

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 4 月 6 日 (06.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/035975 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/018245
- (22) 国際出願日: 2005 年 9 月 27 日 (27.09.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-279216 2004 年 9 月 27 日 (27.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岸 努 (KISHI, Tsutomu) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING TARGET PROTEIN OF UBIQUITINATION BY UBIQUITIN LIGASE

(54) 発明の名称: ユビキチンリガーゼによるユビキチン化の標的タンパク質をスクリーニングする方法

(57) Abstract: It is intended to develop an experiment system for screening a protein to be ubiquitinated by ubiquitin ligase and identify a target protein of the ubiquitination by using the system. It is found out that a target protein can be stabilized and consequently screened by, in a yeast two-hybrid screening system, (1) using, as a bait, not the full-length F-box protein but a mutated F-box protein lacking the F-box motif, which is seemingly an Skp1-binding region, either as a whole or to such an extent as losing the ability to bind to Skp1, and (2) further using a mutant having a lowered ability to degrade the target protein (for example, a temperature-sensitive mutant or a deletion mutant).

(57) 要約: ユビキチンリガーゼによってユビキチン化されるタンパク質をスクリーニングする実験系を開発し、これを用いてユビキチン化の標的タンパク質を同定することを課題とする。酵母 two hybrid スクリーニング系に、(1) 完全長の F-box タンパク質ではなく、Skp1 との結合領域であると考えられている F-box モチーフを、全体あるいは Skp1 と結合できなくなる程度を欠失した変異型 F-box タンパク質を bait として用い、更に (2) 標的タンパク質の分解能が低下した変異株 (例えば、温度感受性変異株あるいは欠失変異株) 用いることにより、標的タンパク質を安定化でき、結果としてスクリーニングできることを見出した。

WO 2006/035975 A1

明 細 書

ユビキチンリガーゼによるユビキチン化の標的タンパク質をスクリーニングする
方法

技術分野

本発明はユビキチンリガーゼのユビキチン化の標的タンパク質を同定するための新規のスクリーニング方法に関する。

背景技術

ユビキチン/プロテアソーム系は真核生物に普遍的に存在するタンパク質分解系である。この系では、まず、(1) 分解すべきタンパク質をユビキチンリガーゼが認識し、ユビキチン化するステップと、(2) ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームが分解するステップからなっている。この二つのステップは連続して起きているので、ユビキチン化されたタンパク質は急速に分解される。

ユビキチン化に依存した制御タンパク質の分解は、細胞機能を正常に保つために必須であると考えられている。特に、ユビキチンリガーゼの一つである SCF ユビキチンリガーゼ及び APC ユビキチンリガーゼは、細胞周期、発生、分化、転写制御をはじめとした様々な細胞増殖の過程を制御しており、このユビキチン化の異常は癌をはじめとした様々な疾患を引き起こす。

SCF ユビキチンリガーゼ及び APC/C ユビキチンリガーゼ (Anaphase promoting complex or cyclosome) の細胞機能制御の全体像を把握するため、ひいては、ユビキチン化の異常に起因する病態の原因解明及び治療法を開発するためには、ユビキチン化の標的タンパク質を同定することが不可欠である。しかし、SCF ユビキチンリガーゼはタンパク質分解系の一つであるために、その標的タンパク質の半減期が極めて短いため、標的タンパク質の同定は極めて困難である。

SCF ユビキチンリガーゼは、Skp1、Cul1 (出芽酵母では Cdc53)、Skp1 との結合モチーフ F-box を持つ F-box タンパク質、及び Rbx1 から構成されるユビキチンリガーゼであり、F-Box は Skp1 との結合を介して Cul1 の N 末端側に結合し、Rbx1

が触媒部位であり、Rbx1 は Cul1 の C 末端側に結合している。この中で、ユビキチン化の標的タンパク質の認識（結合）を行う役割を果たすのが、F-box モチーフを持つ F-box タンパク質である。

F-box タンパク質は、F-box モチーフで SCF ユビキチンリガーゼのコアと結合する。この F-box モチーフ以外に、標的タンパク質結合領域を持ち、ここで、標的タンパク質を結合する。ゲノム解析の結果、複数の F-box タンパク質が存在することが明らかになっている。また、それぞれの F-box タンパク質が、異なる標的タンパク質と結合することが遺伝的な解析から明らかになっている。

ところで、タンパク質間相互作用を検出する方法として、いくつか知られているが、好適には、酵母 2-ハイブリッド (Two-hybrid) システムという手法が一般的に用いられる。

Two-hybrid システムは、転写因子 Gal4 の活性に、DNA 結合ドメイン (DB) と転写活性化ドメイン (AD) の二つが必要であることを利用した系である (非特許文献 1)。

あるタンパク質 A とタンパク質 B とが相互作用をするかどうかを調べるために、まず、転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインとタンパク質 A の融合タンパク質 (DB-A) と、転写活性化ドメインとタンパク質 B の融合タンパク質 (AD-B) を酵母内で発現させる。DB-A 及び AD-B はそれぞれ単独では転写因子としては機能できないが、もし、A と B が結合すれば、転写活性に必要な DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインの二つ持つことになるので、転写因子として機能することができる。したがって、レポーター遺伝子の発現を調べることにより、A と B が結合するのかを容易に調べることができる。

この時、B として遺伝子ライブラリーを用いれば、A と結合する未知のタンパク質をスクリーニングできる。

同様に、APC/C ユビキチンリガーゼも複数のサブユニットから構成される複合体であり、標的タンパク質は、APC/C ユビキチンリガーゼの標的蛋白質結合サブユニットと結合する。標的蛋白質結合サブユニットとしては、Cdc20 及び Hct1 が知られている。

特許文献 1 米国特許第 5283173 号

非特許文献 1 Fields S and Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interaction. Nature 340:245-246.

非特許文献 2 Gyuris J, Golemis EA, Chertkov H, Brent R. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. Cell 75:791-803.

発明の開示

本願出願は、SCF ユビキチンリガーゼ又は APC/C ユビキチンリガーゼによってユビキチン化されるタンパク質をスクリーニングする実験系を開発し、これを用いてユビキチン化の標的タンパク質を同定することを課題とする。

SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質は、F-box タンパク質と結合するので、F-box タンパク質と結合するタンパク質として標的タンパク質を同定できる可能性がある。このような場合に、タンパク質間相互作用を検出する Two-hybrid システムという手法が一般的に用いられる。

しかしながら、ユビキチン経路で分解されるようなタンパク質の場合には、従来の方法では、タンパク質間相互作用を検出することが困難であった。

SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を A として、F-box タンパク質を用いてスクリーニングし、B が標的タンパク質であるとする、Two-hybrid システムでは、F-box タンパク質と標的タンパク質 B が結合し、レポーター遺伝子の発現がおこることが期待される。

しかし、F-box タンパク質は標的タンパク質と結合すると、直ちに標的タンパク質 B をユビキチン化し分解へと導く。その結果、レポーター遺伝子の発現を誘導するより前に、標的タンパク質 B が分解されてしまうので、レポーター遺伝子の発現を活性化するには至らない。その結果、見かけ上、結合してないように見えることになる。したがって、標的タンパク質を同定するためには、結合の検出前に標的タンパク質が分解されるという問題点を克服する必要がある。

また、標的タンパク質が同定されたら、この実験系を、ユビキチン化を促進あるいは抑制する薬剤のスクリーニングにも応用することができる。

従来の Two-hybrid system を用いて、F-box と結合するタンパク質として、ユ

ユビキチン化の標的タンパク質を同定することは困難であり、成功例は報告されていない。

しかし、以下の方法で、標的タンパク質を安定化することにより、ユビキチン化の標的タンパク質を同定することが可能となることを見いだした。

本願発明者は、酵母 two hybrid スクリーニング系に、(1) 完全長の F-box タンパク質ではなく、Skp1 との結合領域であると考えられている F-box モチーフを、全体あるいは Skp1 と結合できなくなる程度を欠失した変異型 F-box タンパク質を bait として用い、更に (2) 標的タンパク質の分解能が低下した変異株（例えば、温度感受性変異株あるいは欠失変異株）を用いることにより、標的タンパク質を安定化でき、結果としてスクリーニングできることを見出して、本願発明をなしたものである。

(1) F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質を bait として用いることにより、標的タンパク質と変異型 F-box タンパク質が結合しても SCF ユビキチンリガーゼのコアに Skp1 を介して結合することがないので、ユビキチン化されず、酵母内での分解が遅れることとなる。

(2) ただし、変異型 F-box タンパク質を酵母に導入したのみでは、酵母内の野生型の F-box タンパク質と標的タンパク質が結合し分解されることとなる。そこで、酵母内の当該 F-box タンパク質を欠失させる又は条件依存的、例えば温度依存的に不活化することにより、F-box タンパク質と標的タンパク質の存在時間を延長できたものである。

これにより、標的タンパク質をスクリーニングするための実験系を、従来の手法である酵母 Two-hybrid システムを改良することにより開発できたものである。

この実験手法を用いて、出芽酵母ゲノムライブラリーを用いて、SCF ユビキチンリガーゼ (F-box タンパク質 Cdc4) の新規の標的タンパク質を 2 種類同定することに成功した。

また、この手法を用いて、ヒトの SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質で、カルシウム制御因子として機能するタンパク質から、そのユビキチン化に必要なヒト F-box タンパク質を同定した。

また、本発明の方法により、APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同

定することができる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2004-279216 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、F-box タンパク質として Cdc 4 を用いた場合の従来の two hybrid システムによる標的タンパク質の検出可能性を示す図である。

図 2 は、SCF ユビキチンリガーゼ標的タンパク質の探索のための 2-ハイブリッドシステムの改良を示す図である。

図 3 は、SCF ユビキチンリガーゼ標的タンパク質の探索のため 2-ハイブリッド系の改良 (Cdc4 と Sic1)、温度感受性変異株あるいは欠失変異株を用いて F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質を bait として用いる標的タンパク質のスクリーニングの可能性の検証を示す図である。

図 4 は、Cdc4 の結合特性を利用した非特異的な相互作用を与えるクローンの除去を示す図である。

図 5 は、標的タンパク質の安定化を指標とした非特異的な相互作用を与えるクローンの除去を示す図である。

図 6 は、本実験系で同定されたタンパク質を示す図である。

スクリーニングの手順としては、安定化された状態でのスクリーニングをし、False positive を、(1) 結合特異性及び(2)安定化を指標とする 2 つの異なる特異性を利用して、除去する。次に (3) 蛋白質の半減期を野生株 と cdc4 変異株とで比較することにより、標的タンパク質であることを確認する。

図 7 は、プロテアソームの温度感受性変異変異 (pre1-1 株) をスクリーニングの宿主として用いることができることを示す図である。なお、この場合には、Cdc4-dF および Cdc4 を用いることもできる。図 7 では Cdc4 を用いた場合について示した。また、Cdc 4 とは異なる F-box タンパク質 Grr1 とその標的タンパク質 Cln2 の結合も、この方法で検出することに成功した。言い換えれば、他の F-box にも適用できる。

図 8 は、APC/C の標的タンパク質の同定のための方法論を示す図である。C1b2

が安定化される条件では Hct1 と Clb2 の結合を検出できることを示している。
なお、APC/C との結合領域である C-box を除去した Hct1-dC を bait として用いている

図 9 は、本実験系で同定されたタンパク質を示す図である。

図 10 は、SCF および APC/C の模式図を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のユビキチンリガーゼ標的タンパク質スクリーニング方法は、例えば、Two-hybrid system であれば、種々の Two-hybrid system を基礎として、改良した系を利用することができる。Two-hybrid system としては、酵母、原核生物、哺乳細胞を用いる系が知られている。

本発明のユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法には、

- (1) 標的タンパク質の分解能が低下した細胞を、
- (2-a) ユビキチンリガーゼを構成するサブユニットのうち標的タンパク質と結合するサブユニット又は変異型の該結合サブユニット及第 1 の領域を含む第 1 の融合タンパク質をコードする遺伝子、並びに
- (2-b) 標的タンパク質候補及び第 2 の領域を含む第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子、で形質転換して得られる
- (3) 第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質が結合すれば第 3 の遺伝子の発現を活性又は抑制することができる形質転換細胞用いて、ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法が含まれる。

ここで、ユビキチンリガーゼとしては、SCF ユビキチンリガーゼ及び APC/C ユビキチンリガーゼなどが挙げられる。

また、第 1 の融合タンパク質中の第 1 の領域及び第 2 の融合タンパク質中の第 2 の領域の組み合わせとしては、第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質が細胞内で結合するか否かを検出する既知の方法（以下既知の *in vivo* タンパク質相互作用検出方法という）において用いられる組み合わせを用いることができ、例えば、(イ) 転写因子の DNA 結合領域及び転写因子の活性化領域、具体的には、(ロ) 転写因子 Gal4 の DNA 結合領域及び転写因子 Gal4 の活性化領域、(ハ) 大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域と転写因子 B42 の活性化領域 (ニ) Gal4 の

DNA 結合領域及び V16 の活性化領域、が挙げられ、更に、(ホ) 転写因子の DNA 結合領域及び転写因子の抑制化領域、(ヘ) N-intein 及び C-intein、(ト) SOS タンパク質及び Myristylation signal、並びに (チ) カルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T25 フラグメント及びカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T17 フラグメント、が挙げられる。

より具体的には、本発明の方法は、例えば、第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質が細胞内で相互作用、言い換えれば結合又は会合することにより第 3 の遺伝子の発現を活性化又は抑制させ、該第 3 の遺伝子の活性化また抑制を検出することにより、第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質が細胞内で結合するか否かを検出する既知の方法において、(1-a) 前記第 1 の融合タンパク質は、F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質 A 及び転写因子の DNA 結合ドメイン（以下 DB と記載）を含む融合タンパク質であり、及び(1-b) 前記第 2 の融合タンパク質は、F-box の標的タンパク質 B と転写因子の活性化ドメイン（以下 AD と記載）との融合タンパク質であり、(c) 前記細胞は、標的タンパク質の分解が低下した細胞であって、該細胞内で、第 1 の融合タンパク質の A 領域と第 2 の融合タンパク質の B 領域が結合することにより第 3 の遺伝子の発現を活性又は抑制することができる細胞であり、該細胞を用いて SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質同定する方法を包含している。

I. 上記の既知 *in vivo* タンパク質相互作用検出方法としては、例えば以下の方法が含まれる。

(イ) 転写因子 Gal4 の DNA 結合領域と活性化領域を用いる two-hybrid 法：第 1 の融合タンパク質遺伝子の BD 領域が転写因子 Gal4 の DNA 結合領域であり、第 2 の融合タンパク質の AD 領域が転写因子 Gal4 の活性化領域であり、第 3 の遺伝子がレポーター遺伝子であり、当該転写因子が欠損した GAL4(-) 株出芽酵母酵母を用いる方法。具体的には、DNA 結合領域が Gal4 の DNA 結合領域であり、前記活性化領域が Gal4 の活性化領域であり、変異株細胞が、GAL4 (-) 株出芽酵母である方法。（米国特許第 5283173 号、Fields S and Song O. Nature 340:245-246 参照。）

(ロ) 大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域と転写因子 B42 の活性化領域を用い

る two-hybrid 法：第 1 の融合タンパク質遺伝子の BD 領域が大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域であり、第 2 の融合タンパク質の AD 領域が転写因子 B42 の活性化領域であり、第 3 の遺伝子がレポーター遺伝子であり、特に転写因子を欠損しない出芽酵母酵母を用いる方法。(OriGene 社 DupLEX-A Yeast 2-ハイブリッドシステムキット)

(ハ) 哺乳類細胞 two-hybrid 法：第 1 の融合タンパク質遺伝子の BD 領域が Gal4 の DNA 結合領域であり、第 2 の融合タンパク質の AD 領域が V16 の活性化領域、第 3 の遺伝子がレポーター遺伝子であり、哺乳動物細胞 HeLa である方法。(Clontech 社 Matchmaker 哺乳類細胞 2-ハイブリッドアッセイキット)

(ニ) 転写因子抑制：第 1 の融合タンパク質遺伝子の第 1 の領域が転写因子の DNA 結合領域であり、第 2 の融合タンパク質の第 2 の領域が転写因子の抑制化領域である方法。(米国特許第 5885779 号参照。)

(ホ) タンパク質トランスプライシング two hybrid 法：第 1 の融合タンパク質遺伝子の第 1 の領域に相当する領域が N-intein であり、第 2 の融合タンパク質の第 2 の領域が C-intein である方法。(米国特許第 6562576 号参照。)

(ヘ) CytoTrap (TM) 法：前記第 1 の融合タンパク質遺伝子の第 1 の領域に相当する領域が SOS タンパク質であり、第 2 の融合タンパク質の第 2 の領域が Myristylation signal で、変異株細胞が、cdc25H 株である方法。

(ト) 酵素分子の 2 領域を用いる方法：第 1 の融合タンパク質の BD 領域に相当する領域が酵素の第 1 の領域(又はフラグメント)あり、第 2 の融合タンパク質の AD 領域に相当する領域領域が酵素の第 2 の領域(フラグメント)である、具体的には、前記酵素の第 1 の領域がカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T25 フラグメントであり、前記酵素の第 2 の領域がカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T17 フラグメントであり、前記変異株がカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼ欠損株細菌である方法。(PRONAS 95 : 5752-5756)

以下、SCF ユビキチンリガーゼの標的蛋白質同定法を中心に説明するが、APC/C ユビキチンリガーゼの標的蛋白質を同定する方法も、F-Box 蛋白質に代えて、C-Box 蛋白質(たとえば、Hct1, Cdc20)を用いて同様に行うことができる。(図 10 参照。)C-box タンパク質は、APC/C ユビキチンリガーゼと結合するのに必要な

C-box モチーフを持つタンパク質で、APC/C ユビキチンリガーゼによるユビキチン化において、標的タンパク質を結合するタンパク質である。

II. 第 1 の融合タンパク質をコードする遺伝子

第 1 の融合タンパク質は、F-box タンパク質又は変異型 F-box タンパク質及第 1 の領域を含んでいる。

II-1. F-box タンパク質

F-box タンパク質としては、SCF ユビキチンリガーゼを構成する F-box タンパク質であれば、いずれのタンパク質であっても本願発明に用いることができる。具体的には、酵母であれば、SCF ユビキチンリガーゼのサブユニットとして機能することが知られているものは、Cdc4、Met30、Grr1、YJL204C、YJL149W、YLR097C、YLR224W、YLR368W、YML088W、YDR131C、YDR306C、YNL311C、YOR080W、Ctf13 である。(Proteins: Structure, function, and bioinformatics 54 : 455-467)。ヒトであれば、70 種以上知られている。

II-2. F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質をコードする変異型 F-box 遺伝子 :

F-box モチーフとしては、例えば、アミノ酸 1 文字表記で表すと、(LI)XX(LV)PXE(ILV)LXX(IV)LXXLDXXDLLDDVCKRWXX(LIV)IXXXX(LV)XXXL という配列で表される F-box モチーフが挙げられる (Trends in Genetics. 14:236-243(1998))。F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質とは、上記 F-Box タンパク質において、前記モチーフをすべて欠失させた変異、又は Skp1 と結合できなくなる程度、前記 F-b o x モチーフのアミノ酸配列において 1 以上アミノ酸が、好ましくは 1 ないし数個のアミノ酸が、欠失、付加又は置換から選ばれる少なくとも 1 以上の変異したさせた変異型 F-Box タンパク質があげられる (以下 F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質と記載する)。

なお、() 内はアミノ酸配列中の同じ位置を意味する。また、アミノ酸一文字表記では、L はロイシン、I はイソロイシン、V はバリン、D はアスパラギン酸、C はシステイン、K はリジン、R はアルギニン、W はトリプトファンを意味する。X は任意のアミノ酸を意味する。ただし、指定されたアミノ酸と必ずしも同一である必要はない。

なお、ここで必要な変異型 F-box タンパク質については、Skp1 と結合できないことが必要である。したがって、F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質だけでなく、Skp1 と結合できなくなった変異型 F-box タンパク質でも有効であることはいうまでもない。

II-3. 第 1 の融合タンパク質は、F-box タンパク質又は F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質及び上記第 1 の領域から構成される。

ここで、第 1 の融合タンパク質は F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質を含むことが好ましいが、特に、スクリーニングに使用する細胞が、F-box タンパク質遺伝子の変異株を用いる場合には、F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質を使用することが必須である。

また、第 1 の領域としては、上記したように、(イ) 転写因子の DNA 結合領域又は転写因子の活性化領域、具体的には、(ロ) 転写因子 Gal4 の DNA 結合領域若しくは転写因子 Gal4 の活性化領域、(ハ) 大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域若しくは転写因子 B42 の活性化領域、(ニ) Gal4 の DNA 結合領域若しくは V16 の活性化領域、が挙げられ、更に、(ホ) 転写因子の DNA 結合領域若しくは転写因子の抑制化領域、(ヘ) N-intein 若しくは C-intein、(ト) SOS タンパク質若しくは Myristylation signal、並びに (チ) カルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T25 フラグメント若しくはカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T17 フラグメント、が挙げられる。

III. 第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子

第 2 の融合タンパク質は、標的タンパク質候補及び第 2 の領域を含む。

III-1. 標的タンパク質及び標的タンパク質候補

ある F-box を構成成分とする SCF ユビキチンリガーゼによりユビキチン化される標的タンパク質としての候補がすでにある場合は、当該候補を用いることができる。

また、標的タンパク質候補をコードする遺伝子としては、ゲノムライブラリーあるいは cDNA ライブラリーを用いることもできる。

III-2. 第 2 の融合タンパク質の第 2 の領域としては、上記した第 2 の領域が挙げられる。例えば、(イ) 転写因子の DNA 結合領域又は転写因子の活性化領域、具体

的には、(ロ) 転写因子 Gal4 の DNA 結合領域若しくは転写因子 Gal4 の活性化領域、(ハ) 大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域若しくは転写因子 B42 の活性化領域、(ニ) Gal4 の DNA 結合領域若しくは V16 の活性化領域、が挙げられ、更に、(ホ) 転写因子の DNA 結合領域若しくは転写因子の抑制化領域、(ヘ) N-intein 若しくは C-intein、(ト) SOS タンパク質若しくは Myristylation signal、並びに (チ) カルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T25 フラグメント若しくはカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T17 フラグメント、で、それぞれの場合に第 1 の領域でないものが挙げられる。それぞれの場合に第 1 の領域とは異なるものとは、上記(イ)についていえば、第 1 の領域として「転写因子の DNA 結合領域」を採用した場合には、第 2 の領域は「転写因子の活性化領域」となり、逆に、第 1 の領域として「転写因子の活性化領域」を採用した場合には、第 2 の領域は「転写因子の DNA 結合領域」となる。(ロ)から(チ)についても同様である。

IV. 標的タンパク質の分解が低下した細胞

標的タンパク質が F-box タンパク質と結合しても、(1) ユビキチン化されない又は (2) ユビキチン化されてもタンパク質分解を受けないように変異された細胞があげられる。

(1) 細胞内の内在性の F-box タンパク質により標的タンパク質がユビキチン化されないようにする。

(イ) F-box タンパク質の中で必須遺伝子でなければ、細胞から欠失させることにより、若しくは必須の遺伝子であれば、F-box タンパク質の発現を温度感受性にする変異を起こさせることにより調製できる。

F-box タンパク質遺伝子の中で必須遺伝子であるものは CDC4、MET30、CTF13 の 3 種類である。これらの必須遺伝子の温度感受性変異株は、分離した研究者より分与を受けるか、あるいは、Kanemaki et al, Nature 423 (1993) 720-724 の方法で温度感受性株を作製することが可能である。

また、それ以外の F-box タンパク質遺伝子の場合には、これらの遺伝子の欠失変異株を用いることができる。この欠失変異株は、例えば、Longtine et al, Yeast 14, 953-961 (1998) に記載される方法など、常法で調整することができる。あるいは、OPEN BIOSYSTEM 社、EUROSCARF から購入することが可能である。

(ロ) SCF ユビキチンリガーゼを構成する F-box タンパク質遺伝子以外の遺伝子の温度感受性変異株（例えば、cdc34 株、cdc53 株、skp1 株）を用いることも可能である。これらの変異株では標的タンパク質のユビキチン化活性が著しく低下する。これらの必須遺伝子の温度感受性変異株は、上記と同様に、分離した研究者より分与を受けるか、あるいは、Kanemaki et al, Nature 423 (2993)720-724 の方法で温度感受性株を作製することが可能である。

(2) ユビキチン化されても、タンパク質分解を受けないように、タンパク質分解能が低下した変異株、又はタンパク質分解阻害剤を与えられた細胞を用いることができる。具体的には、プロテアソームの変異株、あるいはタンパク質分解阻害剤 MG132 (SIGMA などから購入可能)を用いる。

V. 以下に Two-hybrid 法として、大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域と転写因子 B42 の活性化領域を用いる two-hybrid 法に基づいてまず説明するが、本発明は、これに限られるものではない。

V-1. 出芽酵母スクリーニング系による出芽酵母 SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定

1-1. F-box 変異株酵母の調製

出芽酵母には F-box タンパク質が 17 種類存在する事が知られている。このうち、SCF ユビキチンリガーゼのサブユニットとして機能することが知られているものは、Cdc4、Met30、Grr1、YJL204C、YJL149W、YLR097C、YLR224W、YLR368W、YML088W、YDR131C、YDR306C、YNL311C、YOR080W、Ctf13 である。(Proteins: Structure, function, and bioinformatics 54: 455-467)。

まず、これらの F-Box の変異株については以下の方法で作製することが可能である。

上記 F-box タンパク質の中で必須遺伝子であるものは Cdc4、Met30、Ctf13 の 3 種類である。これらの必須遺伝子の温度感受性変異株は、分離した研究者より分与を受けるか、あるいは、Kanemaki et al, Nature 423 (2993)720-724 の方法で温度感受性株を作製することが可能である。

また、それ以外の F-box 遺伝子の場合には、これらの遺伝子の欠失変異株を用いることができる。この欠失変異株は、例えば、Longtine et al,

Yeast14, 953-961 (1998)に記載される方法など、常法で調整することができる。あるいは、OPEN BIOSYSTEM 社、EUROSCARF から購入することが可能である。

1-2. F-box モチーフに変異を導入した変異型 F-box タンパク質をコードする遺伝子

F-box モチーフに変異を導入した変異型 F-box タンパク質に関しては、例えば、F-box モチーフに相当する部分の遺伝子領域内を、遺伝子組み換え技術により欠失させればよい。具体的には、F-box モチーフである「(LI)XX(LV)PXE(ILV)LXX(IV)LXXLDXXDLLDLDVCKRWXX(LIV)IXXXX(LV)XXXL」の配列を欠失させた配列、具体的には、出芽酵母の F-box タンパク質の一つである Cdc4 の場合には、配列番号 1 の配列において 282 アミノ酸残基から 320 アミノ酸残基までを欠失させた配列を用いることができる。あるいは、Skp1 と結合できなくなった変異型 F-box タンパク質が知られている場合にはこの変異型 F-box タンパク質を用いることもできる。

(1-1) と (1-2) を組み合わせてスクリーニングを行えば、Cdc4 の標的タンパク質の場合と同様に、それぞれの F-box が結合する標的タンパク質を同定することが可能である。

1-3. 酵母ライブラリーの調製

出芽酵母のゲノムライブラリー、cDNA ライブラリーを、pJG4-5 等の発現ベクターにクローン化して調製することができる。

1-4. 酵母 two hybrid ハイブリッド系の調製

1-4-1. 第 1 の融合蛋白質・Bait の調製

LexA の DNA 結合ドメインを組み込んだ発現ベクターに変異型 F-box 遺伝子を組み替え LexA の DNA 結合ドメインと変異型 F-box を融合させたタンパク質を発現することができるベクターを調製する。発現ベクターとしては、例えば、pGilda などを用いることができる。

1-4-2. 第 2 の融合タンパク質・ライブラリーの調製

B42 の転写活性化ドメインを組み込んだ発現ベクターに酵母遺伝子ライブラリー中の遺伝子を組み替え B42 の転写活性化ドメインと種類の試験対象タンパク質を融合させたタンパク質を発現することができるベクターライブラリーを調製す

る。発現ベクターとしては、pJG4-5 などを用いることができる。

1-4-3. bait とベクターライブラリーの酵母変異株への導入

F-box タンパク質遺伝子の変異株に、bait とベクターライブラリー及びレポーター遺伝子を導入する。周知の酵母へのベクター導入方法を利用することができるが、例えば、Gietz RD, Schiestl RH *Methods Mol. Cell Biol* 5:255-269 (1995) に記載の方法を用いることができる。

1-5. 標的タンパク質の同定

陽性株のスクリーニング工程と false positive を排除する工程からなる。

1-5-1. スクリーニング

F-box 欠失変異株をバイトとライブラリーで形質転換し、得られた菌株 をコロニー形成させる。X-gal の含まれる合成培地を用いてレポーター遺伝子 LacZ を発現させ、その結果、青くなったコロニーをピックアップする。

1-5-2. 選抜されたプラスミドの精製

常法に従って、プラスミドを分離し大腸菌 KC8 株を形質転換し、出てきたコロニーからプラスミドを抽出精製する。

1-5-3. 再現性の確認

必要に応じ再現性を確認する。得られたクローンを再び bait、レポーター遺伝子とともに F-box 変異株に導入し、同様の要領でフィルターアッセイを行う。再現性のないものは排除する。

1-5-4. 擬陽性の排除

更に必要に応じ、擬陽性を次のように排除することができる。

F-box タンパク質は F-box モチーフ以外に WD (トリプトファン-アスパラギン酸) 40 リピートあるいは LRR (Leucine rich repeat) などの、標的タンパク質を結合するモチーフを持っている。例えば、Cdc4 の場合には WD40 を持つ。また、別の F-box タンパク質 Met30 も Cdc4 と類似の WD40 を持つが、Cdc4 と Met30 は別の標的タンパク質の結合に関与する。そこで、Cdc4 の WD と Met30 の WD を置き換えたキメラ分子 Cdc4-dF-Met30-WD を pGilda にクローン化する (pGilda-Cdc4-dF-Met30-WD)。Cdc4 の標的タンパク質をスクリーニングする場合では、pGilda-Cdc4-dF のかわりに pGilda-Cdc4-dF-Met30-WD を導入した上記

F-box 欠失変異株酵母に、(1) で分離したプラスミドを導入し、フィルターアッセイを行い、青くならないものを選択する。

Met30 以外の F-box タンパク質の標的タンパク質結合領域を用いることが可能であることはいうまでもない。

Cdc4 以外の F-box タンパク質の場合には、該 F-box タンパク質の標的タンパク質結合領域が WD40 の場合には、該 F-box タンパク質以外の F-box タンパク質で標的タンパク質結合領域が WD40 である F-box タンパク質の WD40 を用いることができる。また、該 F-box タンパク質の標的タンパク質結合領域が LRR の場合には、該 F-box タンパク質以外の F-box タンパク質で標的タンパク質結合領域が LRR である F-box タンパク質の LRR を用いることができる。

1-5-5. 標的タンパク質の塩基配列

positive なシグナルを出すクローンを標的タンパク質をコードするクローンとして同定し、塩基配列を決定する。

1-6. ユビキチン化及びタンパク質分解の確認

同定された標的タンパク質が、実際にユビキチン化され、分解されているかどうかについても、必要に応じ検定することができる。

1-6-1. ユビキチン化による標的タンパク質の分解の確認 (1)

決定された標的タンパク質をコードする遺伝子の開始コドンから終止コドンの直前までを PCR 法により増幅する。増幅した DNA 断片と LacZ 遺伝子とを融合する。できたプラスミドを F-box 変異株、及び野生株に導入する。もし該タンパク質が特定の F-box に依存してユビキチン化/分解されるのであれば、該タンパク質と LacZ の融合タンパク質も、野生株では分解されるが、F-box 変異株では安定化される。そこで、コロニーを X-gal 含有合成培地でフィルターアッセイを行い、陽性（青色）クローンを残す。

1-6-2. ユビキチン化による標的タンパク質の分解の確認 (2)

同定された標的タンパク質が本当に SCF ユビキチンリガーゼに依存して分解されるのかをタンパク質レベルで半減期を比較することにより調べることができる。

タンパク質量については、Western blotting を行うことにより調べる。用いる抗体としては、すでに標的タンパク質の候補タンパク質の抗体がある場合には、

その抗体を用いてタンパク質を検出する。もし、抗体がない場合には、組み換え DNA の技術を用いて、短いアミノ酸配列（エピトープタグ）を標的タンパク質の候補タンパク質と融合し、エピトープ特異的抗体を用いて融合タンパク質を検出する。エピトープタグとしては、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来の 9 アミノ酸からなるペプチド（以下 HA と記載）、あるいは、ヒト c-myc タンパク質由来の 9E10 エピトープなどを用いる。ここでは、エピトープ特異的抗体を用いる場合を例にして説明する。

標的タンパク質とエピトープの融合タンパク質を、出芽酵母野生株及び出芽酵母 F-box タンパク質遺伝子の変異株で発現させる。ここで、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide (SIGMA から購入) を終濃度 50 μ g/ml 加えることにより、融合タンパク質の発現を停止させ、その直後から例えば 15 分間隔で細胞を回収し、タンパク質抽出液を作製する。タンパク質抽出液の作製は、例えば、Yeong FM et al. Mol. Cell 5:501-511 (2000) に記載の方法などを用いる。次に、Western Blotting を行い、エピトープ特異的抗体を用いて融合タンパク質の量を調べる。もし、調べているタンパク質が標的タンパク質ならば、野生株では不安定であり半減期が短い、変異株では安定化され半減期が長くなるはずである。この条件を満たすものを標的タンパク質として再確認できる。

V-2. 出芽酵母スクリーニング系によるヒト SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定

酵母の場合と同様に、ヒトなど哺乳類の SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定することができる。

今のところ、酵母の F-box タンパク質とヒトの F-box タンパク質とで、機能的な対応についてわかっていない。そこで、標的タンパク質の分解が低下した変異細胞として、SCF ユビキチンリガーゼを構成する F-box タンパク質遺伝子以外の遺伝子の温度感受性変異株（例えば、cdc34 株、cdc53 株、skp1 株）を用いることができる。あるいは、ユビキチン化されたタンパク質の分解を行うプロテアソームの変異株（温度感受性 pre1-1 変異株）を用いること、あるいは、タンパク質分解阻害剤であるプロテアソームインヒビター例えば MG132 (SIGMA から購入可能) など処理した細胞を用いることができる。プロテアソームの阻害剤 MG132

(SIGMA) を用いる場合には、さらに、erg6 変異株（膜脂質合成酵素の変異株で、プロテアソームの阻害剤 MG132 を含む薬剤の膜透過活性があがった変異株）を用いることができる。

第 1 の融合タンパク質をコードする遺伝子としては、ヒト F-box タンパク質あるいは F-box モチーフを欠失したヒト F-box タンパク質及び第 1 の領域からなる融合タンパク質をコードする遺伝子を用いることができる。

第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子としては、ヒト標的タンパク質の候補及び第 2 の領域からなる融合タンパク質をコードする遺伝子を用いることができる。

V-3. 出芽酵母スクリーニング系による APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定

SCF ユビキチンリガーゼの場合と同様に、APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定することができる。

標的タンパク質の分解が低下した変異として、APC/C ユビキチンリガーゼを構成するサブユニットの遺伝子の温度感受性変異株あるいは欠失変異株を用いることができる。あるいは、ユビキチン化されたタンパク質の分解を行うプロテアソームの変異株（例えば温度感受性 pre1-1 変異株など）を用いること、あるいは、プロテアソームインヒビター例えば MG132 (SIGMA から購入可能) などで処理した細胞を用いることができる。

プロテアソームの阻害剤 MG132 (SIGMA) を用いる場合には、さらに、erg6 変異株（膜脂質合成酵素の変異株で、プロテアソームの阻害剤 MG132 を含む薬剤の膜透過活性があがった変異株）を用いることができる。

第 1 の融合タンパク質をコードする遺伝子としては、C-Box として Cdc20 又は Hct1（あるいはこれらのヒトホモログ）若しくはこれらの変異体及び第 1 の領域からなる融合タンパク質をコードする遺伝子を用いることができる。上記変異体としては、C-Box モチーフを欠失した遺伝子、たとえば、Hct1 の C-box モチーフを含む領域を欠損させた変異体を用いることができる。

C-box モチーフとしては、例えば、アミノ酸 1 文字表記で表すと、DR(F/Y)IPXR という配列で表される C-box モチーフが挙げられる (The EMBO Journal Vol.20,

No. 18, pp. 5165-5175)。C-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質とは、上記 C-Box タンパク質において、前記モチーフをすべて欠失させた変異、又は APC/C と結合できなくなる程度、前記 C-b o x モチーフのアミノ酸配列において 1 以上アミノ酸が、好ましくは 1 ないし数個のアミノ酸が、欠失、付加又は置換から選ばれる少なくとも 1 以上の変異したさせた変異型 C-Box タンパク質があげられる（以下 C-box モチーフを欠失した変異型 C-box タンパク質と記載する）。

なお、ここで必要な変異型 C-box タンパク質については、APC/C と結合できないことが必要である。したがって、C-box モチーフを欠失した変異型 C-box タンパク質だけでなく、APC/C と結合できなくなった変異型 C-box タンパク質でも有効であることはいうまでもない。

第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子としては、標的タンパク質候補及び第 2 の領域からなる融合タンパク質をコードする遺伝子を用いることができる。

VI. その他のスクリーニング系を利用した SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定方法

VI-1. SOS/Ras システム

two-hybrid システムにおいて、bait（餌）タンパク質はヒト SOS タンパク質との融合タンパク質として、標的タンパク質はミリスチル化シグナルとの融合タンパク質として cdc25H 変異株酵母内で発現させるシステムで、bait タンパク質と標的タンパク質が結合した場合に、SOS タンパク質が膜状にある Ras を活性化し、37 度での生存ができるというものである。

本システムにおいても、cdc25H 変異株酵母にさらに、常法により F-box 変異させた F-box/cdc25H 変異株酵母を調製し、これに、F-box モチーフを欠失させた F-box タンパク質を融合したヒト SOS タンパク質と、標的タンパク質を含むライブラリーと融合したミリスチル化シグナルとの融合タンパク質をコードする遺伝子で形質転換することにより、標的タンパク質をスクリーニングすることができる。

VI-2. ほ乳類 Two-Hybrid 法を利用する方法

ほ乳類 Two-Hybrid 法を利用する。

two-hybrid システムにおいて、bait (餌) タンパク質は酵母 Gal4 の DB との融合タンパク質として、標的タンパク質は V16 の AD との融合タンパク質として HeLa 細胞で発現させるシステムで、bait タンパク質と標的タンパク質が結合した場合に、レポーター遺伝子 SEAP の発現が観察されるというものである。

本システムにおいても、Gal4 の DB と F-box モチーフを欠失させた F-box タンパク質を融合したタンパク質と、標的タンパク質を含むライブラリーと融合した V16 の AD との融合タンパク質をコードする遺伝子で形質転換することにより、標的タンパク質をスクリーニングすることができる。この場合、ヒトなど哺乳類の SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定に用いることが可能である。

今のところ、酵母の F-box タンパク質とヒトの F-box タンパク質とで、機能的な対応についてわかっていない。そこで、細胞の、標的タンパク質の分解能を低下させる手段として、プロテアソームインヒビターを用いることができる。あるいは、siRNA の手法を用いて、SCF ユビキチンリガーゼあるいはプロテアソームの活性を低下させた細胞を用いることも可能である (例えば Watanabe N et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 101:4419-4424 (2004))。

このほ乳類 Two-Hybrid 法を利用する方法は、例えば V-2 の酵母を用いたヒト標的タンパク質スクリーニングにおいて明らかにした標的タンパク質と、当該ヒト F-box タンパク質の結合を、ヒト HeLa 細胞で検証することにも用いることができる。

あるいは、ヒト SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質であることがわかっているが、それに対応する F-box タンパク質が明らかでない場合にも用いることができる。この場合、ヒト F-box タンパク質遺伝子のライブラリーと Gal4 の DB との融合タンパク質遺伝子、及び標的タンパク質と V16 の AD との融合タンパク質をコードする遺伝子で HeLa 細胞を形質転換し、プロテアソームインヒビターの存在化でレポーター遺伝子 SEAP の発現を調べることができる。もちろん、ヒト F-box タンパク質遺伝子のライブラリーと V16 の AD との融合タンパク質遺伝子、及び、標的タンパク質と Gal4 の DB との融合タンパク質をコードする遺伝子を用いても同様に実験できることはいうまでもない。

SCF ユビキチンリガーゼの場合と同様に、APC/C ユビキチンリガーゼの標的タン

パク質の同定することができる。

以下に実施例を用いて、より具体的に本願発明を説明するが、本願発明が実施例に限定されるものではないことは言うまでもない。

[実施例]

以下の実施例、参考例で使用した出芽酵母菌株は次のとおりである。

野生株 W303 株 (ATCC200903 など)

TK-505 (Mat a cdc4-1 sic1)

cdc4-1 株は ATCC(200625、208543、208544)から購入することが可能である。また必要に応じて野生株と掛け合わせて使用する。

sic1 変異は、Longtine et al, Yeast14, 953-961(1998)の方法で導入した。

なお、このスクリーニングにおいては、sic1 変異が導入されている必要は全くない。

TK-542 (Mat a hct1)

hct1 変異は、Longtine et al, Yeast14, 953-961(1998)の方法で W303 株に導入した。

以下の実施例、参考例で使用するプラスミドは次のとおりである。

pGilda-Cdc4：市販されている pGilda(OriGene 社)に CDC4 全長を PCR で増幅後に BamHISalI で切断後クローン化した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、ATGGATCCCGATGGGGTCGTTTCCCTTAGC と CGGTCGACCAAAGACGTTATTAGGTCCCTC を用いた。

pGilda-Cdc4-dF：F-box モチーフ (CDC4 のアミノ酸残基 281-320) を欠失した Cdc4-dF を、pGilda にクローン化した。具体的には、PCR で CDC 4 のアミノ酸残基 1-281 を増幅後、BamHI EcoRI で切断した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、ATGGATCCCGATGGGGTCGTTTCCCTTAGC と CAGAATTCCAAAGACGTTATTAGGTCCCTC を用いた。

また、CDC 4 のアミノ酸残基 321 番から C 末端までをコードする DNA 配列を PCR で増幅した後、EcoRI SalI で切断した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、CGGAATTCATATCGGAAAATTTGTGAGCCC と CGGTCGACCAAAGACGTTATTAGGTCCCT を用いた。これら二つの DNA 断片を、BamHI SalI で切断した pGilda にクローン化した。

pGilda-Cdc4-dF-Met30WD : Cdc4 の 1-281 番のアミノ酸残基までと、Met30 の 228 番から C 末端までを融合して作製した Cdc4-dF-Met30WD を pGilda にクローン化した。Cdc4 の 1-281 番のアミノ酸残基までをコードする DNA 配列を PCR で増幅した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、ATGGATCCCGATGGGGTCGTTTCCCTTAGC と ACGCGCCGCTCAAAGACGTTATTAGGTCC を用いた。また、Met30 の 228 番から C 末端までをコードする DNA 配列は、PCR で増幅した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、AAGCGCCGCTGCGAGCAGCACATAGACAG と AGTCGACCTAATCATTGAGATCGAATTTG を用いた。

pJG4-5-ASC-SIC1 : PCR で増幅した出芽酵母 SIC1 全長を pJG4-5 に EcoRI NotI で切断後クローン化した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、AAGAATTCGGCGCGCCAATGACTCCTTCCA と TTGCGGCCGATGCTCTTGATCCCTAGATT を用いた。

出芽酵母ライブラリー : 出芽酵母の全 ORF (Open reading frame) を含むライブラリー (Ito et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 97:1143-1147 (2001)) のライブラリー部分を制限酵素 (AscI NotI) で切断し、pJG4-5-ASC-SIC1 の SIC1 部分と置き換えた。

pSH18-34 (レポーター遺伝子 LacZ を持つプラスミド : OriGene 社)

pURA3-Gallp-HA : pYES2 (Invitrogen) の GAL1promoter から CYC1 terminator までを PCR で増幅 (用いたプライマーは、AATCTAGACGGATTAGAAGCCGCCGAG と AATCTAGAGGCCGCAAATTAAGCCTTC である) し、YCplac33 (Gene, 74 (1998) 527-534、なお、出芽酵母のプラスミドで URA3 をマーカーとして持つものであれば基本的に代用可能で、例えば ATCC から購入可能な pRS306 等を用いることもできる。) の PvuII 部位にクローン化し (これを YC33G とした)、次に、この NotI SphI 部位に、

pFA5a-3HA-kanMX (Longtine et al, Yeast14, 953-961(1998)) を鋳型として HA エピトープを含む領域を PCR で増幅した DNA 断片をクローン化した (用いたプライマーは、CAAAATGTCTGCGGCCCATCTTTTACCCATACGAT と AAGCATGCGGCGCGCCTCAGCACTGAGC である)。なお、HA エピトープとの融合タンパク質発現用の出芽酵母プラスミドであればどれでも代用可能である。

pURA3-Sic1-LacZ : まず、大腸菌 LacZ 遺伝子を PCR で増幅後 (用いたプライマーは、TAGCGGCCGCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG と CCGCATGCTTATTTTGACACCAGACCAACTGG である)、NotI SphI で pURA3-Gallp-HA の HA をコードする領域と置き換えた。

pGilda-HCT1 : 市販されている pGilda (OriGene 社) に HCT1 全長を PCR で増幅後に BamHISalI で切断後クローン化した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、CCGGATCCCGATGTCCACAAACCTGAACCC と CCGTCGACCTAACGTATTTGATTAAATG を用いた。

pGilda-Hct1-dC : C-box モチーフを含む N 末端領域を欠失した Hct1-dC を、pGilda にクローン化した。具体的には、PCR で HCT1 のアミノ酸残基 99-566 を増幅後、BamHI EcoRI で切断した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、CCGAATTCGCACATGAACTTATAATAC と CCGTCGACCTAACGTATTTGATTAAATG を用いた。

pJG4-5-ASC-CLB2 ; PCR で増幅した出芽酵母 CLB2 全長を pJG4-5 に AscI NotI で切断後クローン化した。鋳型として用いた出芽酵母染色体 DNA は、Invitrogen より購入した。プライマーは、AAGGCGCGCCGATGTCCAACCCAATAGAAAT と GAGCGGCCGCTCATTCATGCAAGGTCATTA を用いた。

参考例 1

Sic1 は F-box として Cdc4 を持つ SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質であることがわかっているタンパク質である。そこで、two-hybrid システムで、F-box タンパク質として Cdc4 をもちいて bait を調製し、SiC1 との結合を検出で

きるか検討した。Two-hybridシステム (OriGene 社から購入した DupLEX-A Yeast 2-ハイブリッドシステムキットを使用 (I- (ロ) に記載) : (大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域と転写因子 B42 の活性化領域を用いる two-hybrid 法) を、pGilda-Cdc4 及び pJG4-5-ASC-SIC1 で常法により形質転換した。(図 1)。このようにユビキチン化の標的タンパク質の同定を行う場合には、通常の Two-hybrid システムでは不可能である。

実施例 1

TK-505 あるいは野生株を以下のプラスミドで形質転換し、得られたコロニーをメンブレン (hybond-N Amersham : 直径 88 mm) に移す。X-gal を含み、炭素源としてラフィノースとガラクトースを含む合成培地 (寒天培地) の上にのせ、許容温度 30℃あるいは非許容温度 37℃で 12hr 培養した (以下フィルターアッセイとする)。

レポーター遺伝子 LacZ を発現させ、その結果、コロニーが青くなるか調べた。

(i) 野生株を pSH18-34、pJG4-5-ASC-SIC1、及び pGilda-Cdc4 で形質転換し、許容温度 30℃で 24 時間培養した。

(ii) 野生株を pSH18-34、pJG4-5-ASC-SIC1、及び pGilda-Cdc4-dF で形質転換し、許容温度 30℃で 24 時間培養した。

(iii) TK-505 を pSH18-34、pJG4-5-ASC-SIC1、及び pGilda-Cdc4-dF で形質転換し、許容温度で 12 時間培養後、非許容温度 37℃で 12 時間培養した。

(iv) TK-505 を pSH18-34、pJG4-5-ASC-SIC1、及び pGilda-Cdc4-dF で形質転換し、許容温度 30℃で 24 時間培養した。

結果をそれぞれ、図 3 に示す。

(iii) のみ、POSITIVE なシグナルが得られた。

したがって、上記標的タンパク質の分解が低下した変異株を用いてスクリーニングを行うこと (温度感受性変異株あるいは欠失変異株)、及び、完全長の F-box タンパク質ではなく、F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質を bait として用いる (図 2 参照) ことという条件を同時に満たすことにより、標的タンパク質のスクリーニングが可能となることが判明した。

実施例 2

SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質のスクリーニング

出芽酵母ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

具体的には、

(1) 開発した実験系を用いたスクリーニングと、(2) 非特異的な相互作用を与えるクローンの除去及び標的タンパク質であることの確認からなる。(2) は、F-box タンパク質の結合特異性を利用した方法 (2-1) と、標的タンパク質の安定化を利用する方法 (2-2) とタンパク質の半減期を測定して、SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質であることを証明する (2-3)、という 3 段階を用いた。

(1) 開発した実験系を用いたスクリーニング

予め、TK505 株を pGilda-Cdc4-dF と pSH18-34 の二つで形質転換しておく。得られた菌株 (TK505 / pGilda-Cdc4-dF + pSH18-34) に、出芽酵母ライブラリーを導入した (常法に従う)。

コロニーをメンブレン (hybond-N Amersham : 直径 88 mm) に移し、X-gal を含み炭素源としてラフィノースとガラクトースを含む合成培地 (寒天培地) 上への、許容温度 30°C 12 時間保温した後に、非許容温度 37°C 12 時間保温 (以下フィルターアッセイとする) した。

レポーター遺伝子 LacZ を発現し、その結果、青くなったコロニーを培養し、常法に従って、プラスミドを分離し大腸菌 KC8 株 (Clonetechnology より購入した) を形質転換し、出てきたコロニーからプラスミドを抽出精製した。

再現性を確認するために、得られたクローンを再び TK505 / pGilda -Cdc4-dF + pSH18-34 に導入し、同様の要領でフィルターアッセイを行った。結果、再現性のないものは廃棄した。

(2) 非特異的な相互作用を与えるクローンの除去及び標的タンパク質であることの確認

(2-1) 結合の特異性を利用する方法

F-box タンパク質は F-box モチーフ以外に WD (トリプトファン-アスパラギン酸)

40 リピートあるいは LRR (Leucine rich repeat) などの、標的タンパク質を結合するモチーフを持っている。Cdc4 の場合には WD40 を持つ。また、別の F-box タンパク質 Met30 も Cdc4 と類似の WD40 を持つが、Cdc4 と Met30 は別の標的タンパク質の結合に関与する。そこで、Cdc4 の WD と Met30 の WD を置き換えたキメラ分子 Cdc4-dF-Met30-WD を pGilda にクローン化した (pLexA-Cdc4-dF-Met30-WD:Cdc4 の 1-281 番のアミノ酸残基と Met30 の 228 番から 640 番 (C 末端まで) を持つ)。

そこで、実施例 1 の pGilda-Cdc4-dF のかわりに pGilda-Cdc4-dF-Met30-WD を導入した株に、(1) で分離したプラスミドを導入し、フィルターアッセイを行い、青くならないものを選択した。SIC1 の場合の結果を図 4 に示す。ここまですべて positive なシグナルを与えるクローンの塩基配列を決定する。

(2-2) 標的タンパク質の安定化を利用する標的タンパク質であることの確認方法

標的タンパク質の候補遺伝子の開始コドンから終止コドンの直前までを PCR 法により増幅し、増幅された DNA 断片と、pUra3-SIC1-LacZ の SIC1 の部分とを置き換え、LacZ との融合タンパク質遺伝子発現用のプラスミドを作製した。できたプラスミドを cdc4 変異株、及び野生株に導入した。調べているタンパク質が Cdc4 に依存してユビキチン化/分解されるのであれば、LacZ と該タンパク質の融合タンパク質は、野生株では不安定である。一方、cdc4 変異株 (TK505 株) においては該タンパク質が安定化されるため融合タンパク質も安定化されるはずである。

そこで、コロニーをフィルターに移し、これを X-gal を含み炭素源としてラフィノースとガラクトースを含む合成培地 (寒天培地) 上におきフィルターアッセイを行う。ここで青くなるクローンを残す。図 5 に SIC1 の場合の結果を示した。

(2-3) タンパク質の半減期を測定して、SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質であることの確認

これまでの過程で得た ORF がコードするタンパク質が本当に Cdc4 に依存して分解されるのかをタンパク質レベルで半減期を比較することにより調べる。標的タンパク質の候補遺伝子の開始コドンから終止コドンの直前までを PCR で増幅し、pURA3-Gallp-HA にクローン化した。このプラスミドを用いて、出芽酵母野生株及び cdc4 変異株 (TK505 株) を形質転換した。

形質転換体をラフィノースを炭素源とする培地で培養後、細胞数が $1-2 \times 10^7$ 細胞程度まで培養した。ここで、ガラクトースを終濃度 2% となるように加え、ORF-HA がコードする融合タンパク質を生産させた。ガラクトースを加えてから 1 時間後に、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide (SIGMA から購入) を終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 加え、融合タンパク質の発現を停止させた。その直後から 15 分間隔で細胞を回収し、Yeong FM et al. Mol. Cell 5:501-511(2000)に記載の方法で、タンパク質抽出液を作製した。次に、Western Blotting を行い、anti-HA (12CA5) 抗体 (Roche より購入) を用いて融合タンパク質の量を調べた。野生株では不安定であるが、変異株では安定化されたものを標的タンパク質とした。

本スクリーニングで同定した標的タンパク質の場合の一例を図 6 に示す。これまでに本実験で明らかにした SCF ユビキチンリガーゼの新規標的タンパク質は細胞周期制御因子の転写因子である Swi5 と、カルシウムシグナリングの制御因子であるカルシニューリンの活性を調節する Rcn1 である。

実施例 3

実施例 2 で明らかにした標的タンパク質の一つは、ヒトにホモログが存在する。そこで、このヒトホモログをユビキチン化するのに必要な F-box タンパク質をスクリーニングすることができる。これまでに完全長配列が知られているヒト F-box タンパク質の cDNA のうち、7 種類 (FBW1, FBW1B, FBW2, FBW3, FBW5, FBW7, SKP2 : Watanabe N. et al. PNAS 101:4419-4424(2004) : これらの遺伝子は Invitrogen 社から購入することが可能である) を PCR で増幅し、AscI NotI で切断後に、pGilda にクローン化した。

次に、実施例 2 で明らかにした標的タンパク質のヒトホモログを PCR で増幅後に pJG4-5 にクローン化した。これとレポーター遺伝子 pSH18-34 とで、pre1-1 株を形質転換した。pre1-1 株はプロテアソームを構成するプロテアーゼ遺伝子の変異株である (Heinemeyer et al. EMBO J. 10: 555-562 (1991))。

得られた形質転換体に、上記で作製した pGilda にクローン化された F-box タンパク質を導入した。

実施例 1 と同様なフィルターアッセイを行った。予め許容温度で 12 時間培養後、

37℃（非許容温度）で24時間培養した。その結果、青いシグナルを出すものが1種あった。これは出芽酵母 Cdc4 とよく似た構造をしており、Cdc4 のヒトホモログと考えられているものであった。

実施例 4

pre1-1 株（プロテアソームの温度感受性変異株）あるいは野生株を以下のプラスミドで形質転換し、得られたコロニーをメンブレン（hybond-N Amersham：直径 88 mm）に移す。X-gal を含み、炭素源としてラフィノースとガラクトースを含む合成培地（寒天培地）の上にのせ、許容温度 30℃あるいは非許容温度 37℃で 12 hr 培養した（以下フィルターアッセイとする）。

レポーター遺伝子 LacZ を発現させ、その結果、コロニーが青くなるか調べた。

(i) 野生株を pSH18-34、pJG4-5-ASC-SIC1、及び pGilda-Cdc4 で形質転換し、許容温度 30℃で 24 時間培養した。

(ii) pre1-1 株を pSH18-34、pJG4-5-ASC-SIC1、及び pGilda-Cdc4 で形質転換し、許容温度で 12 時間培養後、非許容温度 37℃で 12 時間培養した。

(iii) pre1-1 株を pSH18-34、pJG4-5-ASC-SIC1、及び pGilda-Cdc4 で形質転換し、許容温度 30℃で 24 時間培養した。

結果をそれぞれ、(図 7)に示す。

(ii)のみ、POSITIVE なシグナルが得られた。

したがって、プロテアソームの温度感受性変異株を用いた標的タンパク質のスクリーニングが可能であることが判明した。

なお、本実施例 4 では、Cdc4 に代えて Cdc4-dF を用いることもできる。また、Cdc4 とは異なる F-box タンパク質 Grr1 とその標的タンパク質 Cln2 の結合も、この方法で検出することに成功したので、他の F-box にも（プロテアソームの温度感受性変異株）を利用する方法を適用できることが分かった。

参考例 2

Clb2 は C-box として Hct1 を持つ APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質

であることがわかっているタンパク質である。そこで、two-hybrid システムで、C-box タンパク質として Hct1 をもちいて bait を調製し、Clb2 との結合を検出できるか検討した。Two-hybrid システム (OriGene 社から購入した DupLEX-A Yeast 2-ハイブリッドシステムキット (大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域と転写因子 B42 の活性化領域を用いる two-hybrid 法) を使用し、pGilda-HCT1 及び pJG4-5-ASC-CLB2 で常法により形質転換した。結果、レポーターの発現は見られず、このようにユビキチン化の標的タンパク質の同定を行う場合には、通常の Two-hybrid システムでは不可能であることが分かった。

実施例 5

TK-542 あるいは野生株を以下のプラスミドで形質転換し、得られたコロニーをメンブレン (hybond-N Amersham: 直径 88 mm) に移す。X-gal を含み、炭素源としてラフィノースとガラクトースを含む合成培地 (寒天培地) の上にのせ、許容温度 30℃あるいは非許容温度 37℃で 12 hr 培養した (以下フィルターアッセイとする)。

レポーター遺伝子 LacZ を発現させ、その結果、コロニーが青くなるか調べた。

(i) 野生株を pSH18-34、pJG4-5-ASC-CLB2、及び pGilda-HCT1 で形質転換し、30℃で 24 時間培養した。

(ii) 野生株を pSH18-34、pJG4-5-ASC-CLB2、及び pGilda-HCT1-dC で形質転換し、30℃で 24 時間培養した。

(iii) TK-542 を pSH18-34、pJG4-5-ASC-CLB2、及び pGilda-HCT1-dC で形質転換し、30℃で 24 時間培養した。

結果をそれぞれ、図 8 に示す。

(iii) のみ、POSITIVE なシグナルが得られた。

したがって、上記標的タンパク質の分解が低下した変異株を用いてスクリーニングを行うこと (温度感受性変異株あるいは欠失変異株)、及び、完全長の C-box タンパク質ではなく、C-box モチーフを欠失した変異型 C-box タンパク質を bait として用いる (図 2 参照) ことという条件を同時に満たすことにより、標的タン

パク質のスクリーニングが可能となることが判明した。

実施例 6

APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質のスクリーニング出芽酵母ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

具体的には、

(1) SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質のスクリーニングと同様に、開発した実験系を用いたスクリーニングと、(2) 非特異的な相互作用を与えるクローンの除去及び標的タンパク質であることの確認からなる。実際に行った結果、(1) で得たクローンが比較的少なかったので、ユビキチンリガーゼの標的タンパク質であることを証明する手順のみ行った。

(1) 開発した実験系を用いたスクリーニング

予め、TK542 株を pGilda-Hct1-dC と pSH18-34 の二つで形質転換しておく。得られた菌株 (TK505 / pGilda-Hct1-dC + pSH18-34) に、出芽酵母ライブラリーを導入した (常法に従う)。

コロニーをメンブレン (hybond-N Amersham: 直径 88 mm) に移し、X-gal を含み炭素源としてラフィノースとガラクトースを含む合成培地 (寒天培地) 上にのせ、30℃ 24 時間保温 (以下フィルターアッセイとする) した。

レポーター遺伝子 LacZ を発現し、その結果、青くなったコロニーを培養し、常法に従って、プラスミドを分離し大腸菌 KC8 株 (Clonotech より購入した) を形質転換し、出てきたコロニーからプラスミドを抽出精製した。

再現性を確認するために、得られたクローンを再び TK542 / pGilda-Hct1-dC + pSH18-34 に導入し、同様の要領でフィルターアッセイを行った。結果、再現性のないものは廃棄した。

(2) 非特異的な相互作用を与えるクローンの除去及び標的タンパク質であることの確認

タンパク質の半減期を測定して、SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質で

あることの確認

野生株および *hct1* 変異株にこれまでの過程で得た候補プラスミドを導入した。

形質転換体をラフィノースを炭素源とする培地で培養後、細胞数が $1-2 \times 10^7$ 細胞程度まで培養した。ここで、ガラクトースを終濃度 2% となるように加え、ORF-HA がコードする融合タンパク質を生産させた。ガラクトースを加えてから 1 時間後に、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide (SIGMA から購入) を終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 加え、融合タンパク質の発現を停止させた。その直後から 15 分間隔で細胞を回収し、Yeong FM et al. Mol. Cell 5:501-511 (2000) に記載の方法で、タンパク質抽出液を作製した。次に、Western Blotting を行い、anti-HA (12CA5) 抗体 (Roche より購入) を用いて融合タンパク質の量を調べた。野生株では不安定であるが、変異株では安定化されたものを標的タンパク質とした。同定された 2 種類の標的蛋白質の半減期を図 9 に示す。

これまでに本実験で明らかにした APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質は細胞周期制御因子の Clb1 および UAH1 である。

産業上の利用可能性

本発明の実験手法により、ユビキチン化の標的タンパク質を明らかにすることができる。こうした基礎生物学への貢献のみでなく、治療薬のスクリーニング及び評価に用いることが可能である。

ユビキチン化の標的タンパク質を明らかにする実験系として有用である。

開発した手法を用いて、SCF ユビキチンリガーゼ及び APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、すでに明らかにされている標的タンパク質に加えて、新規の標的タンパク質を明らかにした。これらの中には細胞周期制御に関わる転写因子及びカルシウムシグナリングの制御因子を含む。

本発明は、治療薬のスクリーニング及び評価に有用である。本発明の方法は、F-box タンパク質と標的タンパク質の結合を検出する系を包含する。この結合量をレポーター遺伝子の活性で定量することもできる。したがって、例えば、ある

薬剤を作用したときに、F-box タンパク質と標的タンパク質の結合が促進されるか、あるいは阻害されるかを、レポーター遺伝子の活性の増減を調べることにより、容易に判断できる。特定の標的タンパク質へのユビキチン化活性が亢進、あるいは阻害されると、癌をはじめとした様々な病態の原因となることが知られている。もし、ユビキチン化活性が亢進することによって病気が引き起こされるのであれば、F-box タンパク質と標的タンパク質の結合を阻害する薬剤及び C-Box タンパク質と標的タンパク質の結合を阻害する薬剤は治療薬の候補になりうる。また、ユビキチン化活性が低下することによって病気が引き起こされるのであれば、F-box タンパク質と標的タンパク質の結合を促進する薬剤及び C-Box タンパク質と標的タンパク質の結合を阻害する薬剤は治療薬の候補になりうる。このように、F-box タンパク質と標的タンパク質の結合を促進あるいは阻害する薬剤及び C-Box タンパク質と標的タンパク質の結合を促進あるいは阻害する薬剤のスクリーニング及び評価する実験系として用いる。

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

請求の範囲

1. (1) 標的タンパク質の分解能が低下した細胞を、
(2-a) ユビキチンリガーゼを構成するサブユニットのうち標的タンパク質と結合するサブユニット又は変異型の該結合サブユニット及び第1の領域を含む第1の融合タンパク質をコードする遺伝子、並びに
(2-b) 標的タンパク質候補及び第2の領域を含む第2の融合タンパク質をコードする遺伝子で、
(3) 形質転換して得られる形質転換細胞であって、第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質が相互作用すれば第3の遺伝子の発現を活性又は抑制することができる形質転換細胞を用いて、ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法。

2. (1) 標的タンパク質の分解能が低下した細胞を、
(2-a) F-box タンパク質又は変異型 F-box タンパク質及び第1の領域を含む第1の融合タンパク質をコードする遺伝子、及び
(2-b) 標的タンパク質候補及び第2の領域を含む第2の融合タンパク質をコードする遺伝子で、
(3) 形質転換して得られる形質転換細胞であって、第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質が会合することにより第3の遺伝子の発現を活性又は抑制することができる形質転換細胞を用いて、SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法。

3. 第1の融合タンパク質中の第1の領域及び第2の融合タンパク質中の第2の領域の組み合わせが、(イ) 転写因子 Gal4 の DNA 結合領域及び転写因子 Gal4 の活性化領域、(ロ) 大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域と転写因子 B42 の活性化領域、(ハ) Gal4 の DNA 結合領域及び V16 の活性化領域、(ニ) 転写因子の DNA 結合領域及び転写因子の抑制化領域、(ホ) N-intein 及び C-intein、(ヘ) SOS タンパク質及び Myristylation signal、又は (ト) カルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T25 フラグメント及びカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T17 フラグメント、のいずれかである請求の範囲第2項記載の方法。

4. 第3の遺伝子がレポーター遺伝子である請求の範囲第2項記載の方法。

5. 標的タンパク質の分解能が低下した細胞は、F-box タンパク質が欠失した変異細胞、F-box タンパク質遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞、プロテアソームをコードする遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞又はプロテアソームインヒビターで処理された細胞である請求の範囲第2項記載の方法。

6. F-box が由来する細胞と標的タンパク質の分解能が低下した細胞がともに出芽酵母である請求の範囲第2項記載の方法。

7. (1-a) F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質又は Skp1 との結合能が低下した変異型 F-box タンパク質及び転写因子の DNA 結合領域 (以下 BD という) を含む第1の融合タンパク質をコードする遺伝子、並びに (1-b) 標的タンパク質候補及び転写因子の活性化領域 (以下 AD という) を含む第2の融合タンパク質をコードする遺伝子で、

(2) F-box タンパク質が欠失した変異細胞、F-box タンパク質遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞、プロテアソームインヒビターで処理された細胞、及びプロテアソーム変異細胞からなる群から選ばれる標的タンパク質の分解能を低下させた細胞を形質転換し、

(3) 該形質転換細胞内で第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質が相互作用又は結合すればレポーター遺伝子の発現を活性又は抑制させることにより、SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法。

8. 前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域であり、前記 AD が Gal4 の活性化領域であり、レポーター遺伝子 LacZ である請求の範囲第7項記載の方法。

9. 前記 BD が大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域であり、前記 AD が転写因子 B42 の活性化領域であり、レポーター遺伝子が LacZ である請求の範囲第7項記載の方法。

10. 前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域であり、前記 AD が V16 の活性化領域であり、変異細胞が、プロテアソームインヒビターで処理された哺乳動物細胞 HeLa である請求の範囲第7項記載の方法。

11. (1-a) F-box モチーフを欠失した変異型 F-box タンパク質又は Skp1 との結合能が低下した変異型 F-box タンパク質及び転写因子の活性化領域 (以下

AD という) を含む第 1 の融合タンパク質をコードする遺伝子、及び
(1-b) 標的タンパク質候補及び転写因子の DNA 結合領域 (以下 BD という) を含む第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子で、

(2) F-box タンパク質が欠失した変異細胞、F-box タンパク質遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞、プロテアソームインヒビターで処理された細胞、及びプロテアソーム変異株細胞からなる群から選ばれる標的タンパク質の分解能を低下させた細胞を形質転換し、

(3) 該形質転換細胞内で第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質が相互作用又は結合すればレポーター遺伝子の発現を活性又は抑制させることにより、SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法。

12. 前記 AD が Gal4 の活性化領域であり、前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域であり、レポーター遺伝子 LacZ である請求の範囲第 11 項記載の方法。

13. 前記 AD が転写因子 B42 の活性化領域と前記 BD が大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域であり、レポーター遺伝子が LacZ である請求の範囲第 11 項記載の方法。

14. 前記 AD が V16 の活性化領域であり、前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域であり、変異株細胞が、プロテアソームインヒビター処理された哺乳動物細胞である請求の範囲第 11 項記載の方法。

15. 標的タンパク質候補を含む第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子が遺伝子ライブラリーである請求の範囲第 7 から 14 項いずれか 1 項記載の方法。

16. F-box タンパク質がヒトの F-box タンパク質である請求の範囲第 7 から 15 項いずれか 1 項記載の方法。

17. プロテアソーム変異株細胞がプロテアソームの温度感受性変異出芽酵母細胞である請求の範囲第 7 又は 11 項記載の方法。

18. プロテアソームインヒビターで処理された細胞がプロテアソームインヒビターで処理した出芽酵母細胞である請求の範囲第 7 又は 11 項記載の方法。

19. ユビキチンリガーゼが APC/C ユビキチンリガーゼであり、ユビキチンリガーゼを構成するサブユニットのうち標的タンパク質と結合するサブユニットが、Cdc20 又は Hct1 とこれらのヒトホモログである請求の範囲第 1 項記載の方法。

20. (1) 標的タンパク質の分解能が低下した細胞を、
(2-a) C-box タンパク質又は変異型 C-box タンパク質及第1の領域を含む第1の融合タンパク質をコードする遺伝子、及び
(2-b) 標的タンパク質候補及び第2の領域を含む第2の融合タンパク質をコードする遺伝子で、
(3) 形質転換して得られる形質転換細胞であって、第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質が会合することにより第3の遺伝子の発現を活性又は抑制することができる形質転換細胞を用いて、APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法。

21. 第1の融合タンパク質中の第1の領域及び第2の融合タンパク質中の第2の領域の組み合わせが、(イ) 転写因子 Gal4 の DNA 結合領域及び転写因子 Gal4 の活性化領域、(ロ) 大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域と転写因子 B42 の活性化領域、(ハ) Gal4 の DNA 結合領域及び V16 の活性化領域、(ニ) 転写因子の DNA 結合領域及び転写因子の抑制化領域、(ホ) N-intein 及び C-intein、(ヘ) SOS タンパク質及び Myristylation signal、又は(ト) カルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T25 フラグメント及びカルモジュリン依存性アデニルシクラーゼの T17 フラグメント、のいずれかである請求の範囲第20項記載の方法。

22. 第3の遺伝子がレポーター遺伝子である請求の範囲第20項記載の方法。

23. 標的タンパク質の分解能が低下した細胞は、C-box タンパク質が欠失した変異細胞、C-box タンパク質遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞、プロテアソームをコードする遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞又はプロテアソームインヒビターで処理された細胞である請求の範囲第20項記載の方法。

24. C-box が由来する細胞と標的タンパク質の分解能が低下した細胞がともに出芽酵母である請求の範囲第20項記載の方法。

25. (1-a) C-box モチーフを欠失した変異型 C-box タンパク質及び転写因子の DNA 結合領域(以下 BD という)を含む第1の融合タンパク質をコードする遺伝子、並びに

(1-b) 標的タンパク質候補及び転写因子の活性化領域(以下 AD という)を含む

第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子で、

(2) C-box タンパク質が欠失した変異細胞、C-box タンパク質遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞、プロテアソームインヒビターで処理された細胞、及びプロテアソーム変異細胞からなる群から選ばれる標的タンパク質の分解能を低下させた細胞を形質転換し、

(3) 該形質転換細胞内で第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質が相互作用又は結合すればレポーター遺伝子の発現を活性又は抑制させることにより、APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法。

26. 前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域であり、前記 AD が Gal4 の活性化領域であり、レポーター遺伝子 LacZ である請求の範囲第 25 項記載の方法。

27. 前記 BD が大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域であり、前記 AD が転写因子 B42 の活性化領域であり、レポーター遺伝子が LacZ である請求の範囲第 25 項記載の方法。

28. 前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域であり、前記 AD が V16 の活性化領域であり、変異細胞が、プロテアソームインヒビターで処理された哺乳動物細胞である請求の範囲第 25 項記載の方法。

29. (1-a) C-box モチーフを欠失した変異型 C-box タンパク質又は APC/C ユビキチンリガーゼとの結合能が低下した C-box タンパク質及び転写因子の活性化領域（以下 AD という）を含む第 1 の融合タンパク質をコードする遺伝子、及び (1-b) 標的タンパク質候補及び転写因子の DNA 結合領域（以下 BD という）を含む第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子で、

(2) C-box タンパク質が欠失した変異細胞、C-box タンパク質遺伝子の発現が温度感受性である変異細胞、プロテアソームインヒビターで処理された細胞、及びプロテアソーム変異株細胞からなる群から選ばれる標的タンパク質の分解能を低下させた細胞を形質転換し、

(3) 該形質転換細胞内で第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質が相互作用又は結合すればレポーター遺伝子の発現を活性又は抑制させることにより、APC/C ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定する方法。

30. 前記 AD が Gal4 の活性化領域であり、前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域

であり、レポーター遺伝子 LacZ である請求の範囲第 29 項記載の方法。

31. 前記 AD が転写因子 B42 の活性化領域と前記 BD が大腸菌転写因子 LexA の DNA 結合領域であり、レポーター遺伝子が LacZ である請求の範囲第 29 項記載の方法。

32. 前記 AD が V16 の活性化領域であり、前記 BD が Gal4 の DNA 結合領域であり、変異株細胞が、プロテアソームインヒビターで処理された哺乳動物細胞 Hela である請求の範囲第 29 項記載の方法。

33. 標的タンパク質候補を含む第 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子が遺伝子ライブラリーである請求の範囲第 25 から 32 項いずれか 1 項記載の方法。

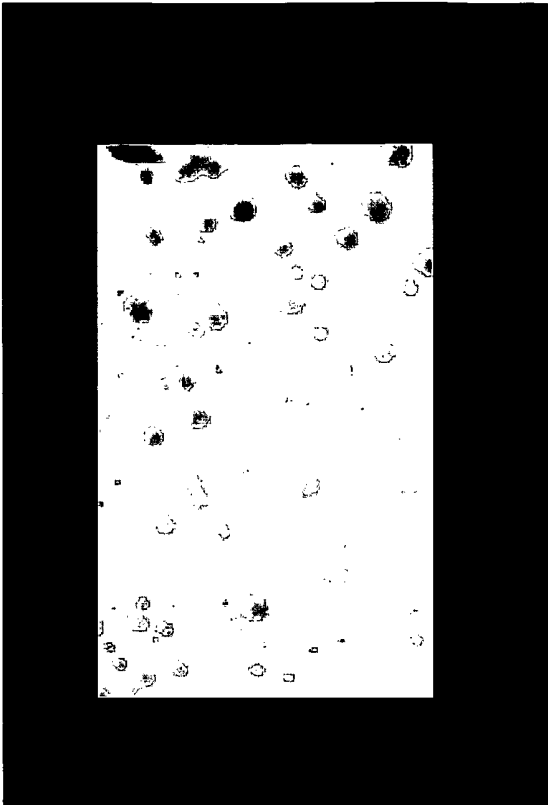
34. C-box タンパク質がヒトの C-box タンパク質である請求の範囲第 25 から 30 項いずれか 1 項記載の方法。

35. プロテアソーム変異株細胞がプロテアソームの温度感受性変異出芽酵母細胞である請求の範囲第 25 又は 29 項記載の方法。

36. プロテアソームインヒビターで処理された細胞がプロテアソームインヒビターで処理した出芽酵母細胞である請求の範囲第 25 又は 29 項記載の方法。

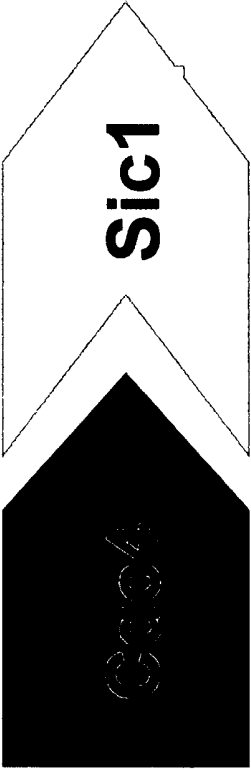
図 1

Negative 青くならない



Reporter gene; LacZ

F-box蛋白質 分解される蛋白質



(i)

図 2

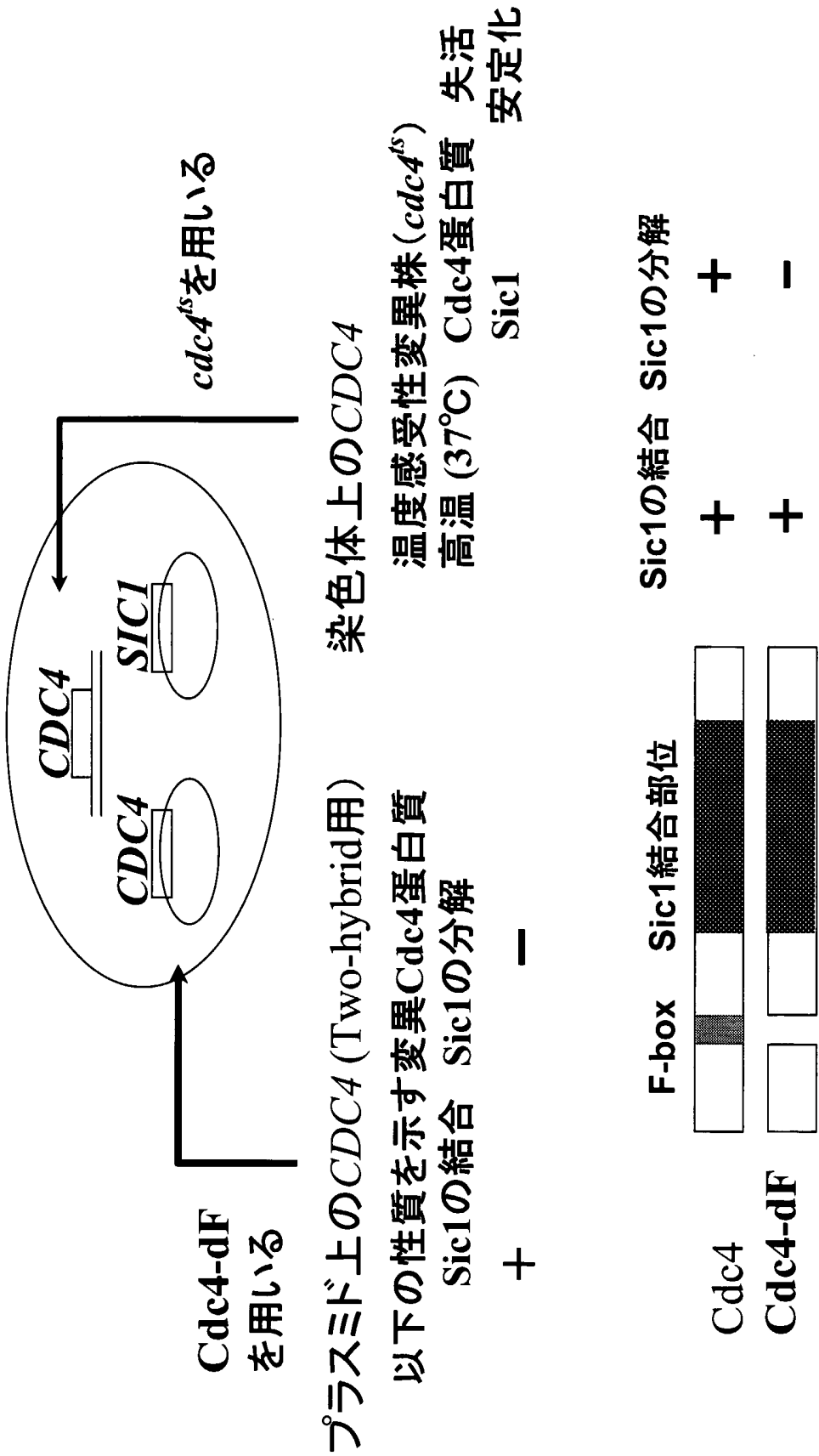


図 3

F-box蛋白質 分解される蛋白質

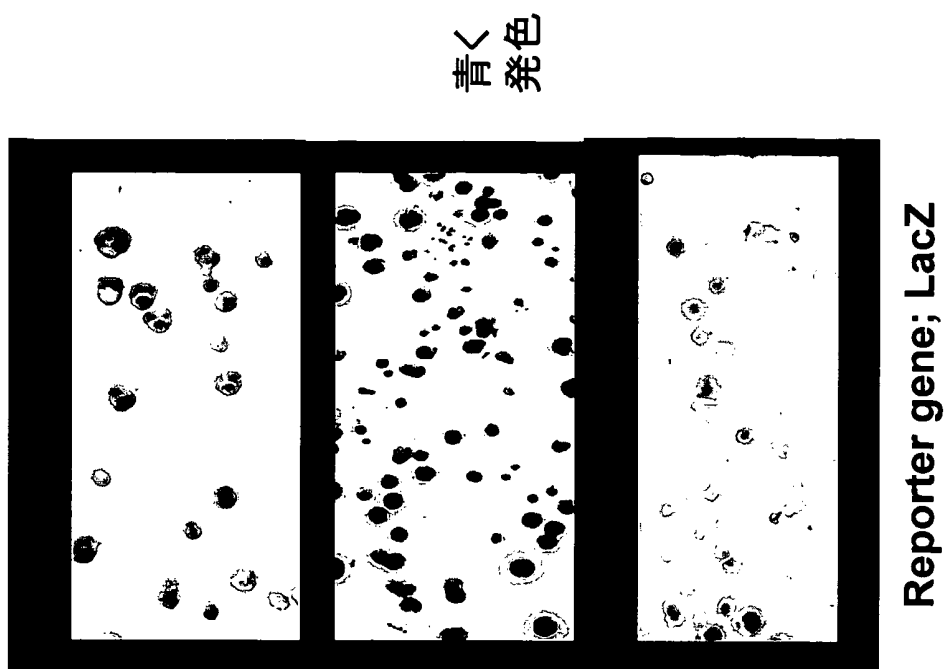
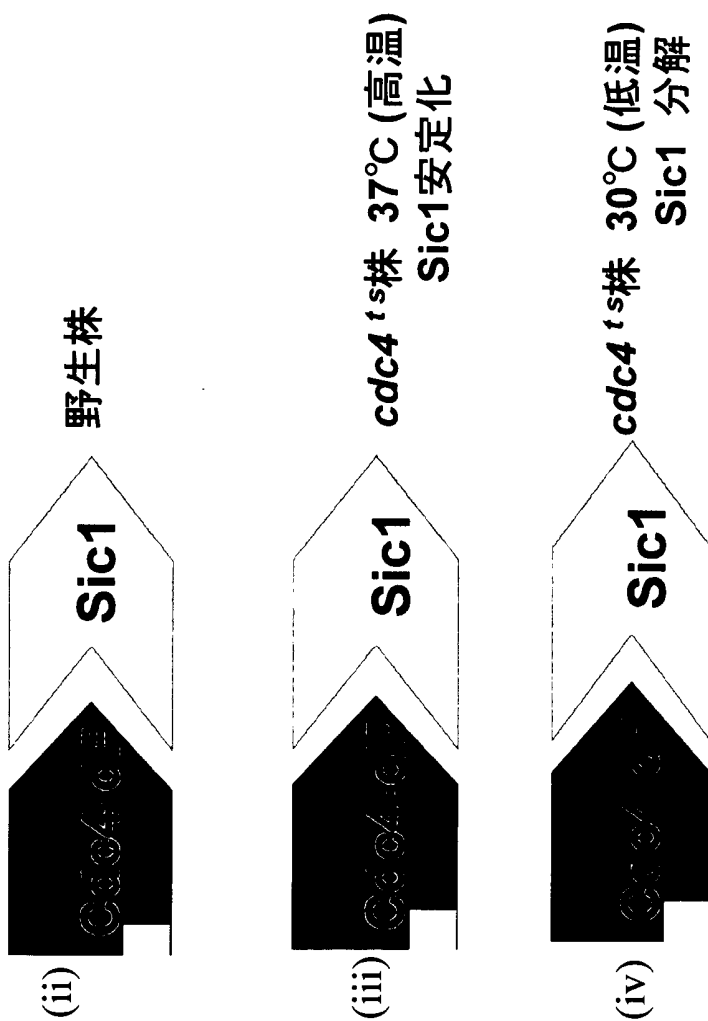


图 4

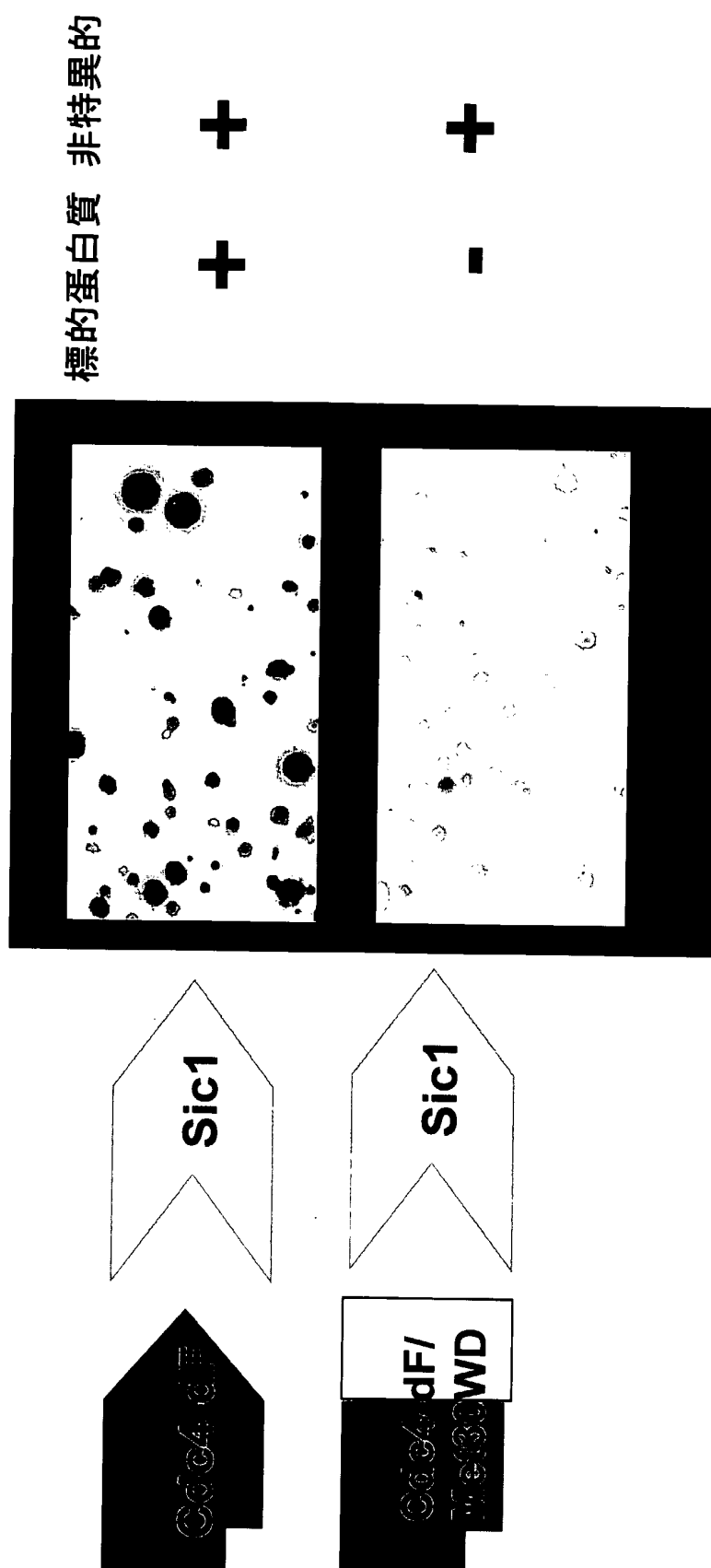


図5

蛋白質AとLacZの融合蛋白質 (A-LacZ)を酵母で合成
蛋白質の安定性 $\longleftrightarrow$ LacZの酵素活性

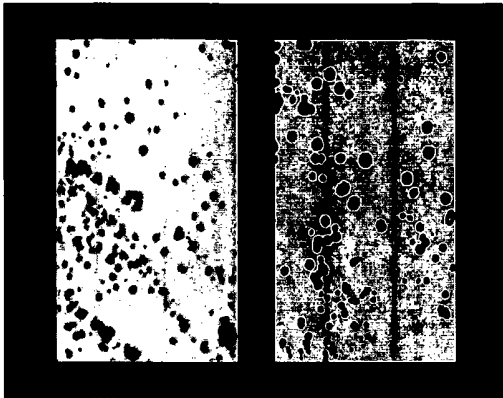
A-LacZの LacZ活性 (A=Sic1の場合)			
Aが分解される蛋白質 の場合 (例 Sic1)			
野生株	A-LacZは不安定	低	
<i>cdc4</i> 変異株	A-LacZは安定	高	

図 6

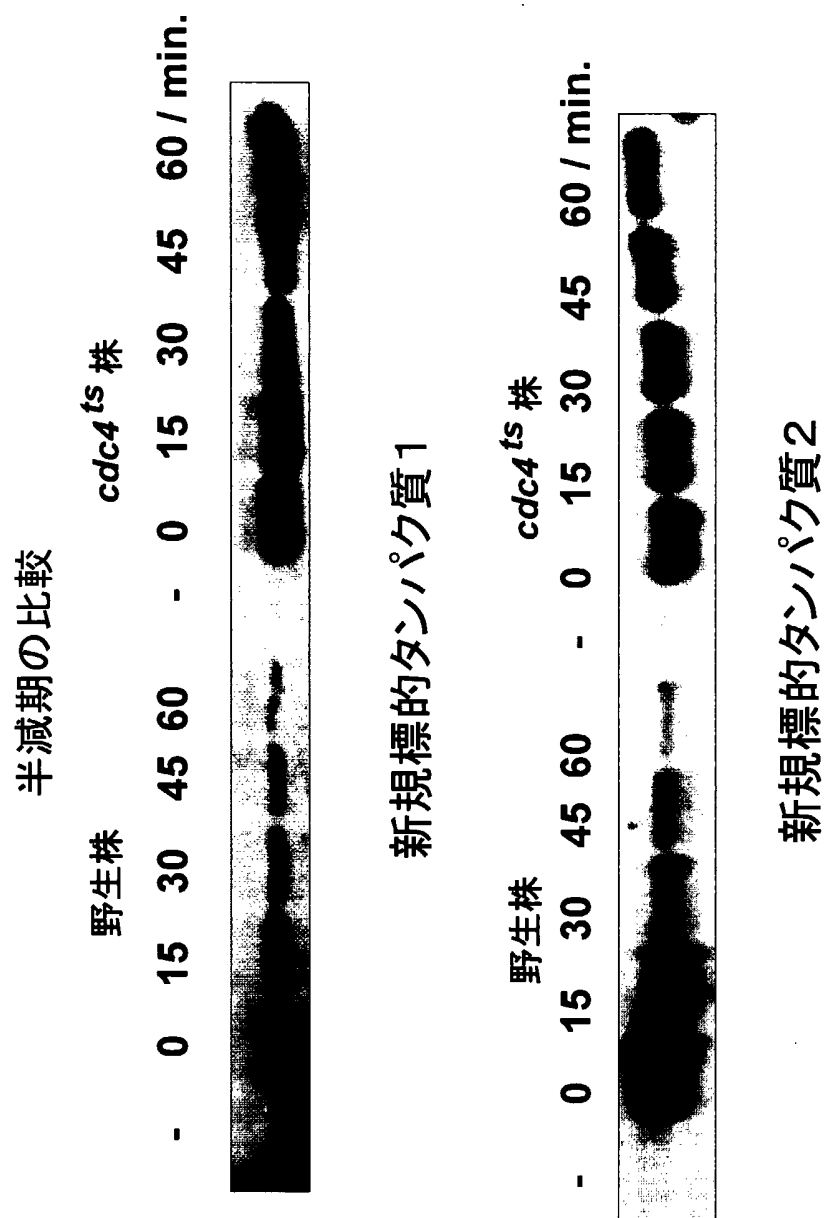


図 7

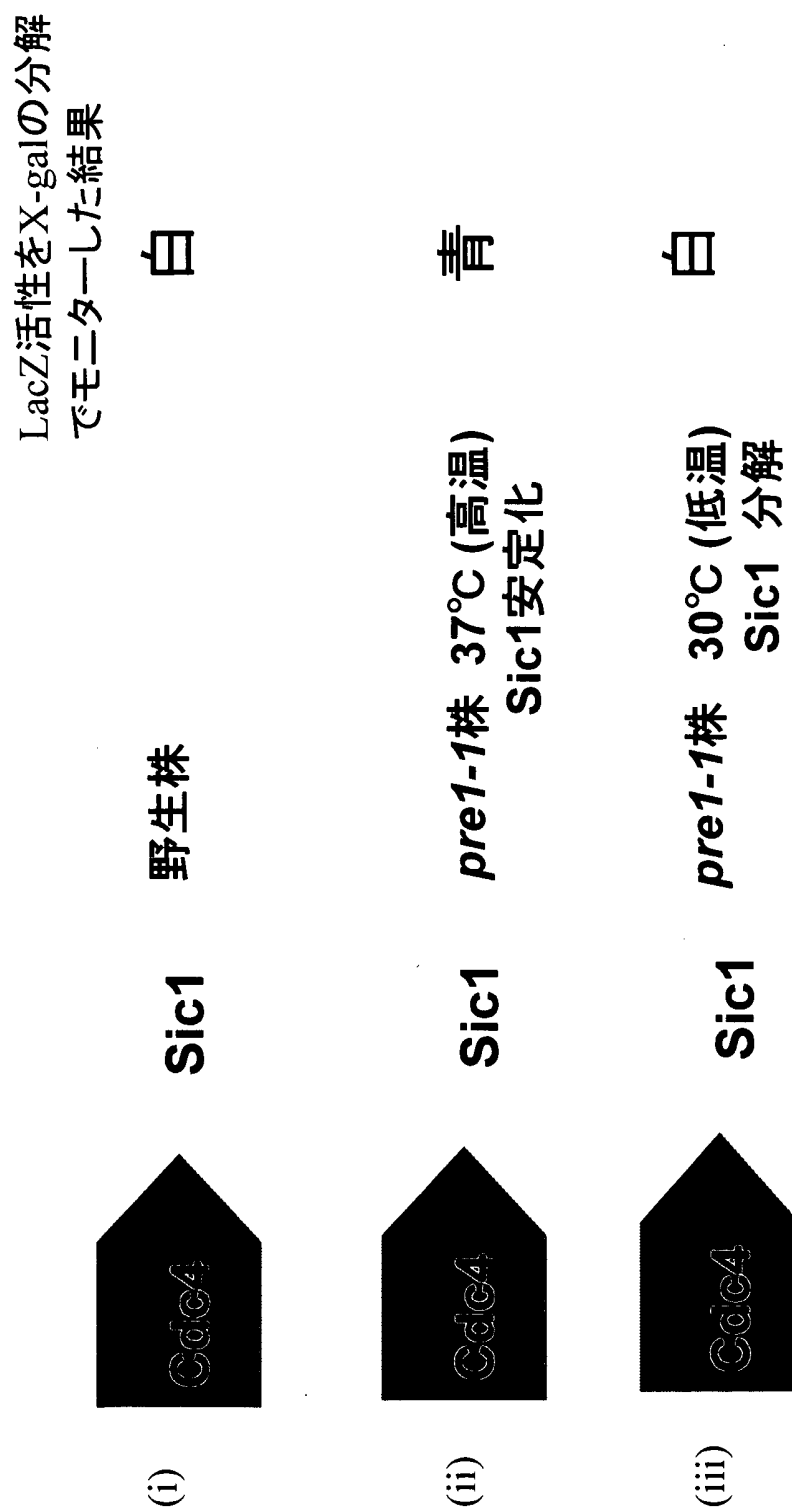


図 8

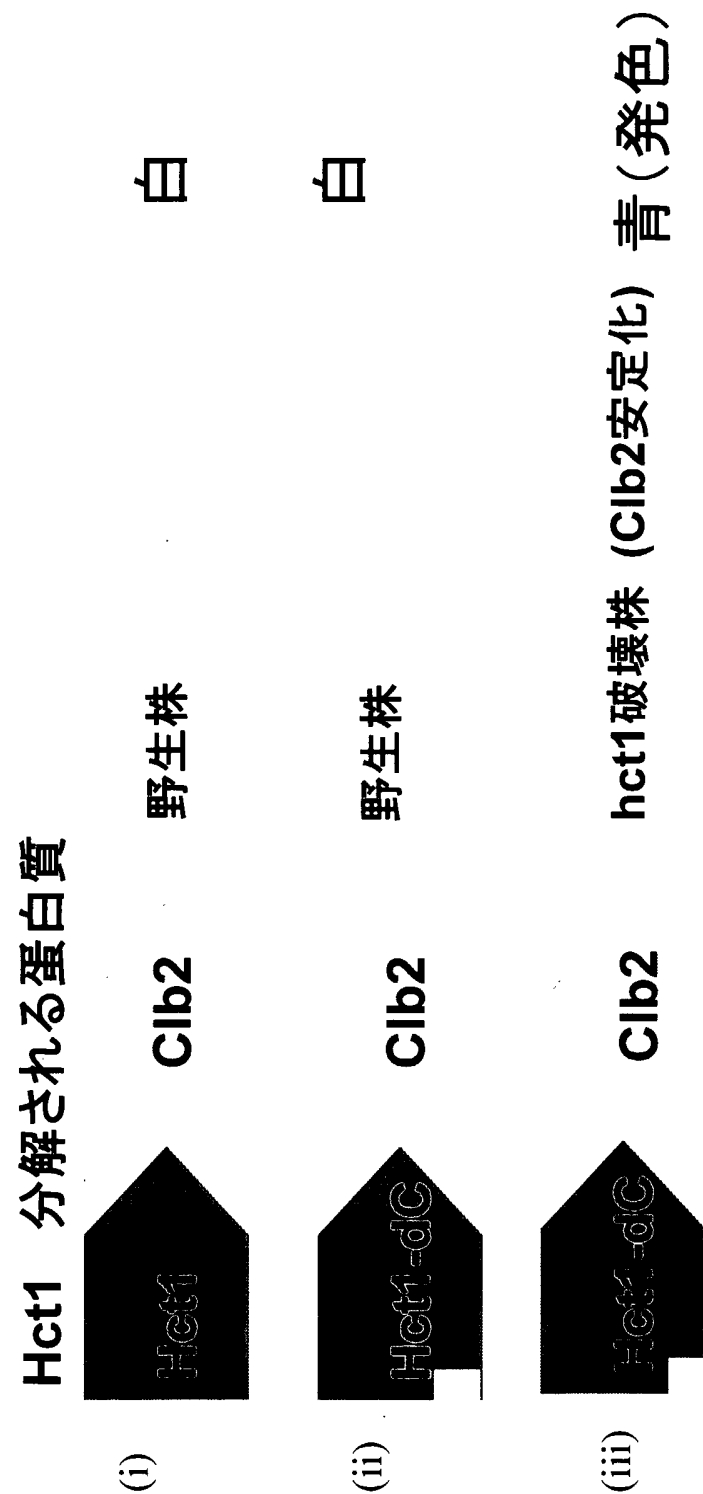


図9

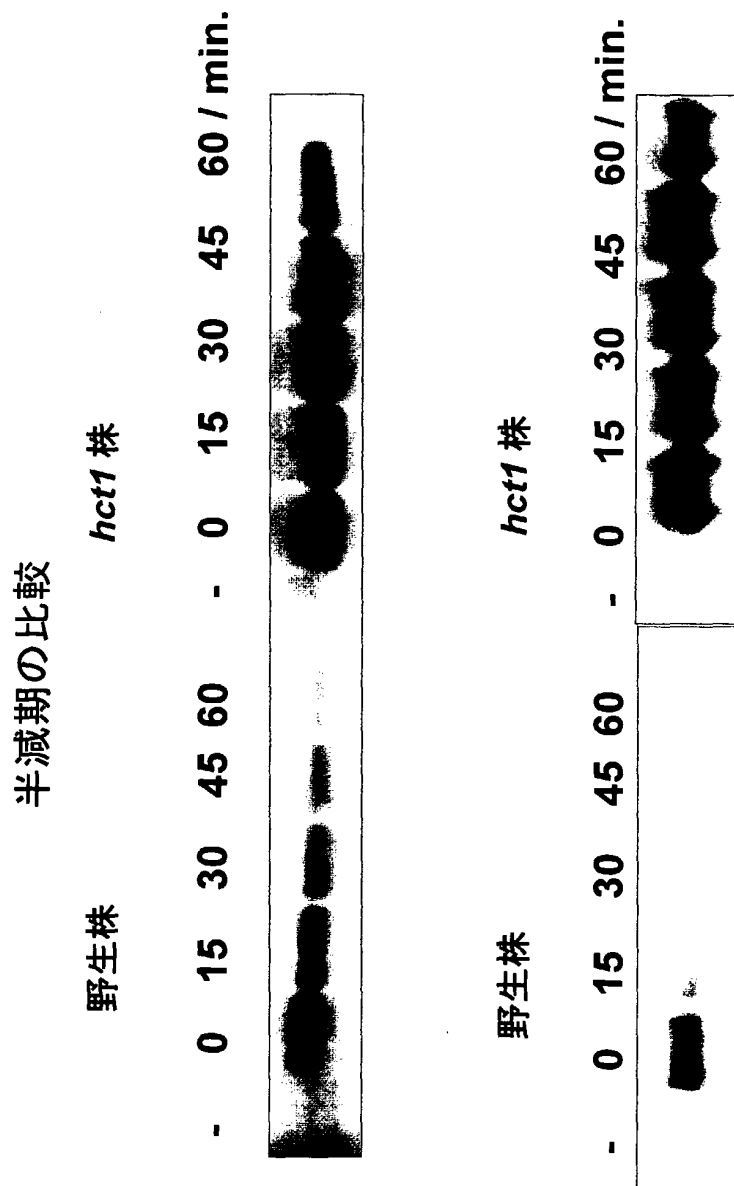
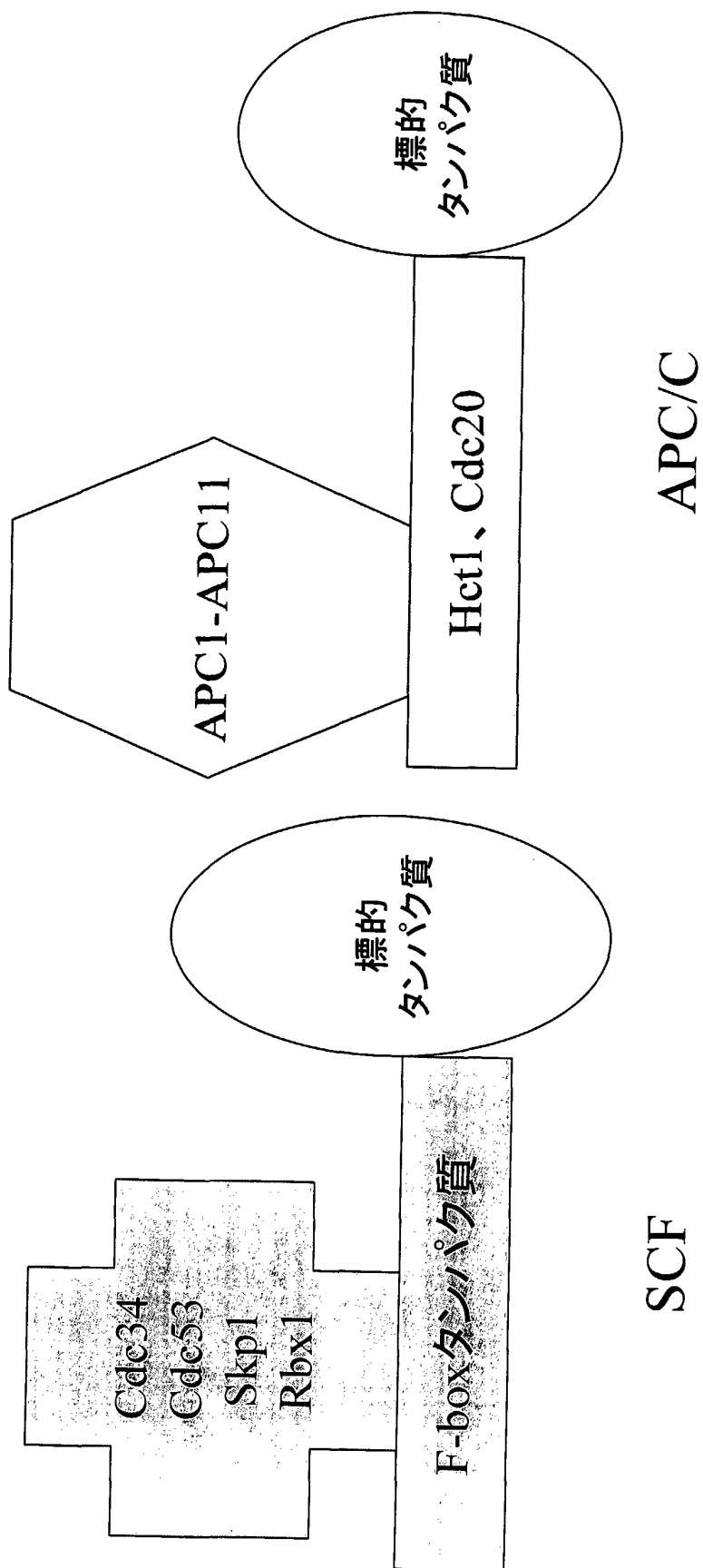


図 10



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A method of screening proteins to be ubiquitinated by the SCF ubiquitin ligases.

<130> PH-2592-PCT

<150> JP 2004-279216

<151> 2004-09-27

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 779

<212> PRT

<213> *saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

Met Gly Ser Phe Pro Leu Ala Glu Phe Pro Leu Arg Asp Ile Pro Val
1 5 10 15

Pro Tyr Ser Tyr Arg Val Ser Gly Gly Ile Ala Ser Ser Gly Ser Val
20 25 30

Thr Ala Leu Val Thr Ala Ala Gly Thr His Arg Asn Ser Ser Thr Ala
35 40 45

Lys Thr Val Glu Thr Glu Asp Gly Glu Glu Asp Ile Asp Glu Tyr Gln
50 55 60

Arg Lys Arg Ala Ala Gly Ser Gly Glu Ser Thr Pro Glu Arg Ser Asp
65 70 75 80

Phe Lys Arg Val Lys His Asp Asn His Lys Thr Leu His Pro Val Asn
85 90 95

Leu Gln Asn Thr Gly Ala Ala Ser Val Asp Asn Asp Gly Leu His Asn

100	105	110
Leu Thr Asp Ile Ser Asn Asp Ala Glu Lys Leu Leu Met Ser Val Asp		
115	120	125
Asp Gly Ser Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser Val Asn Met Gly Val Ala		
130	135	140
Ser His Asn Val Ala Ala Pro Thr Thr Val Asn Ala Ala Thr Ile Thr		
145	150	155
Gly Ser Asp Val Ser Asn Asn Val Asn Ser Ala Thr Ile Asn Asn Pro		
165	170	175
Met Glu Glu Gly Ala Leu Pro Leu Ser Pro Thr Ala Ser Ser Pro Gly		
180	185	190
Thr Thr Thr Pro Leu Ala Lys Thr Thr Lys Thr Ile Asn Asn Asn Asn		
195	200	205
Asn Ile Ala Asp Leu Ile Glu Ser Lys Asp Ser Ile Ile Ser Pro Glu		
210	215	220
Tyr Leu Ser Asp Glu Ile Phe Ser Ala Ile Asn Asn Asn Leu Pro His		
225	230	235
Ala Tyr Phe Lys Asn Leu Leu Phe Arg Leu Val Ala Asn Met Asp Arg		
245	250	255
Ser Glu Leu Ser Asp Leu Gly Thr Leu Ile Lys Asp Asn Leu Lys Arg		
260	265	270
Asp Leu Ile Thr Ser Leu Pro Phe Glu Ile Ser Leu Lys Ile Phe Asn		
275	280	285
Tyr Leu Gln Phe Glu Asp Ile Ile Asn Ser Leu Gly Val Ser Gln Asn		
290	295	300
Trp Asn Lys Ile Ile Arg Lys Ser Thr Ser Leu Trp Lys Lys Leu Leu		
305	310	315
Ile Ser Glu Asn Phe Val Ser Pro Lys Gly Phe Asn Ser Leu Asn Leu		
325	330	335

Lys Leu Ser Gln Lys Tyr Pro Lys Leu Ser Gln Gln Asp Arg Leu Arg
 340 345 350

Leu Ser Phe Leu Glu Asn Ile Phe Ile Leu Lys Asn Trp Tyr Asn Pro
 355 360 365

Lys Phe Val Pro Gln Arg Thr Thr Leu Arg Gly His Met Thr Ser Val
 370 375 380

Ile Thr Cys Leu Gln Phe Glu Asp Asn Tyr Val Ile Thr Gly Ala Asp
 385 390 395 400

Asp Lys Met Ile Arg Val Tyr Asp Ser Ile Asn Lys Lys Phe Leu Leu
 405 410 415

Gln Leu Ser Gly His Asp Gly Gly Val Trp Ala Leu Lys Tyr Ala His
 420 425 430

Gly Gly Ile Leu Val Ser Gly Ser Thr Asp Arg Thr Val Arg Val Trp
 435 440 445

Asp Ile Lys Lys Gly Cys Cys Thr His Val Phe Lys Gly His Asn Ser
 450 455 460

Thr Val Arg Cys Leu Asp Ile Val Glu Tyr Lys Asn Ile Lys Tyr Ile
 465 470 475 480

Val Thr Gly Ser Arg Asp Asn Thr Leu His Val Trp Lys Leu Pro Lys
 485 490 495

Glu Ser Ser Val Pro Asp His Gly Glu Glu His Asp Tyr Pro Leu Val
 500 505 510

Phe His Thr Pro Glu Glu Asn Pro Tyr Phe Val Gly Val Leu Arg Gly
 515 520 525

His Met Ala Ser Val Arg Thr Val Ser Gly His Gly Asn Ile Val Val
 530 535 540

Ser Gly Ser Tyr Asp Asn Thr Leu Ile Val Trp Asp Val Ala Gln Met
 545 550 555 560

Lys Cys Leu Tyr Ile Leu Ser Gly His Thr Asp Arg Ile Tyr Ser Thr

	565		570		575
Ile Tyr Asp His Glu Arg Lys Arg Cys Ile Ser Ala Ser Met Asp Thr					
	580		585		590
Thr Ile Arg Ile Trp Asp Leu Glu Asn Ile Trp Asn Asn Gly Glu Cys					
	595		600		605
Ser Tyr Ala Thr Asn Ser Ala Ser Pro Cys Ala Lys Ile Leu Gly Ala					
	610		615		620
Met Tyr Thr Leu Gln Gly His Thr Ala Leu Val Gly Leu Leu Arg Leu					
625		630		635	640
Ser Asp Lys Phe Leu Val Ser Ala Ala Ala Asp Gly Ser Ile Arg Gly					
	645		650		655
Trp Asp Ala Asn Asp Tyr Ser Arg Lys Phe Ser Tyr His His Thr Asn					
	660		665		670
Leu Ser Ala Ile Thr Thr Phe Tyr Val Ser Asp Asn Ile Leu Val Ser					
	675		680		685
Gly Ser Glu Asn Gln Phe Asn Ile Tyr Asn Leu Arg Ser Gly Lys Leu					
	690		695		700
Val His Ala Asn Ile Leu Lys Asp Ala Asp Gln Ile Trp Ser Val Asn					
705		710		715	720
Phe Lys Gly Lys Thr Leu Val Ala Ala Val Glu Lys Asp Gly Gln Ser					
	725		730		735
Phe Leu Glu Ile Leu Asp Phe Ser Lys Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Val					
	740		745		750
Ser Asn Pro Val Asn Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ile Ser Thr					
	755		760		765
Ser Leu Gly Leu Thr Arg Thr Thr Ile Ile Pro					
	770		775		

<210> 2

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> 1, 4, 8, 12, 34 and 40 ; 2, 3, 6, 10, 11, 14, 15, 18, 19, 32, 33, and 36-43

<223> Xaa at 1st residue is L or I.

Xaa at 4th position is L or V.

Xaa at 8th position is I, L, or V.

Xaa at 12th position is I or V.

Xaa at 34th position is L, I, V.

Xaa at 40th position is L or V.

Xaa at 2nd, 3rd, 6th, 10th, 11th, 14th, 15th, 18th, 19th, 32nd, 33rd, 36th, 37th, 38th, 39th, 40th, 41st, 42nd, or 43rd position is any one of 20 amino acids.

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: F-box Motif

<400> 2

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Glu	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Leu
1				5				10					15		

Asp	Xaa	Xaa	Asp	Leu	Leu	Asp	Leu	Asp	Asp	Val	Cys	Lys	Arg	Trp	Xaa
			20				25						30		

Xaa	Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu
		35					40				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **G01N33/68** (2006.01)

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)

C12Q1/00 (2006.01) - **1/68** (2006.01), **C12N15/00** (2006.01) - **15/90** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **G01N33/68** (2006.01)

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 practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TOKARZ S. et al., The ISG15 isopeptidase UBP43 is regulated by proteolysis via the SCFSkp2 ubiquitin ligase, J.Biol.Chem., Epub 01 September, 2004 (01.09.04) (05 November, 2004 (05.11.04)), 279(45), p.46424-30 LI	1-36
Y	Z. et al., Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, J.Biol.Chem., 15 February, 2002 (15.02.02), 277(7), p.4656-62	1-36



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 October, 2005 (17.10.05)

Date of mailing of the international search report
25 October, 2005 (25.10.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018245

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAMURA, T. et al., A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of the VHL ubiquitin ligase, J.Biol.Chem., 16 August, 2002 (16.08.02), 277(33), p.30388-93	1-36
Y	LI Y. et al., Gazdciu S., Pan ZQ., Fuchs SY. Related Articles, Links Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate, J.Biol.Chem., 19 March, 2004 (19.03.04), 279(12), p.11074-80	1-36
Y	COCKMAN M.E. et al., Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, J.Biol. Chem., 18 August, 2000 (18.08.00), 275(33), p.25733-41	1-36
Y	BAI C. et al., SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box, Cell, 26 July, 1996 (26.07.96), 86(2), p.263-74	1-18
Y	SCHWAB M. et al., Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC, EMBO J., 17 September, 2001 (17.09.01), 20(18), p.5165-75	1,19-36
P,X	Tsutomu KISHI et al., "SCF Ubiquitin Ligase no Hyoteki Tanpakushitsu o Dotei suru Tameno Jikken Shuho no Kaihatsu", 27th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Koen Yoshishu, 25 November, 2004 (25.11.04), page 546, 1PB-173	1-36

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12Q1/68 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), G01N33/68 (2006.01)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12Q1/00 (2006.01)- 1/68 (2006.01), C12N15/00 (2006.01)- 15/90 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), G01N33/68 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN) JSTPlus(JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	TOKARZ S et al., The ISG15 isopeptidase UBP43 is regulated by proteolysis via the SCFSkp2 ubiquitin ligase, J Biol Chem, Epub 2004 Sep 1(2004 Nov 5), 279(45), p. 46424-30 LI	1-36	
Y	Z et al., Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, J Biol Chem, 2002 Feb 15, 277(7), p. 4656-62	1-36	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 17. 10. 2005		国際調査報告の発送日 25. 10. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伏見 邦彦 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9838

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	KAMURA T et al., A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of the VHL ubiquitin ligase, J Biol Chem, 2002 Aug 16, 277(33), p. 30388-93	1-36
Y	LI Y et al., Gazdoui S, Pan ZQ, Fuchs SY. Related Articles, Links Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate, J Biol Chem, 2004 Mar 19, 279(12), p. 11074-80	1-36
Y	COCKMAN M E et al., Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, J Biol Chem, 2000 Aug 18, 275(33), p. 25733-41	1-36
Y	BAI C et al., SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box, Cell, 1996 Jul 26, 86(2), p. 263-74	1-18
Y	SCHWAB M et al., Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC, EMBO J, 2001 Sep 17, 20(18), p. 5165-75	1, 19-36
PX	岸努等, SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定するための実験手法の開発, 第 27 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 2004. 11. 25, p. 546 1PB-173	1-36