆体イオンスキャンすることによりリン酸化ペプチドを分析した。この方法にて、衝突セル (collision cell) におけるフラグメント化後、m/z-79 種を遊離し、リン酸化ペプチドの特徴であるネガティブ・フラグメントイオン P O ³⁻ 特性を示す、前記混合物中の各ペプチドを検出した (Carr et al., 1996, Anal. Biochem. 239, 180-192; Wilm et al., 1996, Anal.Chem. 68, 527-533)。m/z が N D R 1 誘導リン酸化ペプチドであると考えられるリン酸化ペプチドを、便宜上 P 1 ~ P 4 と標識した。前記ペプチドのいくつか (例えば、P 2 および P 1) を、重荷電状態にて検出した。ペプチド P 2 は、P 1 と重複し芳香族性残基が末端であるため、トリプシン調製物の微量のキモトリプシン混入により生じたと推定される。多くの二重-荷電非リン酸化 N D R 1 ペプチド (配列番号：2 のアミノ酸 3 7 8 - 3 9 1) を、m/z 8 6 0 として検出した。

30

40

【0065】

N D R 1 ポリペプチドの 3 つの領域から誘導されるリン酸化ペプチド P 1 - P 4 (それぞれ、配列番号：2 のアミノ酸 2 7 7 - 3 0 1、2 7 7 - 2 9 4、4 3 8 - 4 4 7 および 7 2 - 7 8) を、N d r 1 完全長配列に関する番号付けにしたがい示したホスホアクセプター残基としてまとめた。

【表 1】

ペプチド	配列	予測質量 (Da)	検出質量 (Da)	相違 (Da)
P1	QLAFS ²⁸¹ TVGTPDYLAPEVFMQTGYN K	2778, 1	2858, 8 (+/-1, 1)	+80, 7
P2	QLAFS ²⁸¹ TVGTPDYLAPEVF	1955, 2	2034, 6 (+/-0, 7)	+79, 4
P3	DWFINYT ⁴⁴⁴ YKR	1504, 7	1585, 8	+81, 1
P4	KET ⁷⁴ EFLR	922, 0	1001, 8	+79, 8

10

【0066】

未処理 GST-NDR1 を $m/z - 79$ の前駆体イオンスキャンにより分析した場合、ペプチド P2 および P4 に対応する弱いリン酸化シグナルのみを検出することができた。しかしながら、Ca²⁺/S100B の非存在下または存在下のどちらで自己リン酸化された GST-NDR1 試料では、多量のリン酸化ペプチドが明らかに増加した。ほとんどのこれらのシグナルの観察された m/z 値は、両方の試料にて、リン酸基 (79.97 Da) を遊離させる際に、期待されるトリプシン性 (または、一例としてキモトリプシン性) NDR1 脱リン酸化ペプチドを生じる 4 つの NDR1 誘導リン酸化ペプチド P1 - P4 とした。

20

【0067】

これらのペプチドの同一性を確認するため、[ガンマ-³²P] ATP での GST-NDR1 の自己リン酸化の LC-MS 分析を行った。リン酸化ペプチドに富む放射活性画分を収集した後、試料を $m/z - 79$ 前駆体イオンスキャン法を用いて ESI 質量測定器により分析した。標識されていない GST-NDR1 の分析にて同じ種が発見され、その後、低エネルギー・タンデム質量 (MS/MS) 分析をポジティブイオン法にて行った。上記に一覧としたリン酸化ペプチドに対応するイオン種 (リン酸化された残基を含む) が検出され、よって NDR1 インビトロ自己リン酸化部位の同一性を確認した。

【0068】

前記 4 つのリン酸化ペプチドを、NDR1 ポリペプチドの 3 つの領域から誘導した。最初の 3 つは、オカダ酸によりインビボにて活性化された NDR1 において先に同定された部位に対応する。P1 および P2 は、活性断片の Ser281 を含むリン酸化ペプチドを示し、P3 は、NDR1 のカルボキシル末端領域に位置する疎水性モチーフ由来の残基 Thr444 を含むリン酸化ペプチドを示す (EP1097989、表題「Ndr ホスホキナーゼ」を参照)。前記リン酸化ペプチド P4 は、アミノ酸 62-83 を包含する S100 結合領域として定義されている NDR1 の N 末端領域ではこれまで同定されていないリン酸化残基である Thr74 を含む (Millward et al., 1998)。

30

【0069】

故に、本実施例は、インビトロにおける 3 つの残基の NDR1 自己リン酸化を示す。その第一番の Thr74 は、NDR1 の N 末端 S100B 結合ドメインに位置する。第二番目、主な部位である Ser281 (すべての AGC 群のキナーゼによく保存されている) は、NDR1 の核局在化シグナルおよびキナーゼドメイン・インサートのすぐ後ろのキナーゼ触媒ドメインのサブドメイン V111 中の活性断片 (「T-ループ」としても知られる) の必須部分を構成する。第三の部位である Thr444 もまた、AGC スーパーファミリー中に保存されており、疎水性アミノ酸残基に富む領域 (故に、「疎水性モチーフ」と呼称する) 内にてキナーゼ触媒ドメインの外側に位置する。

40

【0070】

実施例 2 : GST-リン酸化部位変異体における自己リン酸化割合およびキナーゼ活性の低下

インビトロでの NDR1 の残基 Thr74、Ser281、および Thr444 におけ

50

る自己リン酸化を確認するため、ならびにNDR1の自己リン酸化誘導キナーゼ活性におけるこれらの残基の影響を評価するために、リン酸化部位残基をアラニンで置換するか、または触媒部位中のLys118をアラニンで置換して一連のGST-NDR1変異体を構築し、GST-NDR1キナーゼ不活性変異体を形成した。これらを、自己リン酸化およびキナーゼ活性について分析した。

【0071】

簡潔には、1マイクログラムの精製されたGST-NDR1（溶液中、～0.5マイクロモル）野生型、キナーゼ不活性（K118A）、リン酸化残基Thr74、Ser281、およびThr444のアラニン変異体を、さらなる付加物なしにか、または1mM CaCl₂ および10マイクロモル ウシS100Bの存在下でインビトロにて2時間リン酸化した。タンパク質を、クマシー・ブルーR-350染色したSDS-PAGEゲルを用いてSDSゲル上で可視化し、そして[ガンマ-³²P]ATP-標識タンパク質を、PhosphorImagerスクリーニング上に作成したゲルの自己リン酸化により可視化した。取り込まれた³²Pの量を、チェレンコフ計測により定量した。

10

【表2】

	野生型	K118A	T74A	S281A	T444A
-S100B	0,1688	0,0076	0,158	0,0192	0,1232
+S100B	0,3512	0,0064	0,2072	0,028	0,2412
SD1	0,0244	0,0032	0,0304	0,012	0,0176
SD2	0,0332	0,0028	0,0164	0,0032	0,0112

20

【0072】

GST-NDR1変異体の特異的活性もまた、上記のようにしてペプチドキナーゼ分析により測定した。本目的のために、1マイクログラムの精製したGST-NDR1野生型およびアラニン変異体を、さらなる処理なしに、または1mM CaCl₂ および10mMウシS100Bの存在下または非存在下で2時間自己リン酸化させた。

【表3】

	野生型	K118A	T74A	S281A	T444A
コントロール	1	0,158	1,006	0,16	0,564
-S100B	4,106	0,272	3,786	0,514	1,92
+S100B	21,348	0,222	7,818	0,952	3,974
SD1	0,052	0,062	0,162	0,078	0,144
SD2	0,36	0,092	0,172	0,18	0,082
SD3	0,926	0,124	0,552	0,108	0,412

30

【0073】

野生型GST-NDR1は、インビトロで効率的に自己リン酸化されるようになり（0.4ピコモルATP／ピコモルGST-NDR1まで）、そのためS100Bホモ二量体の付加が、（Ser281およびThr444の両方における）自己リン酸化の約2倍の増加をもたらし、同時にキナーゼ活性の5倍の増加をもたらした。キナーゼ不活性変異体が、検出可能な自己リン酸化を示さなかったため、NDR1キナーゼ活性が、観察される効果の主な原因であると考えられる。S281A変異体は、（S100Bの添加に関わりなく）劇的に低下した自己リン酸化割合を示し、故に、この残基が、インビトロにおけるNDR1の主な自己リン酸化部位であることを確認した。S281Aのキナーゼ活性は、同じく低下し、ほとんど検出不可能になった。

40

【0074】

50

T 4 4 4 A 点変異はまた、S 2 8 1 A と同程度ではないが、自己リン酸化割合およびキナーゼ活性両方の顕著な低下（約 5 倍）をもたらし、T 4 4 4 もまた、インビトロにおける自己リン酸化を受けやすいことを示した。理論に縛られることを望んでいないが、S 2 8 1 A 変異との比較として顕著ではない T 4 4 4 A の効果が、好ましくない、たった 2 つの離れた塩基性アミノ酸を有する疎水性ペプチド配列上流のこの残基により容易に説明され得る。

【0075】

最後に、T 7 4 A 変異体は、C a 2 + / S 1 0 0 B の非存在下における自己リン酸化割合およびキナーゼ活性のごくわずかな低下のみを示した。L C - M S による定量分析によれば、この部位のリン酸化は、全リン酸取り込みの 5 % 未満を占める。しかしながら、C a 2 + / S 1 0 0 B の添加後、この点変異の影響は T 4 4 4 A の影響に近づき、そして自己リン酸化割合およびキナーゼ活性における C a 2 + / S 1 0 0 B の刺激効果が、他の G S T - N D R 1 種と比較して大きく低下した。これらの結果は、T h r 7 4 が少ない自己リン酸化部位しか関係していないことを示し、そして C a 2 + / S 1 0 0 B の付加に対する低い反応性が、T 7 4 A 変異体と S 1 0 0 B の相互作用ができないことを最も反映しているようである。

【0076】

故に、変異分析は、N d r 1 の S e r 2 8 1 残基は、自己リン酸化された N D R 1 中のリン酸取り込みの大部分に関与し、一方、T h r 7 4 および T h r 4 4 4 は、取り込まれたリン酸の少ない部分を占めることを示している。さらに、S e r 2 8 1 の変異は、N D R 1 自己リン酸化誘導キナーゼ活性の劇的な低下をもたらし、故に、この残基が、主な N D R 1 自己リン酸化部位であることが確認された。しかし、この結果は、S e r 2 8 1 および T h r 4 4 4 の両方が十分に活性な N D R 1 に必要であることを示唆し、N D R 1 の活性化におけるこれらの 2 つの残基間の相乗効果を示している。

【0077】

実施例 3 : C a 2 + / S 1 0 0 B は、T h r 7 4 リン酸化を経て、S e r 2 8 1 と T h r 4 4 4 の両方における G S T - N D R 1 の自己リン酸化を促進する

N D R 1 リン酸化状態における S 1 0 0 B の効果を正確に定量するために、ウサギポリクローナル抗体を、S e r 2 8 1 または T h r 4 4 4 を含むリン酸エピトープに対して作製した。G S T - N D R 1 変異体を、基本的には実施例 2 に記載のように処理し、そして S e r 2 8 1 または T h r 4 4 4 にてリン酸化された N D R 1 を認識する抗 N D R 1 - C 末端抗血清またはポリクローナル抗体のどちらかで検出した。これらの抗体は、対応するリン酸の点変異体 S 2 8 1 A もしくは T 4 4 4 A、またはキナーゼ不活性体を認識しないため、リン酸化 N D R 1 に排他的に特異性を有する。

【0078】

これらの試薬を用いて、C a 2 + / S 1 0 0 B は、どちらの残基にも優先性を示すことなく、S e r 2 8 1 および T h r 4 4 4 両方におけるリン酸化を増大することを発見した（実施例 2 にて見られる自己リン酸化の全体的な増加に類似）。一方、S 2 8 1 A 変異は T h r 4 4 4 における自己リン酸化を完全になくし、T 4 4 4 A 変異体は、S e r 2 8 1 におけるほぼ正常な自己リン酸化を示した。T h r 4 4 4 は、わずかな範囲でのみリン酸化されるが、これらのデータは、N D R 1 キナーゼ活性における活性化断片リン酸残基の影響が、疎水性モチーフ残基の影響よりも大きいこと、またはこれらの残基が、他の A G C ファミリータンパク質キナーゼのほとんどで既知の連続的方法にてリン酸化されることを示している（Newton, A. C. (2001) Chem.Rev. 101, 2353-2364）。最後に、T 7 4 A 点変異は、内因性 N D R 1 自己リン酸化を活性化することなしに、S e r 2 8 1 および T h r 4 4 4 残基の両方の S 1 0 0 B を介したリン酸化の増大をなくし、S 1 0 0 B との相互作用におけるこの残基の重要な役割をまた強調する。

【0079】

実施例 4 : インビボで S e r 2 8 1 は、主なリン酸化残基であり、一方 T h r 4 4 4 は、上流キナーゼにより標的化される

10

20

30

40

50

インビボでのNDR1のキナーゼ活性における個々のリン酸化部位の相対的な影響を判定するため、本発明者らは、3つの同定されたリン酸化部位に、HA標識したNDR1野生型、キナーゼ不活性化体、そしてアラニン変異体を有する一連の哺乳動物発現ベクターを構築した。

野生型HA-NDR1か、またはその記載した変異体のどちらかを発現するCOS-1細胞を、1マイクロモル オカダ酸または溶媒のみで1時間処理した。その後、HAタグ標識したNDRキナーゼ変異体を、(100マイクログラムの界面活性剤抽出物から) 12CA5モノクローナル抗体で免疫沈降し、そして上記のようなペプチドキナーゼ分析によりキナーゼ活性について分析した。

【表4】

	野生型	K118A	T74A	S281A	T444A
-OA	0,3532	0,0107	0,124	0,0357	0,1067
+OA	10,8852	0,0204	1,053	0,1113	0,6019
SD1	0,0499	0,005	0,0149	0,0013	0,0232
SD2	1,6629	0,0131	0,1455	0,0177	0,1361

10

【0080】

Ser281およびThr444である2つの確立されたインビボ調節リン酸化部位における点変異は、未処理COS-1細胞および1マイクロモル オカダ酸処理したCOS-1細胞の両方におけるNDR1キナーゼ活性の予期される低下をもたらした(S281A変異体に対して幾分優先的に)。しかしながら、GST-NDR1キナーゼ分析とは異なり、HA-NDR1キナーゼ活性の劇的な低下が、Thr74変異後に検出された。このことは、Thr74依存性のS100Bを介する自己リン酸化が、インビボにて重要な役割を果たし得ることを示す。

20

【0081】

この可能性を検討するため、形質転換したCOS-1細胞からの抽出物を、抗Ser281Pおよび抗Thr444P抗血清で分析した。形質転換したCOS-1細胞からのタンパク質抽出物(10マイクログラム)を、12CA5で免疫ブロットし、それぞれのHA-NDR1構築物が同様の発現レベルであることを確認した。リン酸化状態の分析に関し、(100マイクログラムのタンパク質抽出物から) 12CA5で免疫沈降したHA-NDR1変異体を、P-S281またはP-T444に対するリン酸化特異的抗体で免疫ブロットすることにより分析した。

30

【0082】

前記Ser281残基は、インビボにて構成的にリン酸化されており(また、このリン酸化はさらに、1mM オカダ酸での処理後に増大された)、一方、Thr444部位は、オカダ酸での処理後にのみリン酸化された。前記Ser281のリン酸化は、キナーゼ不活性化K118A変異体が、この部位におけるリン酸化を示さないことから、全体的にNDR1の活性に依存する。この事実は、Ser281が、インビボでもまた自己リン酸化残基されることを示す。このことは、オルトリン酸塩代謝のインビボ標識により確認された。しかしながら、Thr444の変異は、Ser281のリン酸化を減じることなく、そのことは、NDR1自己リン酸化のためのこの残基の低い重要性をさらに示している。しかしながら、Thr444残基は、キナーゼ不活性化変異体K118AにおけるNDR1のキナーゼ活性をなくした後でもリン酸化され、上流キナーゼの標的として関与している。最後に、残基Thr74の変異は、Ser281およびThr444両方のリン酸化の著しい低下をもたらしており(オカダ酸処置の有無のどちらにおいても)、キナーゼ活性データと一致している。このことは、Thr74が、S100Bを介するNDR1の自己リン酸化のみでなく、NDR1に対する上流キナーゼの標的化にも関係することを示す。

40

50

【0083】

実施例5：Ser 281とThr 444の両方のリン酸化は、Ca²⁺依存的な方法にて起こる

Ca²⁺/S100Bが、インビボにおけるNDR1活性およびインビトロにおけるSer 281およびThr 444での効率的なNDR1自己リン酸化の両方に不可欠であり、かつS100B-NDR1相互作用が、完全にCa²⁺依存性であることが既知であるため（Millward et al., 1998）、本実施例では、NDR1の活性化、すなわち、Ser 281またはThr 444、もしくは両方のNDR1のリン酸化における内生Ca²⁺の役割を調査する。本目的のために、細胞に自由に取り込まれ、細胞質エステラーゼにより加水分解され、活性な膜透過性Ca²⁺キレート化剤であるBAPTAとして細胞内に捕捉される膜透過性物質であるBAPTA-AMで、COS-1細胞を形質転換する（TaylorとBroad,1998, Trends Pharmacol.Sci. 19, 370-375）。 10

【0084】

偽形質転換した（Mock-transfected）COS-1細胞またはHA-NDR1を発現するCOS-1細胞を、1mM OA、50マイクロモル BAPTA-AM、および20mM タブシガルギンまたは溶媒（0.1% DMFまたは0.1% DMSO）のみで1時間処理した。その後、（100マイクログラムタンパク質抽出物からの）12CA5免疫沈降物を、NDR1キナーゼ活性のペプチドキナーゼ分析を用いて分析した。

【表5】

	-0-B-T	+0-B-T	-0+B-T	+0+B-T	+0+B+T
特異的活性	0,5738	10,142	0,2676	1,14503	7,43613
SD	0,06203	1,21575	0,0328	0,14243	0,89176

20

【0085】

偽形質転換したCOS-1細胞およびHA-NDR1で形質転換したCOS-1細胞からのタンパク質抽出物（10マイクログラム）もまた、12CA5で免疫ブロットし、HA-NDR1構築物の同等の発現レベルを確認した。リン酸化状態の分析に関して、（100マイクログラムタンパク質抽出物から）12CA5で免疫沈降したHA-NDR1を、P-S281またはP-T444に対するリン酸化特異的抗体を用いた免疫ブロットにより分析した。 30

【0086】

50mM BAPTA-AMは、オカダ酸で刺激したNDR1活性をオカダ酸で刺激していない細胞のほぼ基本的活性レベルまで劇的に低下する。同様に、NDR1のリン酸化状態の調査により、Ser 281およびThr 444の両方のリン酸化が、ほぼ基底値まで低下したことを実証した。とりわけ、NDR1活性ならびにSer 281およびThr 444のリン酸化は両方とも、BAPTA-AMと20mM タブシガルギン（筋小胞体性小胞体Ca²⁺・ATPase（SERCA）ポンプの阻害により、すなわち、細胞内Ca²⁺貯蔵の遊離を介することにより細胞質Ca²⁺を上昇するセスキテルペン・ラクトンである）の共インキュベーションにより減少した（Treiman et al.,1998, Trends Pharmacol.Sci. 19, 131-135）。これらの結果は、観察されたBAPTA-AM効果のCa²⁺特異性を支持しており、上述のデータと合わせて、NDR1が、Ca²⁺に依存した、おそらくSer 281のS100Bを介した自己リン酸化により、および未だ同定されていないThr 444のCa²⁺依存性上流キナーゼによるリン酸化により制御されることが示された。 40

【0087】

まとめると、Ser 281におけるNDR1の自己リン酸化、ならびにThr 444における上流キナーゼによるリン酸化は両方とも、Ca²⁺依存性の過程である。Ca²⁺/S100Bの付加により、Ser 281およびThr 444にて増加したリン酸化が観察され、それはNDR1活性の刺激を生じる結果となった。前記Ca²⁺キレート化剤であ 50

るBAPTAMは、Ser281およびThr444の両方におけるNDR1の活性およびリン酸化を抑制し、そして特に、これらの効果は、SERCA Ca²⁺ポンプインヒビター・タプシガルギンの付加により無くなった。理論に縛られることを望まないが、Ser281におけるNDR1の自己リン酸化のCa²⁺依存性は、自己リン酸化を効率的にするためにNDR1がCa²⁺/S100Bを必要とすることにより、容易に説明することができる。

【0088】

実施例6：Thr74は、HA-NDR1とCa²⁺/S100Bの結合に必要とされるNDR1は、完全なNDR1のN末端ドメインに依存してインビボでS100Bを有する機能的複合体を形成する(Millward et al., 1998)。本実施例では、NDR1のリン酸化状態に依存する結合を実証する。COS-1細胞を、S100B、NDR1野生型またはアラニン変異体発現プラスミドで形質転換し、そしてNDR1-S100B相互作用を、NDR1とS100Bの共免疫沈降により観察した。

10

【0089】

COS-1細胞を、HA-NDR1野生型、キナーゼ不活性体(K118A)、およびリン酸化残基Thr74、Ser281、またはThr444のアラニン変異体、ならびにS100B、または示された対応する空ベクターで形質転換した。48時間後、非洗浄の細胞核および細胞質性細胞溶解物を調製し、集め、そしてHA-NDR1種の発現について分析した。1mgのタンパク質抽出物をさらに、抗S100B-セファロースで免疫沈降し、そしてS100B発現および抗S100B免疫沈降物とNDR1の結合について分析した。

20

【0090】

NDR1-S100B複合体の形成は、NDR1キナーゼ活性または調節残基Ser281およびThr444のリン酸化状態に依存的でなく、故に、構成的であると見なされる。しかしながら、Thr74(少ないインビトロ自己リン酸化部位)が、Ca²⁺/S100Bとの相互作用を起こすためにNDR1に必須であるように思われる。NDR1のN末端ドメインは、S100Bまたは他の可能性のある相互作用タンパク質の結合により軽減され得るキナーゼ触媒ドメインにおける自己阻害効果に影響を及ぼすようである。

【0091】

実施例7：NDR2タンパク質キナーゼの分子特性

30

本実施例は、NDR2タンパク質キナーゼの同定および分子特性を記載する。NDR1およびNDR2は、86%のアミノ酸の同一性を有する異性体形であり、ヒトおよびマウス間で高く保存されている。前記データは、NDR2がオカダ酸処理により強く活性化され、結果として、Ser-282およびThr-442におけるリン酸化を生じることを示す。NDR2はまた、EFハンド カルシウム結合S100Bタンパク質により制御されることが示される。インビトロにて、S100Bは、Ser-282およびT442におけるNDRタンパク質キナーゼの自己リン酸化を誘導する。

【0092】

NCBIデータベースのBLAST検索により、ヒトKIAA0965 mRNA (Genbank 受入番号AB023182クローンhj06174s1)を、ヒトNDR1タンパク質キナーゼと顕著な相同性を有する不完全cDNAとして同定した。完全なcDNAを、標準的なプロトコル(www.clontech.com, PT1156-1)に従い、Marathon-Readyヒト脳cDNAライブラリー(Clontech)のPCRスクリーニングにより単離した。マウスNdr1cDNAを、標準的なプロトコル(www.clontech.com, PT 1156-2)に従い、λZAPII(Stratagene)、3'mESTを有するマウスNdr2cDNA(genebank受入番号AA277870)中のいくつかのマウスcDNAライブラリーをスクリーニングし、タッチダウン法によりマウス脳ライブラリー由来の5'末端(Clontech)をサブクローニングすることによりクローニングした。すべてのクローンを、Sequenase(United States Biochemical)および慣習的な合成プライマーを用いて良好の両方鎖を完全にシーケンスし、ゲノムデータベース(Ensembl)と比較した。

40

50

【0093】

HA-エピトープ標識したhNdr1をコードする哺乳動物発現ベクターを、実施例1に記載する。HA-hNdr2の発現ベクターを、それぞれ標識していないcDNAとプライマー5'-CTTCCAAGCTTAGTCGACATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGA-3' (配列番号: 23) および5'-TTACGCTTCGGCAATGACGGCAGGGACTACAAACAACC-3' (配列番号: 24) ならびに5'-GGATCCTCTAGAGGTATGGGTGAATGTTATCTTCATAAATTCC-3' (配列番号: 25) でPfuポリメラーゼ (Promega) を用いて増幅することにより構築し、その後PCR産物を、HindIIIおよびXbaIで切断し、pCMV5中にクローニングした。GST-Ndr2およびGFP-Ndr2を、Ndr2 cDNAとプライマー5'-CGGGATCCGGTACCAATGGCAATGACGGCAGGGACTAC-3' (配列番号: 26) および5'-CGGGATCCCTTCATTCTAATACTTCCCAAGC-3' (配列番号: 27) でPfuポリメラーゼ (Promega) を用いて増幅することにより構築した。その後PCR産物を、BamHIで切断し、pGEX2T (Smith, D.B. および Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase Gene 67 (1), 31-40) およびpEGFP-C1 (Clontech) 中にクローニングした。その後、挿入の方向を、KpnI切断およびシーケンシングにより検査した。GFP-Ndr1を、Ndr1 cDNAとプライマー5'-AGCAGGATCCGGTACCAATGGCAATGACAGGGCTCAACACCTTGC-3' (配列番号: 28) および5'-CGAGGATCCTGCTCCACATAGGATTCCTGGGCAAGAG-3' (配列番号: 29) でPfuポリメラーゼ (Promega) を用いて増殖することにより構築し、そしてpEGFP-C1 (Clontech) 中にクローニングし、シーケンシングにより検査した。GFP-Ndr2を、基本的に同様の方法にて構築した。

【0094】

すべての他の方法 (細菌性発現、キナーゼ分析、免疫検出および質量スペクトル分析を含む) を、基本的には上述の方法部分に記載したように実行した。

【0095】

NDRキナーゼ サブファミリーの配列を調べるために、hNdr2、mNdr1の配列およびmNdr2 cDNAおよび遺伝子配列を決定した。推定アミノ酸配列を比較し、hNDR1、キイロショウジョウバエNDR TRC、線虫NDR Sax-1および酵母CBK1の既知の配列に対して位置合わせした。ヒトおよびマウスNDR1配列は、99%の同一性を示し、NDR2配列は97%の同一性を示し、一方、NDR1およびNDR2は86%の同一性を示す。ヒトNdr2は、進化の過程において、キイロショウジョウバエ、線虫および酵母とそれぞれ68%、67%および47%の同一性を有する高い保存性を示す。ヒトおよびマウスNDR2は、464アミノ酸長であり、推定質量54.0 kDaを有する。遺伝子マッピングにより、hNdr1およびmNdr1、ならびにhNdr2およびmNdr2が、オーソログ領域に位置することが示される。hNdr1は、6p21にマッピングされ (Tripodis N. et al.)、hNdr2は12p12.3にマッピングされるが、一方、対応するマウス遺伝子は、17B1および6G2-G3にマッピングされる。さらにNdr2の偽遺伝子が、マウスゲノムの染色体1Dおよび8A1.2にて発見された。イントロン-エキソン境界は、すべてのヒトおよびマウス遺伝子に保存されている。ヒトおよびマウス遺伝子は、保存されたイントロン-エキソン境界を有する14エキソンを含む。エキソン1は、5' UTRを含む非コードエキソン; エキソン2は、開始コドンを含む; そして終止コドンは、エキソン14に位置する。

【0096】

NDR2とNDR1の配列の比較は、NDR2が、NDR1リン酸化部位であるSer-281およびThr-444に対応するSer-282およびThr-442を含むことを示し (Millward et al.)、そのことは、NDR2活性が、NDR1と同様に制御さ

れることを示唆する。さらに調べるため、S e r - 2 8 2 または T h r - 4 4 2 のどちらかをアラニンにより置換された N D R 2 変異体を作製した。さらに、インビトロにおけるリン酸化部位変異体 T 7 5 A は基本的に上記した通りであり、キナーゼ不活性化変異体 K 1 1 9 A は、N d r 2 について作製した。これらの変異体のそれぞれのタンパク質キナーゼ活性を、オカダ酸 (O A) または溶媒のみで処理した細胞にて測定した。H A - N D R 2 - W T は、O A により強力に刺激された (~ 1 0 倍)。すべてのリン酸化部位変異体 (S 2 8 2 A、T 4 4 2 A および T 7 5 A) は、基底活性を顕著に減少したが、未だ活性化されていた。K 1 1 9 A 変異体は、基底活性を検出されない程度のレベルまで低下させ、O A によりいかなる活性化も示さなかった。

【0097】

N D R 1 の S e r 2 8 1 および T h r 4 4 2 に対して作製したリン酸化部位特異的抗体を用いた、制御リン酸化部位変異体 S 2 8 2 A および T 4 4 2 A のウェスタンブロッティング分析は、N D R 2 w t (野生型)、ならびに T 4 4 2 A 変異体および T 7 5 A 変異体の S e r 2 8 2 のリン酸化を示し、そして、このリン酸化は、N D R 2 w t および T 4 4 2 A では O A 処理後に増加するが、T 7 5 A では増加しない。キナーゼ不活性化 K 1 1 9 A 変異体は、S 2 8 2 でリン酸化されない。T 4 4 2 は、N D R 2 w t、ならびに S 2 8 2 A 変異体、T 7 5 A 変異体および K 1 1 9 A 変異体の O A 処理にてリン酸化される。このことは、N D R 1 の対応する変異体について上記の通りであった。ウェスタンブロッティング分析により、w t および変異体が、同じレベルで発現されることを確認した。これらの結果により、活性ループのリン酸化部位 2 8 2 および制御疎水性モチーフのリン酸化部位 T 4 4 2 の両方におけるリン酸化が、N D R 2 活性に必要であることが確認された。

【0098】

N D R 1 および N D R 2 間の配列保存はまた、上記の N D R 1 の S 1 0 0 結合ドメインを包含する。故に、インビトロでの N D R 2 活性における C a 2 + / S 1 0 0 B の影響を、時間および濃度に依存的な方法で測定した。C a 2 + / S 1 0 0 B は、4 時間インキュベーション後、マスマスペクトル分析による測定して N D R 2 自己リン酸化の割合を ~ 2 倍に増加させ、そして濃度依存的な方法で特定の N D R 2 活性を ~ 4 倍まで刺激した。このことは、N D R 2 が、N D R 1 と同様の方法で C a 2 + / S 1 0 0 B により活性化されることを示す。C a 2 + / S 1 0 0 B の存在下および非存在下における G S T - N D R 2 のインビトロでのインキュベーション後、前記タンパク質をトリプシンで切断し、生じた混合物を、- 7 9 前駆体スキャン中 E S I - M S - M S により分析し、断片化後の単一のリン酸基を遊離するすべてのペプチド種の質量変化率 (m / z) を測定した。5 N D R 2 誘導リン酸ペプチドの同一性を、両方の試料、G S T - N D R 2 および G S T - N D R 2 / C a 2 + / S 1 0 0 B にて測定することができた。

【表 6】

検出されたリン酸化ペプチド	m/z (amu)	NDR2 a. a (配列番号: 4)
[M-2H]2-QLAYSTVGTPDYIAPEVF	1024	277-294
[M-3H]3-QLAYSTVGTPDYIAPEVFMQTGYNK	957	277-301
[M-3H]3-QLAYSTVGTPDYIAPEVF	683	277-294
[M-2H]2-DWVFLNYTYKR	791	434-444
[M-2H]2-RKTEFL	500	73-78

【0099】

これらのペプチドのうち 3 つは、S e r - 2 8 2 リン酸化部位を含む、活性化に対応する領域 (または N D R 2 の T - ループ) から誘導される。4 番目のリン酸ペプチドは、制御リン酸化部位である T h r - 4 4 2 を含む N D R 2 ポリペプチドのカルボキシ末端領域に由来し、5 番目の S 1 0 0 B 結合ドメイン内部位である、T h r - 7 5 に対応する。これらの結果は、N D R 1 と同様の方法にて、N D R 2 が S 1 0 0 B タンパク質により制御されることを実証する。

10

20

30

40

50

【0100】

実施例8：ヒトNDRは、hMOB1（GI：11691898）と相互作用する

HAタグ標識したhNDRおよびmycタグ標識したhMOB1を、COS1細胞中に共トランスフェクションし、それをオカダ酸または溶媒のみで刺激した。細胞を溶解し、抽出物を調製後、HA-NDRを、免疫沈降し、共免疫沈降したmyc-hMOB1を検出するか、またはMyc-hMOB1を免疫沈降し、共免疫沈降したHA-NDRを検出した。myc-hMOB1とHA-NDRの共免疫沈降、ならびにHA-NDRとmyc-hMOB1の共免疫沈降により、MOB1がNDRと結合し得、そしてこの相互作用がOAによる細胞の刺激に依存することが明らかとなった。

【0101】

この相互作用がPP2A-インヒビターとNDRアクチベータであるOAによる刺激に依存するために、本発明者らは、前記相互作用がNDRキナーゼ活性に依存するかどうかを試験した。HA-NDR、wtおよび変異体、ならびにmyc-hMOB1を、COS1細胞に共トランスフェクションし、前記細胞を溶解前にOAで処理した。HA-NDRを免疫沈降し、そして共免疫沈降したmyc-hMOB1を検出した。ATP結合部位にて触媒性リシンを変異されたキナーゼ不活性化変異体K118Aは、オカダ酸刺激後も未だhMOB1と相互作用し得る。さらに、NDRの2つの主要なインビボリン酸化部位である、活性断片中のセリン-281およびC末端制御ドメイン内の疎水性モチーフ部位であるスレオニン-444、ならびにN末端制御ドメインのスレオニン-74を、NDR-MOB相互作用におけるそれらの役割について試験した。OA刺激後も、変異体S281AおよびT444AはMOB1と相互作用するが、一方T74A変異体は、MOB1との相互作用が完全でないことを示した。

【0102】

内生NDRとhMOB1が相互作用するかどうかを試験するため、myc-hMOB1を、COS1細胞にトランスフェクションし、トランスフェクション16時間後OAまたは溶媒のみで処理し、その後溶解した。その後、Myc-hMOB1を、プロテインGセファロースと連結した9E10抗体で免疫沈降し（Evanら、Isolation of monoclonal antibody specific for human c-myc proto-oncogene product. Mol. cell. Biol. 5: 3610-3616, 1985）、対照として、プロテインGセファロースビーズのみで免疫沈降した。その後、共免疫沈降した内生NDRを、モノクローナル抗NDR抗体で検出した。内生NDRが、OA刺激依存的方法でmyc-mobと相互作用することが分かった。

【0103】

まとめると、これらの結果は、NDRが、キナーゼ活性ではなくオカダ酸刺激依存的方法でhMOB1と相互作用し、そして、NDRのN末端制御ドメイン内の残基T74が、この相互作用に重要な役割を果たすことを示す。

【0104】

実施例9：hMOB1は、NDRキナーゼ活性を刺激する

hMOB1が、NDR活性にて役割を果たすかどうかを試験するために、myc-hMOB1または空ベクターをCOS1細胞内にHA-NDR1と一緒に共トランスフェクションし、そしてOAで処理した。その後、12CA5免疫沈降物をHA-NDRキナーゼ活性についてペプチドキナーゼ分析を用いて分析した。その結果、OA刺激されたNDRキナーゼ活性の2～3倍刺激が明らかとなり、NDR活性におけるhMOB1の役割を示す。GST-MOBおよびGSTをそれぞれ免疫沈降したHA-NDRに付加し、そしてキナーゼ反応を行った。前記反応物を、10% SDS-PAGEで分離し、そして、phosphoimagerを用いて放射活性を可視化した。GST-hMOB1のHA-NDRキナーゼ反応物への付加は、NDR自己リン酸化活性を刺激した。

【0105】

実施例10：NDRのN末端ドメインは、キナーゼ活性化に重要である

本実施例は、キナーゼ活性化におけるN末端ドメインの重要性を説明するものである。N末端の高度に保存されている残基のアラニンへの点変異は、OA刺激されたキナーゼ活

10

20

30

40

50

性の強力な阻害を誘導する。アルギニン41、アルギニン44またはロイシン48のアラニンへの変異は、すべて、アミノ酸40～55にまたがる予測される第1のアルファヘリックスに位置し、アルファヘリックスの同じ側に共に近接して位置しており、野生型の活性の20%以下にキナーゼ活性を低下する。予測される第2のアルファヘリックス内の残基は、アミノ酸60～80にまたがるNDRのS100B結合領域内に位置し、またキナーゼ活性の阻害を導く。リシン72、グルタミン酸73、スレオニン74、アルギニン78またはロイシン79のアラニンへの変異は、20%またはそれ以下にキナーゼ活性を低下する。アミノ酸1～33にまたがり、そしてhNDR内の予測されるベーターシートを含むN末端ドメインの第一の部分はまた、キナーゼ活性化に重要であることが明らかとなった。最初の30アミノ酸の欠失は、キナーゼ活性化を完全になくす。この領域における点変異は、同様にキナーゼ活性を強力に低下し、スレオニン16、グルタミン酸18およびグルタミン酸28の変異は野生型の約40%のキナーゼ活性に終わり、そしてリシン24およびチロシン31の変異は野生型の20%のキナーゼ活性に終わった。これらの結果は、キナーゼ機能におけるNDRファミリー活性ドメイン(NFAD)の高度に保存されている残基に関する重要な役割に関係があることを示す。

10

【0106】

実施例11：NDRファミリー活性化ドメインで(NFAD)は、NDR-MOB相互作用を必要とする

本実施例は、T74がNDRキナーゼ活性およびS100Bとの相互作用に重要であるのみならず、NDR-mob相互作用に必要であることを実証するものである。HA-NDR N末端点変異体およびmyc-mob1をCOS1細胞に共トランスフェクションし、それをOAで処理した後に溶解した。HA-NDR変異体を免疫沈降し、そして共免疫沈降したmyc-hMOB1を検出した。HAタグ標識したNDR変異体およびmyc-hMOB1の共トランスフェクション、およびその後のmyc-MOBとHA-NDRの共免疫沈降は、キナーゼ活性化に重要ないくつかの保存された残基が、同様に、NDR-MOB相互作用に必要であることを明らかにした。チロシン31、アルギニン41、スレオニン74またはアルギニン78のアラニンへの置換は、試験した条件下で、MOBとの相互作用に認容性がなく、一方、リシン24、アルギニン44およびロイシン79変異体は、低下した相互作用を示した。強力に低下したキナーゼ活性を有する変異体うち3つのみが、MOB結合能における低下を有さなかった：アルギニン48、リシン72およびグルタミン酸73。これらをまとめると、前記結果は、NFADがNDR-hMOB1相互作用に重要であることを示している。

20

30

【0107】

実施例12：NDR-hMOB1相互作用は、オカダ酸が誘導するMOB1の変形に依存するが、一方、NDRにおけるオカダ酸が誘導するリン酸化は必要なかった

本実施例は、NDR-hMOB1相互作用のOA依存性が、NDRまたはhMOB1のOA誘導修飾に（または細胞のOA処置に）依存するかどうかの疑問を解決する。COS1細胞を、HA-NDRおよびmyc-hMOB1で別々にトランスフェクトし、そしてOAで刺激するか、または刺激せずに溶解した。その後、溶解物（HA-NDRまたは+OAとmyc-hMOB1もしくは+OA）を集め、抗HA抗体で免疫沈降し、そしてmyc-mob1を検出した。OA処理した細胞のmyc-MOBを含む2つの組合せにて、myc-MOBは、OA処理した細胞または刺激していない細胞に由来するかどうかに関わらず、HA-NDRと強く結合した。刺激していない細胞のMyc-mobは、刺激していない細胞および同様にOA刺激した細胞のHA-NDRと弱い相互作用を示すのみであった。故に、本発明者らは、NDRのOA誘導修飾がmobとの相互作用に必要なが、一方、hMOB1 OA修飾が必要であることを結論付け得る。

40

【0108】

実施例13：Ca²⁺キレート化剤であるBAPTAMは、NDR-MOB相互作用を低下する

Ca²⁺キレート化剤であるBAPTAMでのCOS1細胞の処理は、OA誘導N 50

D Rキナーゼ活性化を低下した。本実施例にて、N D R－M O B相互作用におけるB A P T A－A MでのC O S 1細胞の処理の効果を測定した。H A－N D Rおよびm y c－M O B 1を、C O S 1細胞に共トランスフェクションし、前記細胞をB A P T A－A MおよびO Aもしくは溶媒のみで処理し、溶解した。H A－N D Rを免疫沈降し、共免疫沈降したm y c－M O B 1を検出した。H A－N D R免疫沈降物のキナーゼ活性を、ペプチドキナーゼ分析にて測定した。B A P T Aのm y c h M O B 1とH A－N D Rの共免疫沈降およびO A処理した細胞は、B A P T A－A MがN D Rキナーゼ活性の観察される低下に対応するN D R－M O B相互作用の低下を誘導することを明らかとした。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis Forschungsstiftung, Zweigniederlassung Friedrich Miescher
Institute for Biomedical Research

<120> Phosphorylated Ndr kinase

<130> 1-32764A/FMI

<150> GB0227562.6

<151> 2002-11-26

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3018

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (596)..(1990)

<223>

```

<400> 1
gaattccggg ccaggcatgg tagcgcatcg ctgtaatccc agctactcgg gaaactgagg      60
tgggagaatc gattgaacct ggaagtggag gttgcggtga gccaaagatca tcctgtcgca      120
ctccagcctg ggcaacaaga gcgaaactcc atctcaaaaa gaaaaaaaaa gatatatatg      180
tgtgacttac aggtacaggt aaagttgctt ctgggttttct gggtgttgca tggatatttcc      240
tatgcagcca caggtcttta ttttcttact taagtgcctc caacttccca taacacaaat      300
taaggcatga tgaacatcct ctctgtgctg aacatcctgt gtatgtcact tcagaagcct      360
gtgtgacggg ttcttttagtc tttataccta ggggtgggat ttctgggtca taggacagta      420
atztatattt atttcactaa gtattctctt tctctggctt ttgttacata ttacctgttt      480
gtcctccaga aaacttgcac caatttacat tcctaccaat agggtaggag agtgcacaat      540
gggtggattc taactccaaa tctaacacct cttcttttct ttgtttctag cagcc atg      598
                                     Met
                                     1

```

```

gca atg aca ggc tca aca cct tgc tca tcc atg agt aac cac aca aag      646
Ala Met Thr Gly Ser Thr Pro Cys Ser Ser Met Ser Asn His Thr Lys
      5              10              15

```

```

gaa agg gtg aca atg acc aaa gtg aca ctg gag aat ttt tat agc aac      694
Glu Arg Val Thr Met Thr Lys Val Thr Leu Glu Asn Phe Tyr Ser Asn
      20              25              30

```

```

ctt atc gct caa cat gaa gaa cga gaa atg aga caa aag aag tta gaa      742
Leu Ile Ala Gln His Glu Glu Arg Glu Met Arg Gln Lys Lys Leu Glu
      35              40              45

```

10

20

30

40

aag gtg atg gaa gaa gaa ggc cta aaa gat gag gag aaa cga ctc cgg Lys Val Met Glu Glu Glu Gly Leu Lys Asp Glu Glu Lys Arg Leu Arg 50 55 60 65	790	
aga tca gca cat gct cgg aag gaa aca gag ttt ctt cgt ttg aag aga Arg Ser Ala His Ala Arg Lys Glu Thr Glu Phe Leu Arg Leu Lys Arg 70 75 80	838	
aca aga ctt gga ttg gaa gat ttt gag tcc tta aaa gta ata ggc aga Thr Arg Leu Gly Leu Glu Asp Phe Glu Ser Leu Lys Val Ile Gly Arg 85 90 95	886	
gga gca ttt ggt gag gta cgg ctt gtt cag aag aaa gat acg gga cat Gly Ala Phe Gly Glu Val Arg Leu Val Gln Lys Lys Asp Thr Gly His 100 105 110	934	10
gtg tat gca atg aaa ata ctc cgt aaa gca gat atg ctt gaa aaa gag Val Tyr Ala Met Lys Ile Leu Arg Lys Ala Asp Met Leu Glu Lys Glu 115 120 125	982	
cag gtt ggc cac att cgt gcg gag cgt gac att cta gtg gag gca gac Gln Val Gly His Ile Arg Ala Glu Arg Asp Ile Leu Val Glu Ala Asp 130 135 140 145	1030	
agt ttg tgg gtt gtg aaa atg ttc tat agt ttt cag gat aag cta aac Ser Leu Trp Val Val Lys Met Phe Tyr Ser Phe Gln Asp Lys Leu Asn 150 155 160	1078	
ctc tac cta atc atg gag ttc ctg cct gga ggg gac atg atg acc ttg Leu Tyr Leu Ile Met Glu Phe Leu Pro Gly Gly Asp Met Met Thr Leu 165 170 175	1126	20
ttg atg aaa aaa gac act ctg aca gaa gag gag act cag ttt tat ata Leu Met Lys Lys Asp Thr Leu Thr Glu Glu Glu Thr Gln Phe Tyr Ile 180 185 190	1174	
gca gaa aca gta tta gcc ata gac tct att cac caa ctt gga ttc atc Ala Glu Thr Val Leu Ala Ile Asp Ser Ile His Gln Leu Gly Phe Ile 195 200 205	1222	
cac aga gac atc aaa cca gac aac ctt ctt ttg gac agc aag ggc cat His Arg Asp Ile Lys Pro Asp Asn Leu Leu Leu Asp Ser Lys Gly His 210 215 220 225	1270	
gtg aaa ctt tct gac ttt ggt ctt tgc aca gga ctg aaa aaa gca cat Val Lys Leu Ser Asp Phe Gly Leu Cys Thr Gly Leu Lys Lys Ala His 230 235 240	1318	
agg aca gaa ttt tat agg aat ctg aac cac agc ctc ccc agt gat ttc Arg Thr Glu Phe Tyr Arg Asn Leu Asn His Ser Leu Pro Ser Asp Phe 245 250 255	1366	30
act ttc cag aac atg aat tcc aaa agg aaa gca gaa acc tgg aaa aga Thr Phe Gln Asn Met Asn Ser Lys Arg Lys Ala Glu Thr Trp Lys Arg 260 265 270	1414	
aat aga cgt cag cta gcc ttc tcc aca gta ggc act cct gac tac att Asn Arg Arg Gln Leu Ala Phe Ser Thr Val Gly Thr Pro Asp Tyr Ile 275 280 285	1462	
gct cct gag gtg ttc atg cag acc ggg tac aac aag ctc tgt gat tgg Ala Pro Glu Val Phe Met Gln Thr Gly Tyr Asn Lys Leu Cys Asp Trp	1510	

10

20

30

40

290	295	300	305	
tgg tgc ctt ggg gtg atc atg tat gag atg ctc atc ggc tac cca cct				1558
Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Glu Met Leu Ile Gly Tyr Pro Pro	310	315	320	
ttc tgt tct gag acc cct caa gag aca tat aag aag gtg atg aac tgg				1606
Phe Cys Ser Glu Thr Pro Gln Glu Thr Tyr Lys Lys Val Met Asn Trp	325	330	335	
aaa gaa act ttg act ttt cct cca gaa gtt ccc atc tct gag aaa gcc				1654
Lys Glu Thr Leu Thr Phe Pro Glu Val Pro Ile Ser Glu Lys Ala	340	345	350	
aag gat cta att ttg agg ttc tgc tgt gaa tgg gaa cat aga att gga				1702
Lys Asp Leu Ile Leu Arg Phe Cys Cys Glu Trp Glu His Arg Ile Gly	355	360	365	
gct cct gga gtt gag gaa ata aaa agt aac tct ttt ttt gaa ggc gtt				1750
Ala Pro Gly Val Glu Glu Ile Lys Ser Asn Ser Phe Phe Glu Gly Val	370	375	380	385
gac tgg gaa cat atc aga gag aga cct gct gca ata tct att gaa atc				1798
Asp Trp Glu His Ile Arg Glu Arg Pro Ala Ala Ile Ser Ile Glu Ile	390	395	400	
aaa agc att gat gat acc tca aac ttc gat gag ttt cca gaa tct gat				1846
Lys Ser Ile Asp Asp Thr Ser Asn Phe Asp Glu Phe Pro Glu Ser Asp	405	410	415	
att ctt aag cca aca gtg gcc aca agt aat cat cct gag act gac tac				1894
Ile Leu Lys Pro Thr Val Ala Thr Ser Asn His Pro Glu Thr Asp Tyr	420	425	430	
aag aac aaa gac tgg gtc ttc atc aat tac acg tac aag cgc ttt gag				1942
Lys Asn Lys Asp Trp Val Phe Ile Asn Tyr Thr Tyr Lys Arg Phe Glu	435	440	445	
ggc ctg act gca agg ggg gca ata cct tcc tac atg aaa gca gca aaa				1990
Gly Leu Thr Ala Arg Gly Ala Ile Pro Ser Tyr Met Lys Ala Ala Lys	450	455	460	465
tagtactctt gccacggaat cctatgtgga gcagagttct ttgtataaca tcatgctttt				2050
cctctcacac tcttgaagag cttccaagaa gttgatggaa cccaccaata tgtcatagta				2110
aagtctcctg aaatgtggta gtaagaggat tttcttccat aatgcatctg aaaaactgta				2170
aacaaagaca accattttcta ctacgtcggc cataaacagc tatcctgctt tggaagagaa				2230
gcatcatgag ccaatttgat aggtgtttta aaaataactt gagttttcct aagttcatca				2290
gaatgaaggg gaaaaacagc catcatccaa cattattgag attgtcgtgt atagtcatcg				2350
aatatcagcc agttcctgta attttgtgac acgctctctg ccaagccac caagtatttc				2410
ctttatagct aaaagttcca tagtactaag gaaataaagc aataaagaca gtctcagcag				2470
ccaggattct ggctgaagga aatgatccgc caccctgagg gtggtgatgg tagtttctac				2530
ccatacctca gcctcaggcg agtggcttat agcctccatt catgggtgcac tttatttatg				2590

10

20

30

gtactaagat aaagactgtc aatccattga tttatctcct cctgtccccc atctaaaata 2650
 cccatgctgc tttctgagt gttgatggg gttaccagct tgatccactg ttgctcttag 2710
 aaggcccgaga aagtctttgg gcattgcaag aaatcccgaa ttatgtggaa aaccctcact 2770
 ttctcttcac ggctgtacca gaaaatccct aagacagatc ttgccgtgga ctagcaatac 2830
 ctgcaagtgc tgccaatggg aactcaattt attcctggga acctaacgag gagagcccag 2890
 gcctaggcag gaggcctgga accctcttgg ctaagggtgct gttcctgttc ctgcaaggtc 2950
 tccagaaccc ctttggaat ggtgaaggaa ccagcccaat agaagtacag agccagctga 3010
 cggaattc 3018

10

<210> 2
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Ala Met Thr Gly Ser Thr Pro Cys Ser Ser Met Ser Asn His Thr
 1 5 10 15

Lys Glu Arg Val Thr Met Thr Lys Val Thr Leu Glu Asn Phe Tyr Ser
 20 25 30

Asn Leu Ile Ala Gln His Glu Glu Arg Glu Met Arg Gln Lys Lys Leu
 35 40 45

20

Glu Lys Val Met Glu Glu Glu Gly Leu Lys Asp Glu Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

Arg Arg Ser Ala His Ala Arg Lys Glu Thr Glu Phe Leu Arg Leu Lys
 65 70 75 80

Arg Thr Arg Leu Gly Leu Glu Asp Phe Glu Ser Leu Lys Val Ile Gly
 85 90 95

Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Arg Leu Val Gln Lys Lys Asp Thr Gly
 100 105 110

30

His Val Tyr Ala Met Lys Ile Leu Arg Lys Ala Asp Met Leu Glu Lys
 115 120 125

Glu Gln Val Gly His Ile Arg Ala Glu Arg Asp Ile Leu Val Glu Ala
 130 135 140

Asp Ser Leu Trp Val Val Lys Met Phe Tyr Ser Phe Gln Asp Lys Leu
 145 150 155 160

Asn Leu Tyr Leu Ile Met Glu Phe Leu Pro Gly Gly Asp Met Met Thr
 165 170 175
 Leu Leu Met Lys Lys Asp Thr Leu Thr Glu Glu Glu Thr Gln Phe Tyr
 180 185 190
 Ile Ala Glu Thr Val Leu Ala Ile Asp Ser Ile His Gln Leu Gly Phe
 195 200 205
 Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Asp Asn Leu Leu Leu Asp Ser Lys Gly
 210 215 220
 His Val Lys Leu Ser Asp Phe Gly Leu Cys Thr Gly Leu Lys Lys Ala
 225 230 235 240
 His Arg Thr Glu Phe Tyr Arg Asn Leu Asn His Ser Leu Pro Ser Asp
 245 250 255
 Phe Thr Phe Gln Asn Met Asn Ser Lys Arg Lys Ala Glu Thr Trp Lys
 260 265 270
 Arg Asn Arg Arg Gln Leu Ala Phe Ser Thr Val Gly Thr Pro Asp Tyr
 275 280 285
 Ile Ala Pro Glu Val Phe Met Gln Thr Gly Tyr Asn Lys Leu Cys Asp
 290 295 300
 Trp Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Glu Met Leu Ile Gly Tyr Pro
 305 310 315 320
 Pro Phe Cys Ser Glu Thr Pro Gln Glu Thr Tyr Lys Lys Val Met Asn
 325 330 335
 Trp Lys Glu Thr Leu Thr Phe Pro Pro Glu Val Pro Ile Ser Glu Lys
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ile Leu Arg Phe Cys Cys Glu Trp Glu His Arg Ile
 355 360 365
 Gly Ala Pro Gly Val Glu Glu Ile Lys Ser Asn Ser Phe Phe Glu Gly
 370 375 380
 Val Asp Trp Glu His Ile Arg Glu Arg Pro Ala Ala Ile Ser Ile Glu
 385 390 395 400

10

20

30

Ile Lys Ser Ile Asp Asp Thr Ser Asn Phe Asp Glu Phe Pro Glu Ser
405 410 415

Asp Ile Leu Lys Pro Thr Val Ala Thr Ser Asn His Pro Glu Thr Asp
420 425 430

Tyr Lys Asn Lys Asp Trp Val Phe Ile Asn Tyr Thr Tyr Lys Arg Phe
435 440 445

Glu Gly Leu Thr Ala Arg Gly Ala Ile Pro Ser Tyr Met Lys Ala Ala
450 455 460

10

Lys
465

<210> 3
<211> 1395
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1395)
<223>

20

<400> 3
atg gca atg acg gca ggg act aca aca acc ttt cct atg agc aac cat 48
Met Ala Met Thr Ala Gly Thr Thr Thr Thr Phe Pro Met Ser Asn His
1 5 10 15
acc cgg gaa aga gtg act gta gcc aag ctc aca ttg gag aat ttt tat 96
Thr Arg Glu Arg Val Thr Val Ala Lys Leu Thr Leu Glu Asn Phe Tyr
20 25 30
agc aac cta att tta cag cat gaa gag aga gaa acc agg cag aag aaa 144
Ser Asn Leu Ile Leu Gln His Glu Glu Arg Glu Thr Arg Gln Lys Lys
35 40 45
tta gaa gtg gcc atg gaa gaa gaa gga tta gca gat gaa gag aaa aag 192
Leu Glu Val Ala Met Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asp Glu Glu Lys Lys
50 55 60
tta cgt cga tca caa cac gct cgc aaa gaa aca gag ttc tta cgg ctc 240
Leu Arg Arg Ser Gln His Ala Arg Lys Glu Thr Glu Phe Leu Arg Leu
65 70 75 80
aaa agg acc aga ctt ggc ttg gat gac ttt gag tct ctg aaa gtt ata 288
Lys Arg Thr Arg Leu Gly Leu Asp Asp Phe Glu Ser Leu Lys Val Ile
85 90 95
gga aga gga gct ttt gga gag gtg cgg ttg gtc cag aag aaa gat aca 336
Gly Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Arg Leu Val Gln Lys Lys Asp Thr
100 105 110
ggc cat atc tat gca atg aag ata ttg aga aag tct gat atg ctt gaa 384
Gly His Ile Tyr Ala Met Lys Ile Leu Arg Lys Ser Asp Met Leu Glu

30

40

115	120	125	
aaa gag cag gtg gcc cat atc cga gca gaa aga gat att ttg gta gaa Lys Glu Gln Val Ala His Ile Arg Ala Glu Arg Asp Ile Leu Val Glu 130 135 140			432
gca gat ggt gcc tgg gtg gtg aag atg ttt tac agt ttt cag gat aag Ala Asp Gly Ala Trp Val Val Lys Met Phe Tyr Ser Phe Gln Asp Lys 145 150 155 160			480
agg aat ctt tat cta atc atg gaa ttt ctc cct gga ggt gac atg atg Arg Asn Leu Tyr Leu Ile Met Glu Phe Leu Pro Gly Gly Asp Met Met 165 170 175			528
aca ttg cta atg aag aaa gac acc ttg aca gaa gag gaa aca cag ttc Thr Leu Leu Met Lys Lys Asp Thr Leu Thr Glu Glu Glu Thr Gln Phe 180 185 190			576
tac att tca gag act gtt ctg gca ata gat gcg atc cac cag ttg ggt Tyr Ile Ser Glu Thr Val Leu Ala Ile Asp Ala Ile His Gln Leu Gly 195 200 205			624
ttc atc cat cgg gat att aag cca gac aac ctt tta ttg gat gcc aag Phe Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Asp Asn Leu Leu Leu Asp Ala Lys 210 215 220			672
ggt cat gta aaa tta tct gat ttt ggt tta tgt acg gga tta aag aaa Gly His Val Lys Leu Ser Asp Phe Gly Leu Cys Thr Gly Leu Lys Lys 225 230 235 240			720
gct cac agg act gaa ttt tat aga aat ctc aca cac aac cca cca agt Ala His Arg Thr Glu Phe Tyr Arg Asn Leu Thr His Asn Pro Pro Ser 245 250 255			768
gac ttc tca ttt cag aac atg aac tca aag agg aaa gca gaa act tgg Asp Phe Ser Phe Gln Asn Met Asn Ser Lys Arg Lys Ala Glu Thr Trp 260 265 270			816
aag aag aac agg aga caa ctg gca tat tcc aca gtt ggg aca cca gat Lys Lys Asn Arg Arg Gln Leu Ala Tyr Ser Thr Val Gly Thr Pro Asp 275 280 285			864
tac att gct cca gaa gta ttc atg cag act ggt tac aac aaa ttg tgt Tyr Ile Ala Pro Glu Val Phe Met Gln Thr Gly Tyr Asn Lys Leu Cys 290 295 300			912
gac tgg tgg tct ttg gga gtg att atg tat gaa atg cta ata gga tat Asp Trp Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Glu Met Leu Ile Gly Tyr 305 310 315 320			960
cca cct ttc tgc tct gaa aca cct caa gaa aca tac aga aaa gtg atg Pro Pro Phe Cys Ser Glu Thr Pro Gln Glu Thr Tyr Arg Lys Val Met 325 330 335			1008
aac tgg aaa gaa act ctg gta ttt cct cca gag gta cct ata tct gag Asn Trp Lys Glu Thr Leu Val Phe Pro Pro Glu Val Pro Ile Ser Glu 340 345 350			1056
aaa gcc aag gac tta att ctc aga ttt tgt att gat tct gaa aac aga Lys Ala Lys Asp Leu Ile Leu Arg Phe Cys Ile Asp Ser Glu Asn Arg 355 360 365			1104

10

20

30

att gga aat agt gga gta gaa gaa ata aaa ggt cat ccc ttt ttt gaa 1152
 Ile Gly Asn Ser Gly Val Glu Glu Ile Lys Gly His Pro Phe Phe Glu
 370 375 380

ggt gtc gac tgg gag cac ata agg gaa agg cca gca gca atc cct ata 1200
 Gly Val Asp Trp Glu His Ile Arg Glu Arg Pro Ala Ala Ile Pro Ile
 385 390 395 400

gaa atc aaa agc att gat gat act tca aat ttt gat gac ttc cct gaa 1248
 Glu Ile Lys Ser Ile Asp Asp Thr Ser Asn Phe Asp Asp Phe Pro Glu
 405 410 415

tct gat att tta caa cca gtg cca aat acc aca gaa ccg gac tac aaa 1296
 Ser Asp Ile Leu Gln Pro Val Pro Asn Thr Thr Glu Pro Asp Tyr Lys
 420 425 430

tcc aaa gac tgg gtt ttt ctc aat tat acc tat aaa agg ttt gaa ggg 1344
 Ser Lys Asp Trp Val Phe Leu Asn Tyr Thr Tyr Lys Arg Phe Glu Gly
 435 440 445

ttg act caa cgt ggc tct atc ccc acc tac atg aaa gct ggg aag tta 1392
 Leu Thr Gln Arg Gly Ser Ile Pro Thr Tyr Met Lys Ala Gly Lys Leu
 450 455 460

tga 1395

<210> 4
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Met Ala Met Thr Ala Gly Thr Thr Thr Thr Phe Pro Met Ser Asn His
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Arg Val Thr Val Ala Lys Leu Thr Leu Glu Asn Phe Tyr
 20 25 30

Ser Asn Leu Ile Leu Gln His Glu Glu Arg Glu Thr Arg Gln Lys Lys
 35 40 45

Leu Glu Val Ala Met Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asp Glu Glu Lys Lys
 50 55 60

Leu Arg Arg Ser Gln His Ala Arg Lys Glu Thr Glu Phe Leu Arg Leu
 65 70 75 80

Lys Arg Thr Arg Leu Gly Leu Asp Asp Phe Glu Ser Leu Lys Val Ile
 85 90 95

Gly Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Arg Leu Val Gln Lys Lys Asp Thr
 100 105 110

10

20

30

40

Gly His Ile Tyr Ala Met Lys Ile Leu Arg Lys Ser Asp Met Leu Glu
115 120 125

Lys Glu Gln Val Ala His Ile Arg Ala Glu Arg Asp Ile Leu Val Glu
130 135 140

Ala Asp Gly Ala Trp Val Val Lys Met Phe Tyr Ser Phe Gln Asp Lys
145 150 155 160

Arg Asn Leu Tyr Leu Ile Met Glu Phe Leu Pro Gly Gly Asp Met Met
165 170 175

Thr Leu Leu Met Lys Lys Asp Thr Leu Thr Glu Glu Glu Thr Gln Phe
180 185 190

Tyr Ile Ser Glu Thr Val Leu Ala Ile Asp Ala Ile His Gln Leu Gly
195 200 205

Phe Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Asp Asn Leu Leu Leu Asp Ala Lys
210 215 220

Gly His Val Lys Leu Ser Asp Phe Gly Leu Cys Thr Gly Leu Lys Lys
225 230 235 240

Ala His Arg Thr Glu Phe Tyr Arg Asn Leu Thr His Asn Pro Pro Ser
245 250 255

Asp Phe Ser Phe Gln Asn Met Asn Ser Lys Arg Lys Ala Glu Thr Trp
260 265 270

Lys Lys Asn Arg Arg Gln Leu Ala Tyr Ser Thr Val Gly Thr Pro Asp
275 280 285

Tyr Ile Ala Pro Glu Val Phe Met Gln Thr Gly Tyr Asn Lys Leu Cys
290 295 300

Asp Trp Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Glu Met Leu Ile Gly Tyr
305 310 315 320

Pro Pro Phe Cys Ser Glu Thr Pro Gln Glu Thr Tyr Arg Lys Val Met
325 330 335

Asn Trp Lys Glu Thr Leu Val Phe Pro Pro Glu Val Pro Ile Ser Glu
340 345 350

Lys Ala Lys Asp Leu Ile Leu Arg Phe Cys Ile Asp Ser Glu Asn Arg
355 360 365

10

20

30

40

Ile Gly Asn Ser Gly Val Glu Glu Ile Lys Gly His Pro Phe Phe Glu
370 375 380

Gly Val Asp Trp Glu His Ile Arg Glu Arg Pro Ala Ala Ile Pro Ile
385 390 395 400

Glu Ile Lys Ser Ile Asp Asp Thr Ser Asn Phe Asp Asp Phe Pro Glu
405 410 415

Ser Asp Ile Leu Gln Pro Val Pro Asn Thr Thr Glu Pro Asp Tyr Lys
420 425 430

Ser Lys Asp Trp Val Phe Leu Asn Tyr Thr Tyr Lys Arg Phe Glu Gly
435 440 445

Leu Thr Gln Arg Gly Ser Ile Pro Thr Tyr Met Lys Ala Gly Lys Leu
450 455 460

<210> 5
<211> 1282
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (143)..(790)
<223>

<400> 5
gcggccagaa acccggctcc gagcggcggc ggcccggcct ccgctgcccg tgagctaagg 60
acggctccgct ccctctagcc agctccgaat cctgatccag gcgggggcca ggggccctc 120
gcctcccctc tgaggaccga ag atg agc ttc ctc ttc agc agc cgc tct tct 172
Met Ser Phe Leu Phe Ser Ser Arg Ser Ser
1 5 10
aaa aca ttc aaa cca aag aag aat atc cct gaa gga tct cat cag tat 220
Lys Thr Phe Lys Pro Lys Lys Asn Ile Pro Glu Gly Ser His Gln Tyr
15 20 25
gaa ctc tta aaa cat gca gaa gca act cta gga agt ggg aat ctg aga 268
Glu Leu Leu Lys His Ala Glu Ala Thr Leu Gly Ser Gly Asn Leu Arg
30 35 40
caa gct gtt atg ttg cct gag gga gag gat ctc aat gaa tgg att gct 316
Gln Ala Val Met Leu Pro Glu Gly Glu Asp Leu Asn Glu Trp Ile Ala
45 50 55
gtg aac act gtg gat ttc ttt aac cag atc aac atg tta tat gga act 364
Val Asn Thr Val Asp Phe Phe Asn Gln Ile Asn Met Leu Tyr Gly Thr
60 65 70

10

20

30

40

att aca gaa ttc tgc act gaa gca agc tgt cca gtc atg tct gca ggt 412
 Ile Thr Glu Phe Cys Thr Glu Ala Ser Cys Pro Val Met Ser Ala Gly
 75 80 85 90
 ccg aga tat gaa tat cac tgg gca gat ggt act aat att aaa aag cca 460
 Pro Arg Tyr Glu Tyr His Trp Ala Asp Gly Thr Asn Ile Lys Lys Pro
 95 100 105
 atc aaa tgt tct gca cca aaa tac att gac tat ttg atg act tgg gtt 508
 Ile Lys Cys Ser Ala Pro Lys Tyr Ile Asp Tyr Leu Met Thr Trp Val
 110 115 120
 caa gat cag ctt gat gat gaa act ctt ttt cct tct aag att ggt gtc 556
 Gln Asp Gln Leu Asp Asp Glu Thr Leu Phe Pro Ser Lys Ile Gly Val
 125 130 135
 cca ttt ccc aaa aac ttt atg tct gtg gca aag act att cta aag cgt 604
 Pro Phe Pro Lys Asn Phe Met Ser Val Ala Lys Thr Ile Leu Lys Arg
 140 145 150
 ctg ttc agg gtt tat gcc cat att tat cac cag cac ttt gat tct gtg 652
 Leu Phe Arg Val Tyr Ala His Ile Tyr His Gln His Phe Asp Ser Val
 155 160 165 170
 atg cag ctg caa gag gag gcc cac ctc aac acc tcc ttt aag cac ttt 700
 Met Gln Leu Gln Glu Ala His Leu Ile Asn Thr Ser Phe Lys His Phe
 175 180 185
 att ttc ttt gtt cag gag ttt aat ctg att gat agg cgt gag ctg gca 748
 Ile Phe Phe Val Gln Glu Phe Asn Leu Ile Asp Arg Arg Glu Leu Ala
 190 195 200
 cct ctt caa gaa tta ata gag aaa ctt gga tca aaa gac aga 790
 Pro Leu Gln Glu Leu Ile Glu Lys Leu Gly Ser Lys Asp Arg
 205 210 215
 taaatgtttc ttctagaaca cagttacccc cttgcttcat ctattgctag aactatctca 850
 ttgctatctg ttatagacta agtgatacaa actttaagaa aacaggataa aaagataccc 910
 attgcctgtg tctactgata aaattatccc aaaggtaggt tgggtgtgata gtttccgagt 970
 aagaccttaa ggacacagcc aaatcttaag tactgtgtga ccactcttgt tgttatcaca 1030
 tagtcatact tggttgtaat atgtgatggg taacctgtag cttataaatt tacttattat 1090
 tcttttactc atttactcag tcatttcttt acaagaaaat gattgaatct gttttaggtg 1150
 acagcacaat ggacattaag aatttccatc aataatttat gaataagttt ccagaacaaa 1210
 tttcctaata acacaatcag attgggttta ttcttttatt ttacgaataa aaaatgtatt 1270
 tttcagaaaa ag 1282

<210> 6
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

10

20

30

40

Met Ser Phe Leu Phe Ser Ser Arg Ser Ser Lys Thr Phe Lys Pro Lys
1 5 10 15

Lys Asn Ile Pro Glu Gly Ser His Gln Tyr Glu Leu Leu Lys His Ala
20 25 30

Glu Ala Thr Leu Gly Ser Gly Asn Leu Arg Gln Ala Val Met Leu Pro
35 40 45

Glu Gly Glu Asp Leu Asn Glu Trp Ile Ala Val Asn Thr Val Asp Phe
50 55 60

Phe Asn Gln Ile Asn Met Leu Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Phe Cys Thr
65 70 75 80

Glu Ala Ser Cys Pro Val Met Ser Ala Gly Pro Arg Tyr Glu Tyr His
85 90 95

Trp Ala Asp Gly Thr Asn Ile Lys Lys Pro Ile Lys Cys Ser Ala Pro
100 105 110

Lys Tyr Ile Asp Tyr Leu Met Thr Trp Val Gln Asp Gln Leu Asp Asp
115 120 125

Glu Thr Leu Phe Pro Ser Lys Ile Gly Val Pro Phe Pro Lys Asn Phe
130 135 140

Met Ser Val Ala Lys Thr Ile Leu Lys Arg Leu Phe Arg Val Tyr Ala
145 150 155 160

His Ile Tyr His Gln His Phe Asp Ser Val Met Gln Leu Gln Glu Glu
165 170 175

Ala His Leu Asn Thr Ser Phe Lys His Phe Ile Phe Phe Val Gln Glu
180 185 190

Phe Asn Leu Ile Asp Arg Arg Glu Leu Ala Pro Leu Gln Glu Leu Ile
195 200 205

Glu Lys Leu Gly Ser Lys Asp Arg
210 215

<210> 7
<211> 1787
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 7

10

20

30

40

```

ggtcgcggtc gctctggagc cgcgcgcacg tcgcgtctgc gccgtctctg tagccgtcgg      60
ccccgcgcct ccctccccc tgggtctgca gccatggcaa tgacaggatc aacaccttgc      120
tcattccatga gtaatcatat gaaggagagg gtgacaatga ccaaagtgc actggagaat      180
ttttatagca accttatcgc tcaacatgaa gaacgagaaa tgagacaaaa gaagttagaa      240
aaggtgatgg aagaagaagg cctgaaagac gaagagaaac gactcagaag atccgcgcac      300
gctcggaagg aaacagagtt tcttcgatta aagagaacaa ggcttggact ggaagathtt      360
gagtctttta aagtcatagg ccgaggagca tttggtgagg tgcggcttgt tcagaagaaa      420
gacacagggc atgtgtacgc aatgaaaatc ctgcgcaaag cagacatgct cgagaaggag      480
caggttggcc acattcgtgc ggagcgtgac attctagtgg aggcagacag tttgtgggtt      540
gtgaaaatgt tctatagttt tcaggataag ctaaacctct acctaatcat ggagttcctg      600
cctggagggg acatgatgac tttattgatg aaaaaagata ctctgacaga agaggagact      660
cagttttata tagcagagac agtattagcc atagactcca ttcaccagct gggattcatc      720
cacagagata tcaagccaga caaccttctc ttggacagca agggccatgt gaaactttcc      780
gactttggcc tttgcacagg cctgaaaaaa gcacacagga cagaatttta taggaacctg      840
aaccacagcc tgcccagtga tttcactttt cagaacatga attccaaaag gaaagcagag      900
acctggaaaa gaaacagacg ccagctagcc ttctctacag tgggcactcc tgactacatt      960
gctccagagg tgttcatgca gacgggttac aacaagctct gcgattggtg gtcgctcggg     1020
gtaatcatgt acgagatgct catcggttac ccaccattct gctccgagac cccacaggag     1080
acatacaaga aagtgatgaa ctggaaggaa actttgacct ttcctccaga agttcctgtc     1140
tccgagaaaag ccaagggcct gattctgagg ttctgctgtg aatgggaaca tagaatcgga     1200
gccctggagg ttgaagaaat aaaaaataat cttttttttg aaggtgttga ctgggaacac     1260
atcagggaga gaccagctgc gatattctatt gaaatcaaga gcacgatga tacctcaaac     1320
ttcgatgaat ttccagagtc tgatattctt aagccacag tgaccacaag tagtcatcct     1380
gagacggact acaagaacaa agactgggtc ttcacatcaatt acacatacaa gcgcttcgag     1440
ggcctgacag ccaggggggc cataccttcg tacatgaaag cagcaaaata gggcctgtgc     1500
tggaaccctt aaatggggca gtggtctcta tacaacattg tggttttcct cttgcgctct     1560
tgaaagaact tccaagaagt ttgtagaatt cattaatata tcctagtcaa gtctctgaaa     1620
tgtgattgta agtggatatt cctccacggt gcaccgggaa gctgatagga cagagacaag     1680
catttttcca tcggccataa gcagctgctt gcttcttttg aagcccatg agccagtttg     1740
gtatgtgctg taaagagaat ttgatttccc caagttgatc agaatga                       1787

```

<210> 8

10

20

30

40

<211> 2599
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 8
 agggctcgag cggccgcccc ggcaggtaga gaatgggtggg gaccccatgt ccagctgata 60
 gatcatcata tcacacaggc tctggagtct agcagctttt caccaacaga gaggcgttca 120
 ttgccttttt aaggacgccc gagtggggga tcttcattct gcttttagca tgtggctgcc 180
 tactactgtt tgccttacat tcttgctggg cttcttctgg aatcttccct ggttcttccg 240
 tacctttccc caccaaatct tcagactaga agtgaggcca taaaccaaga aactatgagg 300
 acatccaggc tatctagctc atttggaagg agactctggc atttccagtt actatggcaa 360
 tgacggcagg ggcaacaact acctttccta tgagcaacca taccgggaa agagtaactg 420
 tggccaagct cacactggag aatttttaca gcaacctaatt ttacagcat gaagagagag 480
 aaaccaggca gaagaagtta gaagtggcta tggaagaaga aggattagca gatgaggaga 540
 aaaagttacg tcgatcgag catgctcgta aagaacaga gttcttacgc ctttaaggga 600
 ccagacttgg cctggatgac tttgagtctc tgaaggttat agcaagagga gctttcggag 660
 aggtgcggct ggtccagaag aaagacacgg ggcacatcta tgccatgaag atcctgagga 720
 aagctgacat gcttgagaaa gagcaggtgg ctcatatccg agcagaaagg gacattttgg 780
 tggaagcaga tggagcctgg gtggtgaaga tgttctacag ttttcaggac aaacggaatc 840
 tctacctcat catggaattt cttcctggag gtgacatgat gacattgctg atgaagaagg 900
 acaccttaac agaagaagag acacagttct acatctcaga gactgtcttg gcgatatagtg 960
 caattcacca gctgggcttc atccaccggg acgtcaaacc agacaacctt ttactggatg 1020
 ccaagggaca tgtaaaatta tctgattttg gtttgtgcac ggggttaaag aaagctcaca 1080
 ggactgaatt ctacagaaac ctcacacata acccgccaag cgacttctca tttcagaaca 1140
 tgaattcaaa gcggaaagca gagacatgga agaagaacag gagacagctg gcttactcca 1200
 cagttggaac accagactac attgctccag aagtattcat gcagactggc tacaacaaat 1260
 tgtgtgactg gtggtccttg ggagtgatta tgtacgagat gctaataaggc tttccacctt 1320
 tctgctctga aacaccacaa gaaacataca gaaaagttat gagctggaag gagactctgg 1380
 catttcctcc ggaagtgcgc gtctctgaga aagccaagga cttgattctc agattttgta 1440
 ctgattctga aaacagaatt gggaatggtg gtgtggaaga aatcaaaggc catccgttct 1500
 ttgagggtgt agactggggg cacataaggg aaagaccagc agctattcct atagaaatcc 1560
 ggagtataga tgacacctca aactttgatg acttccctga gtctgatatc ttacagccag 1620
 tgccgaatac cacagagccc gactacaaat ccaaagactg ggtttttctc aattacacct 1680
 acaaaagggt tgaagggtcg acccagagag gctccattcc tacatacatg aaagctggga 1740

10

20

30

40

agttatgatg atcacagtgc cccatagcca ggagaactca ggtagctgca tccgcaggct 1800
 ggctcggcat cagcaccagg agctctggga cagtgtctgt ctccagccag aggaacgact 1860
 acagcttggg aatctgaggc tgctatggct atgggaattg ctcagctttt ttttttcttt 1920
 ttcttttttt ttgtattaac ttattatac aaaggtactg gaacaaaaga aacagacatt 1980
 ccctcctaac tgcactgcct acgtgcatgt tgagaggtcc atcctgcca tgtgctgcgc 2040
 ttccgattgc aacactaato cagccagaac tgcattgcac tgacggcacc atgacagcct 2100
 gaggttgctc tcagtgtccc tgcttactg cagagcccgt gggctctaga tcagtgaata 2160
 gccatcttct gtagctgtcg ttagtacaac atttgccctg ttggtttgga cattgtgggc 2220
 tctacatgaa gacagtttct gtaccggctc caaggaactt aaggacgctg acttcaacga 2280
 cattagaatt tcctgtcagg ctctcagca gacctgtga tagggaagat gagcttctgt 2340
 tagggtaggg gcatcttctc cttcgtctcc ggcattctca aggtgacgg tgctcacaga 2400
 ttgtgacttg acgactgatg tgcacacatg gagatggacc tgaatgattg tcagctactc 2460
 acttttaaca atgctgtagc attgttttag ttgaggatg gtgagctgag tttcagaaat 2520
 gaccatgaaa gctgcttgta gaacctagta tgtttttatt aaacaatttt ttttaatgtc 2580
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2599

10

<210> 9
 <211> 4725
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 9
 agcggagagt tcaggaggc cgcctgaga ttccggcgag gccgagggtc ccacctccc 60
 gggcgggggc gagggcgagg cgggggagaag ggagctgacg ggcgcccggc cggctgcggg 120
 ccgtgcggag gctgagccgg ccgcgggcgc gaccggaggc agtttccgtt actatggcaa 180
 tgacggcagg gactacaaca acctttccta tgagcaacca taccgggaa agagtgactg 240
 tagccaagct cacattggag aatttttata gcaacctaat ttacagcat gaagagagag 300
 aaaccaggca gaagaaatta gaagtggcca tggaagaaga aggattagca gatgaagaga 360
 aaaagttacg tcgatcaca cagctcgca aagaacaga gttcttacgg ctcaaaagga 420
 ccagacttgg cttggatgac tttagtctc tgaaagttag aggaagagga gcttttgagg 480
 aggtgcgggt ggtccagaag aaagatacag gccatatcta tgcaatgaag atattgagaa 540
 agtctgatat gcttgaaaaa gagcaggtgg cccatatccg agcagaaaga gatattttgg 600
 tagaagcaga tgggtcctgg gtggtgaaga tgttttacag ttttcaggat aagaggaatc 660
 tttatctaata catggaattt ctccctggag gtgacatgat gacattgcta atgaagaaag 720

30

acaccttgac agaagaggaa acacagttct acatttcaga gactgttctg gcaatagatg 780
 cgatccacca gttgggtttc atccatcggg atattaagcc agacaacctt ttattggatg 840
 ccaaggggtca tgtaaaatta tctgattttg gtttatgtac gggattaaag aaagctcaca 900
 ggactgaatt ttatagaaat ctcacacaca acccaccaag tgactttctca tttcagaaca 960
 tgaactcaaa gaggaaagca gaaacttgga agaagaacag gagacaactg gcatattcca 1020
 cagttgggac accagattac attgctccag aagtattcat gcagactggg tacaacaaat 1080
 tgtgtgactg gtggtctttg ggagtgatta tgtatgaaat gctaatagga tatccacctt 1140
 tctgtctga aacacctcaa gaaacataca gaaaagtgaat gaactggaaa gaaactctgg 1200
 tatttctctc agaggtaacct atatctgaga aagccaagga cttaattctc agattttgta 1260
 ttgattctga aaacagaatt ggaaatagtg gagtagaaga aataaaaggt catccctttt 1320
 ttgaagggtg cgactgggag cacataaggg aaaggccagc agcaatccct atagaaatca 1380
 aaagcattga tgatacttca aattttgatg acttccctga atctgatatt ttacaaccag 1440
 tgccaaatac cacagaaccg gactacaaat ccaaagactg ggtttttctc aattatacct 1500
 ataaaagggt tgaagggttg actcaacgtg gctctatccc cacctacatg aaagctggga 1560
 agttatgaat gaagataaca ttcaccata accaagagaa ctgaggtagc tgcacacca 1620
 ggcttgcttg gcgtagataa caatacactg aaatactcct gaagatgggt gtgcttattg 1680
 actacaagag gaaattctac aggattagga tttctaagac tactatagga attgggtggc 1740
 agtgccagct ggctcttttt tttaatat ttatttttt gttaacttta ttatatgaag 1800
 gtactggaat aaaaggaaca gacatccctt tctaactgca ctgcttacat gcgtattaag 1860
 gtccattctg cctgtgtgtg ctgtggcttt gaactgtaac acctctaac aattcaggag 1920
 gaacacatat catttaaaag aacataggct aacctgtagg taacactgca gtattgatgt 1980
 tttactgcaa atcttatggg tctagataat cagtaaaagc catcttccat agttggtgtt 2040
 agaacattgc cctattgggt tggacatctg tagaatatat atgaagacaa tttctgtaat 2100
 ggttttaaga gatttaaaaa gaaattcact ggttctttac aaaatagaat ttatcatcaa 2160
 gttattacac aaacttcaca gtaaggagtg acaagtttat aataaggaag acaaagtta 2220
 acaccttcac tcaagcactc cactaatata ttacgttgac attcagaaat actgatgacc 2280
 ttcatatacg tagtctgtat actcataggg agatgtactg tattatataa catgtaaagt 2340
 tgattttctt gtgacaagag aacttctttt tttacaaga ggacatggca ttattttaat 2400
 ttgattatgg tgagttgaat ttaagacatg accatgaagg ctgcttgtag aattagtgt 2460
 tttttattaa actatttttt taaatgtcaa acttctatca tgtaaatgga cttatagaga 2520
 acaaaaagct atttactttg gttttctaga aagttgttac atatcatggc tggttaactt 2580

10

20

30

40

ttatttcttt tgatgaaaat ttttcctttg atagtacttg tattattgtg ccattatitt 2640
 cttatgctcc aaatgtacca aagatcttga acagagtggg tgttcacaac tgagtagaat 2700
 tttccttttc tgtgggcatg ctgtattcag acctgacaga tctttgatag aggtcagctt 2760
 attaaagggc aatattgttc ttgttttagct acatcactgt ggtgaatata gatggaatta 2820
 aggaagtaaa tgcaggccag ggggttgtga tgagaggata ggggagataa tatcagcatc 2880
 aaattctttg ggtatctctc taagaattaa ataatctttt ctagcttaat attttaattc 2940
 taattcaaac aactctgagg ttttggtttc attagtaata gttgaggaat aatatactag 3000
 caaagaatgg cctaagtgtt gtcataactg ttaatggatg aaatttttta aagatacaac 3060
 catgataacc attataaatg atctatgac aaaatctaaa gtgatgaatt attttagtagga 3120
 atgtcttctt aatggggaag aattgcatag gagcattatg caaatctaca caagctttta 3180
 taaatgttgc tgctgggtag ctccacagt tttcataagg ccatcctgtt tcccccaact 3240
 ccccatittt tggtttgttt ctttttaaat atttgttgag tacttatgtg tttatctaac 3300
 agttcacttc catttttcta gtctggattt tttgagtatt taggaaagag agctattaaa 3360
 aactctgggg atttctcaat gtgactaact ctaatttttc taattataac tgcctttaat 3420
 taacataata ttaacttttg ctgaggttta tgagattttc tcaccccaaca tcgctccct 3480
 ttttttaaaa aggactgttt tgctagtgtg ataatgaata ggtaagatat gagataattg 3540
 caacattgtc tagttctagt atggtaacta ttcttgaaat ggtattgaaa aataccgtta 3600
 attcaaattg acagagattg ataaaaagaa actgatttac ctaagtttac tttttaattg 3660
 cataatagag cattttttgt tttgagtcc ctcattctta ttaccagaaa gagcttgcaa 3720
 atagttttac tttcttgcca ctggaagggt agttctggaa agctactttg ttgagagtct 3780
 cattcttccc tggagttaat agagtgatc acaatctttg gggttttctc ctcacaaaa 3840
 gcatttctta agtgcctatc taaaagcaat taaagactgt gtctgccctt tagaagctaa 3900
 gaatttgatt catgatgcaa attaactaga taatttgcaa agtacccttg agattgaatt 3960
 ttctctatta tatatttccc atatttcagg tgaataattt aatttaaatg acaaaacct 4020
 atctagtcta ctgggcataa tgacattttc tttaaattag actctatttt gaattaaaag 4080
 agttttatta taaacctgtg gtttttggtt tttctaagta tatagaaagc ttgtataatt 4140
 cagatttatc aatttcctga tttaatgtag actttgactt ttttattaaa aacctttgta 4200
 ttaaagcaag ttatgttatt tttcttttat gcatttatta ctaacatagc tttaaatctt 4260
 taaatgtatt gaagcattgt gctgtctgaa aataaggaat tgcttataaa ccagccactt 4320
 ctgaatacaa tatgtagctg atttaataag ctagtttagtg aatggaaaat aagtgtggag 4380
 tattaataat gttctttggt tggttaaggcc taagataggg tttcatttat ttctatactt 4440

10

20

30

```

tttctgtttt ttaaacacct gcatattttt atgtaaatct cttaaatttaa aatatttttaa 4500
gtacatttat ttttggtggt ttattgtata aaaccttaga caatcaatca gtcagtcttt 4560
actgacagga gcagcagcta tctgtctttt gctgatctac aaataaatga attgagaatt 4620
tagtccatag aggtccctgg ctaccaaaca cattctcctt tgaattgtta aaattcagaa 4680
cattcaaaat aactgttttg ctacaacca aaaaaaaaaa aaaaa 4725

```

```

<210> 10
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

10

```

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer

```

```

<400> 10
cccaagcttg ccaccatggc ttaccatac gatgttcag attacgcttc gatgcaatga 60
cggcag 66

```

```

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer

```

20

```

<400> 11
cgggatccct attttgctgc tttcatg 27

```

```

<210> 12
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer

```

```

<400> 12
ggacatgtgt atgcaatggc tatactccgt aaagcagata tgcttgaaaa agagcagg 58

```

```

<210> 13
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

30

```

<220>
<223> oligonucleotide primer

```

```

<400> 13
gcatatctgc tttacggagt atagccattg catacacatg tcccgatatc ttcttctgaa 60
caagc 65

```

<210> 14
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide primer

<400> 14
 gctcggaagg aagcagagtt tcttcgtttg aagagaacaa gacttgg

47

<210> 15
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide primer

<400> 15
 cgaagaaact ctgcttcctt ccgagcatgt gctgatctcc g

41

<210> 16
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide sequence

20

<400> 16
 cgtcagctag ccttcgctac agtaggcact cctgactaca ttgc

44

<210> 17
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide sequence

<400> 17
 ggagtgccta ctgtagcgaa ggctagctga cgtctatttc ttttcc

46

30

<210> 18
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide primer

<400> 18
 ggtcttcac c aattacgctt acaagcgctt tgagggcctg actgc

45

<210> 19

40

<211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide primer

<400> 19
 cctcaaagcg cttgtaagcg taattgatga agaccagtc ttgttc

47

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> synthetic peptide with sequence derived from human Ndrl sequence

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 20

Asn Arg Arg Gln Leu Ala Phe Ser Thr Val Gly Thr Pro Asp
 1 5 10

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> synthetic peptide derived from human Ndrl sequence

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(10)
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 21

Lys Asp Trp Val Phe Ile Asn Tyr Thr Tyr Lys Arg Phe Glu Gly
 1 5 10 15

30

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic substrate peptide

<400> 22

Lys Lys Arg Asn Arg Arg Leu Ser Val Ala

40

40

<210> 28
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer

<400> 28
agcaggatcc ggtaccatgg caatgacagg ctcaacacct tgc

43

<210> 29
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer

<400> 29
cgaggatcct gctccacata ggattccgtg gcaagag

37

10

20

【手続補正書】

【提出日】平成17年7月7日(2005.7.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2006506994000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/13251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/54 C12N9/12 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/48 C07K16/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 19579 A (CIBA GEIGY AG ;HEMMINGS BRIAN ARTHUR (CH); MILLWARD THOMAS ANDERS) 27 June 1996 (1996-06-27) cited in the application SeqIdNos 6,7 abstract; claims page 17, line 8 - line 15	1-26
A	EP 1 097 989 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH)) 9 May 2001 (2001-05-09) cited in the application abstract; claims paragraph '0008! - paragraph '0018! paragraph '0022! paragraph '0042! paragraph '0079!	1-26
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 March 2004		14/04/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 81 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ceder, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/13251

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UNIPROT 'Online! EMBL; 1 June 2002 (2002-06-01) STRAUSBERG, R.: "Serine / threonine kinase 38 like" retrieved from EBI Database accession no. Q8TBX7 XP002274827 the whole document	6
A	-& DATABASE EM_HUM 'Online! EMBL; 27 April 2002 (2002-04-27) STRAUSBERG ET AL.: "Homo sapiens serine/threonine kinase 38 like, mRNA (cDNA clone MGC:33176 IMAGE:4823429), complete cds." retrieved from EBI Database accession no. BC028603 XP002274828 the whole document & PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 99, no. 26, 2002, pages 16899-16903, us	6
A	MILLWARD ET AL.: "Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins" EMBO J., vol. 17, no. 20, 1998, pages 5913-5922, XP001189311 cited in the application page 5915, right-hand column -page 5917, left-hand column; figure 5	1-6
P,X	TAMASKOVIC ET AL.: "Mechanism of Ca ²⁺ -mediated regulation of NDR protein kinase through autophosphorylation and phosphorylation by an upstream kinase" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 9, 28 February 2003 (2003-02-28), pages 6710-6718, XP002274826 abstract	1-26
P,X	TAMASKOVIC R ET AL: "NDR family of AGC kinases - essential regulators of the cell cycle and morphogenesis" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 546, no. 1, 3 July 2003 (2003-07-03), pages 73-80, XP004433622 ISSN: 0014-5793 page 75, left-hand column -right-hand column	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/13251

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9619579	A	27-06-1996	AU 4388296 A	10-07-1996
			CA 2208237 A1	27-06-1996
			WO 9619579 A1	27-06-1996
			EP 0793725 A1	10-09-1997
			JP 11500606 T	19-01-1999
			US 6040164 A	21-03-2000
			US 5981205 A	09-11-1999
EP 1097989	A	09-05-2001	EP 1097989 A2	09-05-2001
			JP 2001120283 A	08-05-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
C 0 7 K 16/40 (2006.01)		C 0 7 K 16/40		
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)		C 1 2 Q 1/48	Z	
A 6 1 K 38/45 (2006.01)		A 6 1 K 37/52		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葆

(74)代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(74)代理人 100064610

弁理士 中嶋 正二

(72)発明者 サムエル・ヨーゼフ・ビッヒゼル

スイス、ツェーハー 4 0 5 8 パーゼル、エム・ズリナム 9 1 番

(72)発明者 ブライアン・アーサー・ヘミングズ

スイス、ツェーハー 4 1 2 6 ベッティンゲン、バイエルガッセ 3 9 アー番

(72)発明者 マリオ・ラインハルト・シュテゲルト

ドイツ連邦共和国デー 7 9 6 3 9 グレンツァッハ、ビューアゲラーヴェーク 8 番

(72)発明者 ラスティスラフ・タマスコヴィッチ

スイス、ツェーハー 4 3 1 0 ラインフェルデン、プロトラウベ 1 3 番

F ターム(参考) 4B050 CC04 DD07 FF16C LL03

4B063 QA01 QA18 QQ27 QR07 QR48 QR62 QS25 QS34 QX02

4C084 AA02 AA06 BA17 BA18 BA19 BA22 CA18 CA53 CA59 DC22

DC25 NA14 ZA15 ZB07 ZB09 ZB21 ZB26 ZC19 ZC20

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA89 EA50 FA74